



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**INFLUENCIA DE LA SALINIDAD EN LA  
ACUMULACIÓN DE PLOMO E INDICADORES DE  
RESPUESTA AL ESTRÉS EN DOS ESPECIES DE  
MANGLAR**

Tesis que presenta

**MARÍA DEL REFUGIO CABAÑAS MENDOZA**

En opción al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Recursos Naturales)

Mérida, Yucatán, México

2020



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **María del Refugio Cabañas Mendoza** titulado “**Influencia de la salinidad en la acumulación de plomo e indicadores de respuesta al estrés en dos especies de manglar**” fue realizado en los laboratorios de Fisiología Ambiental de Plantas de las Unidades de Recursos Naturales y de Biotecnología, en la línea Servicios Ambientales de la Biodiversidad, del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección de los Dres. José Luis Andrade Torres y Jorge Santamaría Fernández, pertenecientes al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas dentro de la opción de Recursos Naturales de este Centro.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cecilia Hernández Zepeda'.

---

**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, a 05 de Julio de 2020

Mérida, Yucatán, México, a 05 de Julio del 2020

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

María del Refugio Cabañas Mendoza

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por la beca otorgada (419215) y a CICY por aceptarme en su programa de posgrado y por las instalaciones que permitieron llevar a cabo esta tesis.

A los laboratorios de Fisiología Vegetal de la Unidad de Recursos Naturales y de Biotecnología del CICY, así como a sus técnicos Roberth Armando Us Santamaria y Francisco Espadas-Gil, por el apoyo en los equipos y en las salidas al campo, por proporcionarme el material, reactivos y bibliografía y por brindarme asesoría cuando tuve alguna duda.

Al laboratorio de Procesamiento de Alimentos del Instituto Tecnológico de Mérida, en especial al Dr. Enrique Sauri Duch por el préstamo de las instalaciones y equipos, por proporcionarme el material y los reactivos necesarios para llevar a cabo gran parte del proceso experimental y por brindarme la asesoría y conocimientos cuando lo necesité. También agradezco al encargado del laboratorio Abraham Cauch por la enseñanza en el uso de los equipos y técnicas experimentales.

A mis asesores de tesis, los Dres. José Luis Andrade Torres y Jorge Santamaría Fernández, por el apoyo económico y los conocimientos brindados para la realización de esta tesis y como parte de mi formación como investigadora, por sus consejos y comprensión.

A Susana Dzib Ek, César Canche Collí y Diana Jacqueline Cisneros de la Cruz por apoyarme en el riego de plantas y en la realización de algunos de los experimentos, por responder a mis dudas y darme comentarios que ayudaron a llevar a cabo este trabajo. A mis demás compañeros del área de Recursos Naturales y del CICY por ser un apoyo moral en este proceso al brindándome su amistad y su orientación.

A mi familia que siempre me han apoyado en mis decisiones académicas, y que a pesar de estar a kilómetros de distancia siempre han creído que puedo lograr lo que me proponga y me desean todo lo mejor en la vida. A mis amigos xalapeños y yucatecos que han estado ahí para apoyarme en mis momentos de estrés y frustración motivándome a seguir, por hacerme reír y comprenderme en los momentos cuando más lo necesito.

---

**ÍNDICE**

**LISTA DE FIGURAS** .....v

**LISTA DE TABLAS**..... viii

**INTRODUCCIÓN**.....1

**CAPÍTULO I**

ANTECEDENTES ..... 5

1.1 PROBLEMÁTICA DE LA CONTAMINACIÓN POR PLOMO EN LAGUNAS COSTERAS DE MÉXICO ..... 5

1.2 FACTORES AMBIENTALES QUE DETERMINAN LA DISPONIBILIDAD DE METALES PESADOS EN LOS HUMEDALES ..... 9

1.3 LAS ESPECIES DE MANGLAR COMO INDICADORAS DE CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS ..... 10

1.4 RESPUESTA DE LAS PLANTAS A LA EXPOSICIÓN POR METALES PESADOS ..... 11

JUSTIFICACIÓN ..... 13

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN..... 14

OBJETIVO GENERAL ..... 14

OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 14

HIPÓTESIS ..... 15

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... 15

**CAPÍTULO II. SALINITY AFFECTS pH AND LEAD AVAILABILITY IN TWO MANGROVE PLANT SPECIES**

ABSTRACT ..... 19

INTRODUCTION..... 20

MATERIALS AND METHODS ..... 22

## ÍNDICE

---

|   |    |
|---|----|
| 2.1 PLANT MATERIAL AND GROWTH CONDITIONS .....                  | 22 |
| 2.2 ACCLIMATIZATION OF PLANTS TO SALINITY.....                  | 22 |
| 2.3 LEAD TREATMENTS .....                                       | 23 |
| 2.4 CONCENTRATION OF LEAD IN TISSUES.....                       | 23 |
| 2.5 GROWTH PARAMETERS.....                                      | 23 |
| 2.6 PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS .....                            | 24 |
| 2.7 STATISTICAL ANALYSIS.....                                   | 24 |
| RESULTS.....  | 24 |
| 2.1 CONCENTRATION OF LEAD IN TISSUES.....                       | 24 |
| 2.2 EFFECT OF Pb ACCUMULATION ON PLANT MORPHOLOGY.....          | 27 |
| 2.3 EFFECT OF Pb AND SALINITY ON PLANT GROWTH.....              | 28 |
| 2.4 EFFECT OF SALINITY ON pH AND ITS RELATION TO Pb UPTAKE..... | 30 |
| DISCUSSION.....   | 38 |
| CONCLUSION .....  | 40 |
| ACKNOWLEDGEMENTS .....  | 41 |

### **CAPÍTULO III. EL PLOMO AFECTA DIFERENCIALMENTE ALGUNOS INDICADORES DE RESPUESTA AL ESTRÉS EN LAS ESPECIES *Avicennia germinans* Y *Laguncularia racemosa***

|   |    |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN .....  | 43 |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                | 44 |
| 3.1 CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO..... | 44 |
| 3.2 EXPOSICIÓN AL PLOMO .....                             | 45 |

---

|  |    |
|--|----|
| 3.3 CONCENTRACIÓN DE PLOMO EN TEJIDOS .....                        | 45 |
| 3.4 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO.....                                 | 45 |
| 3.5 EVALUACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE CO <sub>2</sub> .....          | 45 |
| 3.6 CUANTIFICACIÓN DE PROLINA.....                                 | 46 |
| 3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....               | 46 |
| 3.7.1 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES.....                  | 46 |
| 3.7.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR REDUCCIÓN DEL FE (III).....       | 43 |
| 3.7.3 CAPACIDAD CAPTADORA DE RADICALES LIBRES .....                | 43 |
| 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....                                     | 43 |
| RESULTADOS.....  | 48 |
| 3.1 CONCENTRACIÓN DE Pb EN LOS TEJIDOS.....                        | 48 |
| 3.2 EFECTO DEL Pb EN LA MORFOLOGÍA DE LAS PLANTAS DE MANGLAR ..... | 49 |
| 3.3 EFECTO DEL Pb EN EL CRECIMIENTO .....                          | 52 |
| 3.4 EFECTO DEL Pb EN LA TASA FOTOSINTÉTICA .....                   | 53 |
| 3.5 EFECTO DEL Pb EN LA ACUMULACIÓN DE PROLINA.....                | 54 |
| 3.6 EFECTO DEL Pb EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....                | 57 |
| 3.6.1 REDUCCIÓN DE FE (III) .....                                  | 57 |
| 3.6.2 CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES.....                           | 59 |
| DISCUSIÓN.....   | 62 |
| CONCLUSIÓN .....   | 66 |

**CAPÍTULO IV**

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| DISCUSIÓN GENERAL .....        | 68        |
| CONCLUSIONES GENERALES .....   | 71        |
| PERSPECTIVAS.....              | 72        |
| <b>LITERATURA CITADA .....</b> | <b>73</b> |

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

**Figura 1.1** Esquema general de la estrategia experimental.....17

## CAPÍTULO II

**Figure 2.1** Morphological damage and salt excretion in individuals of both species.....28

**Figure 2.2** Average total concentration of Pb found in plants exposed to 40µM, 80µM y 160µM Pb treatment over 30 days of exposure, for each salt treatment in *A. germinans* and *L. racemosa*. Data are means ± standard errors.....30

**Figure 2.3** Relationships between tissue Pb concentration and dry weight (a, b, c, g, h, i) and plant length (d, e, f, j, k, l) for the 40µM, 80µM y 160µM treatment of Pb over 30 days of exposure, for each salt treatment in *A. germinans* and *L. racemosa*.....31

**Figure 2.4** Electrical conductivity and pH from substrate of plants of *A. germinans* and *L. racemosa* before exposure to salt (none), during exposure to salt (salt) and during exposure to salt and lead (salt + Pb). White bars are for treatment of 0 mg L<sup>-1</sup> of salt, gray bars for 7 mg L<sup>-1</sup>, and black bars for 15 mg L<sup>-1</sup>. For panels b and d, asterisks indicate significant pH differences among salt treatment. Data are means ± standard errors. (n=80 for none and salt, and n= 16 for salt + Pb).....32

**Figure 2.5** Relationship between electrical conductivity (EC) and pH for substrate of plants of *Avicennia germinans* (A) and *Laguncularia racemosa* (B).....33

**Figure 2.6** Relationships between tissue Pb concentration (roots and leaves of *Avicennia germinans*) and substrate electrical conductivity (EC) and pH, for the three salinity treatments at 2, 7, 15 and 30 d for Pb treatments of 40µM, 80µM y 160µM.....34

**Figure 2.7** Relationships between tissue Pb concentration (root and leaves of *Laguncularia racemosa*) and substrate electrical conductivity (EC) and pH, for the three salinity treatments at 2, 7, 15 and 30 d for Pb treatments of 40µM, 80µM y 160µM.....35

**Figure S1.** Location of the Ria Celestun Biosphere Reserve in Yucatan, Mexico. The road to the main town crosses the lagoon and the collection points are shown. This map also shows other main preservation areas of the Yucatan Peninsula.....37

**CAPÍTULO III**

- Figura 3.1** Concentración promedio de Pb en los tejidos de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F) expuestas a 75µM, 150µM y 300µM de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> que se obtuvieron durante un periodo de 30 días. La escala del eje “y” en las concentraciones de Pb en raíz es mayor a la de los otros dos tejidos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb, para cada día de exposición, para cada tejido y para cada especie, n=12; *p* < 0.05. Se muestran barras de error estándar. Ni en tiempos 0 ni en el control se detectó Pb en los tejidos.....49
- Figura 3.2** Daño morfológico visible en plantas de *Avicennia germinans* expuestas a diferentes concentraciones de nitrato de plomo en diferentes días de exposición.....50
- Figura 3.3** Daño morfológico visible en plantas de *Laguncularia racemosa* expuestas a diferentes concentraciones de nitrato de plomo en diferentes días de exposición.....51
- Figura 3.4** Valores promedio de altura y peso fresco total de plantas de *Avicennia germinans* (A y B) y *Laguncularia racemosa* (C y D) expuestas a 0µM, 75µM, 150µM y 300µM de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> durante un periodo de 30 días. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb, para cada día de exposición y para cada especie, n=16, *p* < 0.05. Se muestran barras de error estándar.....52
- Figura 3.5** Tasa de fotosíntesis neta en plantas de *Avicennia germinans* (A) y *Laguncularia racemosa* (B) expuestas a 0µM, 75µM, 150µM y 300µM de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> durante un periodo de 30 días. Las líneas indican el error estándar.....53
- Figura 3.6** Relación entre la concentración promedio de Pb en la hoja y la asimilación neta de CO<sub>2</sub> en plantas de *Avicennia germinans* (A) y *Laguncularia racemosa* (B), bajo todos los tratamientos y durante 30 días de exposición, *p* <0,05.....54
- Figura 3.7** Concentración promedio de prolina obtenida en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F) expuestas a 0µM, 75µM, 150µM y 300µM de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> durante un periodo de 30 días. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb, para cada día de exposición, para cada tejido y para cada especie, n=16; *p*<0.05. Se muestran barras de error estándar.....55
- Figura 3.8** Relación entre la concentración promedio de Pb y la concentración promedio de prolina en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F), bajo todos los

---

tratamientos y durante 30 días de exposición,  $p < 0,05$ . La escala del eje "x" es diferente para cada tejido.....56

**Figura 3.9** Concentración promedio de antioxidantes reductores de Fe III obtenidos en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F) expuestas a 0 $\mu$ M, 75 $\mu$ M, 150 $\mu$ M y 300 $\mu$ M de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> durante un periodo de 30 días. La escala del eje "y" en *A. germinans* es menor que en *L. racemosa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb, para cada día de exposición, para cada tejido y para cada especie,  $n=16$ ;  $p < 0.05$ . Las líneas indican el error estándar.....58

**Figura 3.10** Relación entre la concentración promedio de Pb y la concentración promedio de antioxidantes reductores de Fe III encontrados en cada tejido de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F), bajo todos los tratamientos y durante 30 días de exposición,  $p < 0,05$ . Las escalas de los ejes son diferentes entre especies y entre tejidos.....59

**Figura 3.11** Concentración promedio de antioxidantes captadores de radicales libres obtenida en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F) expuestas a 0 $\mu$ M, 75 $\mu$ M, 150 $\mu$ M y 300 $\mu$ M de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> durante un periodo de 30 días. La escala del eje "y" en *A. germinans* es menor que en *L. racemosa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb para cada día de exposición, para cada tejido y para cada especie,  $n=16$ ;  $p < 0.05$ . Las líneas indican el error estándar.....60

**Figura 3.12** Relación entre la concentración promedio de Pb y la concentración promedio de antioxidantes captadores de radicales libres en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A) y *Laguncularia racemosa* (B), bajo todos los tratamientos y durante 30 días de exposición,  $p < 0,05$ . Las escalas de los ejes son diferentes entre especies y entre tejidos.....61

## LISTA DE TABLAS

### CAPÍTULO I

**Tabla 1.1** Concentraciones promedio de plomo total en sedimento ( $\mu\text{g g}$  peso seco) y agua ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en zonas costeras de México.....6

### CAPÍTULO II

**Table 2.1** Concentration of endogenous lead ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) found in plants exposed to different concentrations of lead, grown in the absence of salt ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ) during a 30-day exposure period. Data are means  $\pm$  standard error.....25

**Table 2.2** Concentration of endogenous lead ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) found in plants exposed to different concentrations of lead, grown under  $7 \text{ mg L}^{-1}$  of salt during a 30-day exposure period. Data are means  $\pm$  standard error.....26

**Table 2.3** Concentration of endogenous lead ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) found in plants exposed to different concentrations of lead, grown under  $15 \text{ mg L}^{-1}$  of salt during a 30-day exposure period. Data are means  $\pm$  standard error.....27

**Table 2.4** Growth parameters during 30 days of Pb treatments in plants of *A. germinans* and *L. racemosa* grown under different salinity conditions. Data are means  $\pm$  standard error.....29

**Table S1.** Analyses of variance for plant tissues, plant growth and substrate pH variables of experimental plants of *Avicennia germinans* and *Laguncularia racemosa*; factors were concentrations of Pb (4), times of exposure (5), and salinity (3). The factor plant tissue was considered nested within species.....36

### CAPÍTULO II

**Tabla 3.1** Análisis de varianza factorial de los parámetros analizados en *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* para las diferentes concentraciones de Pb (4) y tiempos de exposición (5). El factor tejido vegetal se consideró anidado dentro de las especies.....63

---

## RESUMEN

Durante varios años, se han realizado estudios en las lagunas costeras de México que han demostrado altos niveles de contaminación por metales pesados en los manglares, siendo el plomo (Pb) el más persistente. Los problemas ambientales generados por la alta toxicidad de los metales pesados en estos ecosistemas nos han llevado a investigar la capacidad de acumulación y de tolerancia de las especies de plantas que se encuentran en estos sitios, para obtener información útil para fines de restauración. No obstante, al llevar a cabo estos estudios, nos hemos dado cuenta que la toxicidad de un elemento no depende solo de su concentración en el medio, sino también de su grado de disponibilidad, que está determinado por las condiciones ambientales.

El objetivo general de esta tesis fue evaluar como diferentes concentraciones de sal afectan la absorción, acumulación y translocación de Pb en las especies de manglar *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*, y si esto ocasiona cambios en el pH del sustrato. Además queríamos explorar algunos de los mecanismos que estas dos especies puedan tener para tolerar el Pb, incluida la acumulación de prolina y la capacidad antioxidante. También se evaluó el efecto tóxico del metal sobre la morfología y fisiología de las plantas. En general, se cultivaron plantas de *A. germinans* y *L. racemosa* en condiciones con o sin salinidad durante 6 meses para ser regadas con diferentes concentraciones de nitrato de Pb; se tomaron muestras de sustrato y tejido en diferentes tiempos para su análisis.

En el primer experimento, los resultados más relevantes mostraron que, en ausencia de sal, se produjo una acumulación de Pb en *A. germinans* y principalmente en *L. racemosa*; sin embargo, la presencia de sal produjo un incremento en el pH del sustrato y una disminución en la acumulación de Pb en la raíces, pero un aumento en la translocación de Pb a las hojas en ambas especies.

En el segundo experimento, los resultados también mostraron que *L. racemosa* tuvo la mayor capacidad de acumulación, translocación y tolerancia al Pb. La exposición al Pb causó un incremento en la concentración de prolina y en la capacidad antioxidante en tejidos de ambas especies. El aumento en la acumulación de prolina en respuesta al Pb fue mayor en *L. racemosa*, que mostró el mayor contenido antioxidante en los tejidos en ausencia de Pb, pero su aumento como respuesta al Pb fue menor que la respuesta de *A.*

---

---

*germinans*.

En ambos análisis observamos que *L. racemosa* podría ser un mejor candidato para posibles programas de remediación y restauración en áreas de manglar, ya que no solo puede acumular más Pb, sino que tiene más tolerancia al metal pesado y, en general, una mejor eficiencia de los indicadores de tolerancia analizados. Además, esta especie puede crecer en condiciones donde la disponibilidad del Pb puede ser alta.

---

---

## ABSTRACT

For several years, studies have been done in the coastal lagoons of Mexico that have demonstrated high levels of heavy metal contamination in mangroves, being lead (Pb) the most persistent. The environmental problems generated by the high toxicity of metals in these ecosystems has led us to investigate the accumulation and tolerance capacity of the plant species that occur in these sites, to obtain useful information for restoration purposes. However, when carrying out these studies, we realized that the toxicity of an element would not only depend on its concentration in the medium, but also, on its degree of availability, which is given by environmental conditions.

The general objective of this dissertation was to evaluate how different salt concentrations can affect the absorption, accumulation and translocation of Pb, in the mangrove species *Avicennia germinans* and *Laguncularia racemosa*, and if this causes changes in the pH of the substrate. In addition, we wanted to explore some of the mechanisms that these two species may have to tolerate Pb in their tissues, including proline accumulation and antioxidant capacity. The toxic effect of the metal on plant morphology and physiology, were also evaluated. In general, *A. germinans* and *L. racemosa* plants were grown under conditions with and without salinity for 6 months to be watered with different concentrations of Pb nitrate; Substrate and tissue samples were taken at different times for analysis.

In the first experiment, the more relevant results showed that, in the absence of salt, high accumulation of Pb occurred in *A. germinans* and mainly in *L. racemosa*. The presence of salt however, produced an increase in the substrate pH, and a decrease in the accumulation of Pb in the roots, but an increase in the translocation of Pb to the leaves in both species.

In the second experiment, results also showed that *L. racemosa* had the highest Pb accumulation, translocation and tolerance capacities. Exposure to Pb caused an increase in proline concentration and in antioxidant capacity in tissues from both species. The increase in proline accumulation in response to Pb was greater in *L. racemosa*, which showed the highest antioxidant tissue content in the absence of Pb, but its increase response to Pb was less than that response in *A. germinans*.

In both studies, we observed that *L. racemosa* could be a better candidate for possible remediation and restoration programs in mangrove areas, since it can not only accumulate

---

---

more Pb, but also has more tolerance to the metal and, in general, a better efficiency of the tolerance indicators analyzed. In addition, this species can grow under conditions where the availability of Pb can be high.

---

## INTRODUCCIÓN

Las lagunas costeras tienen una alta producción de materia orgánica que se debe en gran parte a la presencia de los manglares, que a su vez albergan una gran diversidad biológica (Yáñez-Arancibia y Lara-Domínguez, 1999). Los manglares son ecosistemas intermareales que se desarrollan principalmente en las regiones tropicales de todo el mundo con alrededor de 15.29 millones de hectáreas, donde se pueden encontrar cerca de 70 especies vegetales, arbóreas y arbustivas, que suelen ser exclusivas y son la base estructural de estos ecosistemas (Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2013).

Los ecosistemas de manglar, en México, representan el 5% del total mundial (775 555 hectáreas); nuestro país se ubica en el cuarto lugar de extensión de los 125 territorios que poseen este ecosistema (Valderrama-Landeros *et al.*, 2017). De las especies de manglar que se han descrito en todo el mundo, seis se encuentran en México; las especies predominantes son *Avicennia germinans* (L.), *Conocarpus erectus* (L.), *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn., y *Rhizophora mangle* (L.), mientras que *Avicennia bicolor* (Standl.) y *Rhizophora harrisonii* (Leechm.) solo se encuentran en pequeños manchones en las costas de Chiapas, Yucatán y Quintana Roo (SEMARNAT, 2006).

Lamentablemente, los asentamientos humanos han afectado considerablemente a los manglares debido a la deforestación, el cambio de uso de suelo, el desarrollo urbano, industrial, portuario y turístico. Esto tiene como consecuencia la contaminación del ambiente principalmente por el uso de combustibles fósiles, aumento de las descargas de aguas residuales, residuos sólidos, desechos industriales, uso de vehículos y escorrentías agrícolas (uso de fertilizantes inorgánicos y pesticidas) los cuales son fuentes de metales pesados (SEMARNAT, 2006).

De forma natural, el contenido de metales pesados está en función del material original y de los procesos edafogénicos; sin embargo, la actividad humana ha incrementado su concentración, hasta convertirlos en tóxicos (Larios, 2014). De esta forma, se pueden distinguir dos tipos de procedencias para los metales pesados, de origen natural y de origen antropogénico (García *et al.*, 2002).

En particular, los metales pesados son fundamentales para los organismos al ayudar en

sus funciones bioquímicas y fisiológicas. Esto es porque algunos son oligoelementos imprescindibles para el mantenimiento de los sistemas bioquímicos de los seres vivos como por ejemplo el cobre, el manganeso o el zinc. Por otro lado, estos elementos pueden llegar a ser tóxicos tanto para los organismos como para los ecosistemas, según su grado de exposición, la dosis absorbida y el estado químico del metal pesado (Fergusson, 1990; Al-Khashman, 2004).

Los metales pesados que son vertidos en las zonas costeras tienen una alta persistencia en el ambiente debido a que no pueden ser degradados de manera natural y tienden a acumularse en los tejidos de los seres vivos, afectando su funcionamiento y desarrollo (De la Cruz-Landero *et al.*, 2013). Dentro de los metales pesados perjudiciales destaca el plomo (Pb), un elemento que por su baja movilidad, puede mantenerse por más tiempo en el medio y biomagnificarse a través de todos los niveles de la cadena trófica (Diez, 2008), por lo que es considerado un elemento de alta toxicidad.

Las plantas son muy sensibles a suelos contaminados por metales pesados; sin embargo, diferentes especies vegetales tienen la capacidad de acumular contaminantes orgánicos e inorgánicos en sus tejidos, estos estudios han servido para proponer estrategias naturales que ayuden a la restauración de los suelos, comúnmente conocidas como fitorremediación (Delgadillo-López *et al.*, 2011). En la actualidad, la fitorremediación de metales pesados se ha centrado en la búsqueda de especies que no solo acumulen altas concentraciones de contaminantes (hiperacumulación), sino que puedan movilizarlos a los tejidos aéreos como un método más eficaz para eliminarlos del suelo o agua (Llugany *et al.*, 2007). Sin embargo, estas plantas, al ser representadas en su mayoría por especies herbáceas, presentan una escasa biomasa y un ciclo de vida corto por lo que suelen ser más efectivas en pequeñas áreas de restauración (Diez, 2008); además, estas especies suelen ser más vulnerables a los efectos tóxicos de los metales pesados (Monnet *et al.*, 2001, 2005; Fuentes *et al.*, 2014; Leal-Alvarado *et al.*, 2016).

En el caso de los bosques de manglar, donde la mayor parte de su estructura está conformada por especies arbóreas, las alternativas de fitorremediación deben tomar en cuenta que los árboles presentan un menor factor de bioacumulación y su eficiencia en la remediación es de mediano o largo plazo (Delgadillo-López *et al.*, 2011). No obstante, los árboles en el manglar podrían incrementar la cantidad de metales pesados totales extraídos

con base en su elevada producción de biomasa, además de que suelen presentar una mayor tolerancia al estrés y pueden disminuir la biomagnificación de la toxicidad en la cadena trófica al acumular gran parte de los contaminantes en las raíces (fitoestabilización) (Yang *et al.*, 2014).

Otro aspecto que debe tomarse en consideración en las técnicas de fitorremediación es la influencia de las condiciones ambientales en el comportamiento de los metales pesados, ya que las propiedades fisicoquímicas del suelo determinan en gran parte la movilidad, disponibilidad y toxicidad de estos metales pesados (Sauquillo *et al.*, 2003). Por la importancia socio-ecológica de los ecosistemas de manglar, su limitada distribución geográfica, y el aumento continuo de la contaminación, nos ha llevado a evaluar el comportamiento de los metales pesados, en especial el plomo, en las condiciones de estos sitios y la capacidad de respuesta de las especies para desarrollar e implementar respuestas ante el estrés. Con esto se pretende generar información novedosa que pueda ser integrada a los programas de restauración y conservación, y así contribuir a su mayor efectividad.

En el presente estudio se trabajó con las especies de manglar *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*, para evaluar la influencia de la salinidad en la disponibilidad y asimilación de Pb. Asimismo, valorar como la acumulación de Pb en los tejidos pueden producir toxicidad y cómo es la respuesta de algunos mecanismos implicados en la tolerancia al metal. Estas especies han sido estudiadas anteriormente y han demostrado ser capaces de acumular y tolerar al Pb, principalmente *L. racemosa*.



## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 Problemática de la contaminación por plomo en lagunas costeras de México

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza terrestre, se encuentran en las rocas, suelos, sedimentos, y las erupciones volcánicas; sin embargo, a partir de la revolución industrial y su emisión al ambiente, el efecto tóxico de estos elementos aumentó de manera considerable (García, 2006). La toxicidad de los metales pesados es directa sobre las células, a través del desplazamiento de iones esenciales de biomoléculas provocando el bloqueo de los grupos funcionales, la modificación de la conformación activa de biomoléculas (enzimas y polinucleótidos principalmente) o bien provocar la ruptura de las biomoléculas; los metales pesados también pueden generar la alteración de otros agentes biológicamente activos (Cuizano *et al.*, 2009). Por consiguiente esto resultará en un mal funcionamiento y crecimiento de los organismos.

Como ya se mencionó anteriormente, los metales pesados no pueden ser degradados por lo que una vez en el ambiente solo pueden distribuirse en el entorno cambiando su estado de oxidación o incorporándose en los seres vivos a lo largo de la cadena trófica, llegando a afectar al ser humano (Cuizano *et al.*, 2009).

En el ser humano, el Pb afecta el sistema nervioso, la producción de células sanguíneas, los riñones, la conducta y el sistema reproductivo, incluso puede pasar a través de la placenta afectando al feto. Entre los síntomas más comunes de la toxicidad por Pb esta la aparición de fatiga, dolores de cabeza, musculares y de estómago, anorexia, estreñimiento y, en su fase crítica, calambres abdominales intensos acompañados de náuseas, vómitos y presión arterial elevada (Corzo y Velásquez, 2014).

Las fuentes principales de contaminación por metales pesados se relacionan con la actividad petrolera (especialmente por derrames), a las actividades industriales y comerciales que se efectúan en los complejos portuarios y a la extracción minera (Páez-Osuna, 2005). De manera general, parte de esta contaminación también es atribuida a la agricultura mecanizada, a los desechos urbanos y a las emisiones vehiculares (Galán y Romero, 2008; Contreras *et al.*, 2009).

En México los ecosistemas costeros son impactados por los metales pesados, lo cual se debe en gran parte a los ríos que facilitan el transporte de los contaminantes, encontrando los casos más severos de contaminación en cuerpos de agua semicerrados como bahías, estuarios y lagunas (Vázquez-Botello *et al.*, 2004). Desde hace más de 30 años se han llevado a cabo estudios que han demostrado la presencia de metales pesados, como el Ni, As, Br, Cu, Zr, Fe, V, Hg, Y, Rb, Se, Co, Mn, Zn, Pb, Cd, Sr y Cr en sedimentos y aguas de las zonas costeras de México (Caso *et al.*, 2004; Botello *et al.*, 2005). La mayoría de estos reportes fueron descritos para los estados pertenecientes al Golfo de México, que es la zona con mayor contaminación, incluso se han detectado algunas zonas que deberían ser prioritarias para su conservación (aquellas cercanas a Laguna Verde y Río Coatzacoalcos en Veracruz, y diversas lagunas en Tabasco) (Tabla 1).

En el caso del Pacífico, también se han encontrado metales pesados a lo largo de la costa principalmente en Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Jalisco y en Guerrero y Oaxaca (Botello *et al.*, 2014). En todos los casos, el Pb ha sido uno de los metales pesados con mayor presencia ya que la mayoría de las zonas reportadas sobrepasan los límites máximos permisibles propuestos por las normas oficiales mexicanas (SEDUE, 1990; NOM-001-SEMARNAT-1996) (Tabla 1).

**Tabla 1.1** Concentraciones promedio de plomo total en sedimento ( $\mu\text{g g}$  peso seco) y agua ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en zonas costeras de México <sup>a</sup>

| Zonas de estudio*       | Sedimento       | Agua            | Referencias                        |
|-------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------------|
| <i>Tamaulipas</i>       |                 |                 |                                    |
| L. Marismas de Altamira | 4.3 - 46.5      | 1.4             | García, 2006                       |
| L. San Andrés           | 11.8            |                 | Vázquez <i>et al.</i> , 1990       |
|                         | 2.5 - 11.5      |                 | García, 2006                       |
| <i>Veracruz</i>         |                 |                 |                                    |
| L. Pueblo Viejo         |                 | 1.96 $\pm$ 1.38 | Villanueva y Botello, 1992         |
|                         |                 | 0.1 – 0.31      | Villanueva y Páez-Ozuna, 1996      |
|                         | 15.4 - 39.8     |                 | García, 2006                       |
| L. Tampamachoco         | 3.9 $\pm$ 3     | 0.05 $\pm$ 0.03 | Rosas <i>et al.</i> , 1983         |
|                         | 1.1 - 17.5      | 0.01 - 0.16     | Macías-Hernández, 2015             |
| L. Mandinga             | 3.34 $\pm$ 3.25 | 0.13 $\pm$ 0.36 | Rosas <i>et al.</i> , 1983         |
|                         | 29.6 $\pm$ 5.4  |                 | Guzmán <i>et al.</i> , 2005        |
|                         | 3 - 29.2        | 0.23 - 3.14     | Guzmán-García <i>et al.</i> , 2009 |

|  |   |  |   |
|--|---|--|---|
| L. Alvarado                              | 20.2 ± 14.8<br>29.9<br>27.5 ± 13.7<br>55.15 | 0.85                                       | Rosales <i>et al.</i> , 1986a<br>Vázquez <i>et al.</i> , 1990<br>Guzmán <i>et al.</i> , 2005<br>Vázquez-Botello <i>et al.</i> , 2004  |
| L. del Llano                             | 78.8  |  | Vázquez-Botello <i>et al.</i> , 2004  |
| L. Salada                                | 77.2  |  |   |
| L. de la Mancha                          | 81.2  |  |   |
| L. Sontecomapan                          | 18.84                                       |  |   |
| L. Tamiahua                              | 17.4 ± 15.9                                 |  | Guzmán <i>et al.</i> , 2005   |
| R. Papaloapan                            | 17.3 ± 30.2                                 |  | Rosales <i>et al.</i> , 1986b   |
| R. Blanco                                | 32.5 ± 8.1<br>5.8 – 267.4                   |  | Álvarez <i>et al.</i> , 1986<br>Villanueva y Páez-Ozuna, 1996   |
| R. Tuxpan                                | 0.28 - 40.7                                 | 0.01 - 0.89                                | Macías-Hernández, 2015  |
| R. Coatzacoalcos                         | 43.5 ± 17.1<br>43<br>39.71                  | 0.02±0.007<br>0.017 - 29.4<br>0.008–0.03   | Ochoa <i>et al.</i> , 1973<br>Botello y Páez-Osuna, 1986<br>Villanueva, 1987<br>Villanueva y Botello, 1992<br>Villanueva y Páez-Ozuna, 1996<br>Vázquez-Botello <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Tabasco</i>                           |   |  |   |
| L. del Carmen                            | 6.5 ± 5.2                                   | 0.043 ± 0.06<br>0.04 ± 0.08<br>0.43 ± 0.45 | Rosas <i>et al.</i> , 1983<br>Pérez-Zapata, 1981<br>Villanueva y Botello, 1992  |
| L. Ilusiones                             | 158.7 ± 93                                  |  | Valencia, 1989  |
| L. Machona                               | 33  | 0.1 ± 0.104                                | Pérez-Zapata, 1981<br>Vázquez-Botello <i>et al.</i> , 2004  |
| L. Mecoacán                              | 56  | 0.09 ± 0.09                                | Pérez-Zapata, 1981<br>Vázquez-Botello <i>et al.</i> , 2004  |
| L. Limón                                 | 68  |  | Vázquez-Botello <i>et al.</i> , 2004  |
| L. Santuario                             | 77  |  |   |
| L. Castarrical                           | 47  |  |   |
| L. Estancia vieja                        | 97  |  |   |
| L. El Yucateco                           | 117<br>122.1 - 32.15<br>(1996 - 2003)       |  | Vázquez-Botello <i>et al.</i> , 2004<br>Villanueva y Botello, 2005  |
| Pantanos de Centla                       | 25.8 – 77.2                                 |  | Pérez-Cruz <i>et al.</i> , 2013   |
| <i>Campeche</i>                          |   |  |   |
| L. de Términos                           | 23.1 – 33.9<br>34 ± 18.3<br>9 – 16          |  | Ponce-Velez y Botello, 1991<br>Villanueva y Botello, 1992<br>De la Cruz-Landero <i>et al.</i> , 2013  |
| <i>Yucatán</i>                           |   |  |   |
| Costa poniente                           | 10.9 - 28.5                                 |  | Medina <i>et al.</i> , 2004   |
| Costa central                            | 2.48 - 26.1                                 |  |   |
| Costa oriental                           | 17 - 27.1                                   |  |   |
| Cenotes (Xlakah, Timul, Yaa'x ek, Tekom) | 34, 9, 14 y 25                              |  | Pérez <i>et al.</i> , 2011  |

CAPÍTULO I

| <i>Oaxaca</i>                             |                               |  |  |
|---|-------------------------------|--|--|
| B. Salina Cruz                            | 5 - 123.7                     |  | González-Macías <i>et al.</i> , 2006                 |
| Huatulco                                  | 0.78 – 9.05<br>1.2 – 11.1     |  | Estrada-Vargas, 2008<br>Retama <i>et al.</i> , 2016  |
| <i>Guerrero</i>                           |                               |  |  |
| B. Playa Blanca                           |                               | 0.24 – 0.37  | Pérez-Moreno <i>et al.</i> , 2016                    |
| El Calvario                               |                               | 0.24 – 0.34  |  |
| Troncones                                 |                               | 0.24 – 0.36  |  |
| Acapulco L. Negra                         |                               | 0.67   | Dimas <i>et al.</i> , 2018                           |
| <i>Jalisco</i>                            |                               |  |  |
| L. Barra de Navidad                       | 0.37 – 1.86                   | 0.3 – 0.78   | Zaragoza-Araujo <i>et al.</i> , 2014                 |
| <i>Sonora</i>                             |                               |  |  |
| Puerto Peñasco                            | 25.5 ± 7.11                   |  | García-Rico <i>et al.</i> , 2004                     |
| Caborca                                   | 28.46 ± 11.3                  |  |  |
| Hermosillo                                | 33.87 ± 11.1                  |  |  |
| Guaymas                                   | 46.55 ± 9.67                  |  |  |
| B. Bacoichibampo                          |                               |  | García-Rico <i>et al.</i> , 2011                     |
| Boca                                      |                               | 0.045 ± 0.006  |  |
| Centro                                    |                               | 0.0492 ± 0.005   |  |
| Línea costera                             |                               | 0.0493 ± 0.007   |  |
| L. El Tóbari                              | 0.66 – 0.85                   |  | Jara-Marini <i>et al.</i> , 2013                     |
| Esteros Morúa, Santa Cruz y Santa Bárbara | 3.5 – 26.5                    | 0.0032 – 0.067   | García-Rico <i>et al.</i> , 2014                     |
| <i>Sinaloa</i>                            |                               |  |  |
| L. Chiricahueto                           | 10 – 75                       |  | Ruiz-Fernández <i>et al.</i> , 2009                  |
| L. Estero de Urias                        | 12 – 45                       |  |  |
| L. Ohuira                                 | 115 – 180                     |  |  |
| <i>Baja California</i>                    |                               |  |  |
| Playas de Rosarito                        | 2.2 – 63.5                    |  | Pastrana-Corral <i>et al.</i> , 2017                 |
| Ensenada                                  | 39.7 – 55                     |  | Cortes <i>et al.</i> , 2017                          |
| * Límite máximo permisible                | P.D: 0.4 - 10<br>P.M: 0.2 - 5 | P.D: 0.4 -1<br>P.M: 0.2-0.5<br>0.05 – 5<br>0.006 – 0.1 | NOM-001-SEMARNAT-1996<br>CE-CCA-001/89 (SEDUE, 1990) |

<sup>a</sup> Modificado de Cabañas-Mendoza (2014)

\* Laguna (L.), río (R.), bahía (B.), promedio diario (P.D), promedio mensual (P.M)

± Desviación estándar, min. – máx.

Los metales pesados una vez emitidos al ambiente pueden permanecer durante cientos de años, pero su biodisponibilidad dependerá de la interacción de una serie de factores bióticos y abióticos, por lo que su grado de toxicidad puede variar debido a las características del medio (Botello *et al.*, 1999). Países en desarrollo como México requieren de una creciente industrialización y urbanización; sin embargo, es indispensable un manejo adecuado de los

desechos, y una mejor administración de las zonas costeras, para disminuir y/o evitar la pérdida de estos ecosistemas y así conservar una fuente importante de recursos.

### **1.2 Factores ambientales que determinan la disponibilidad de metales pesados en los humedales**

De manera natural, los metales pesados se encuentran en bajas concentraciones (menor a 1 mg/kg); sin embargo, las actividades humanas liberan una gran cantidad de estos afectando a los ecosistemas. No obstante, la toxicidad de los metales pesados en el suelo no solo está relacionada con su concentración total sino también con su grado de disponibilidad (Galán y Romero, 2008).

La movilidad depende de la forma química y física en la que se encuentre el elemento en el ambiente, de las características fisicoquímicas del suelo (contenido de minerales y materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, pH, potencial redox, textura y permeabilidad), de la capacidad que presenten los organismos para absorberlo y de las condiciones ambientales (Sierra, 2005; Galán y Romero, 2008).

La inundación afecta las condiciones redox del sustrato, propiciando un ambiente más reducido que puede disminuir al mínimo la disponibilidad de los metales pesados (Cu y Zn); por el contrario, la oxidación de sustratos durante periodos más secos está asociada con un aumento en la disponibilidad de estos metales pesados y su acumulación en los organismos (Speelmans *et al.*, 2007).

La salinidad del suelo es otro factor que influye en la movilidad de los metales pesados. En algunos estudios se ha observado que la presencia de sales (3 y 5 mg L<sup>-1</sup>; 0.5, 2.5 y 5 NaCl g L<sup>-1</sup>) pueden causar la disolución de minerales permitiendo la liberación de los metales pesados asociados por intercambio catiónico (e.g. Cu, Zn, Pb, Cd) o formar complejos solubles con aniones como los cloruros, lo que puede aumentar la movilidad y disponibilidad para plantas y lombrices en humedales templados (Fritioff *et al.*, 2005; Du Laing *et al.*, 2008; Speelmans *et al.*, 2010). Por el contrario, también se ha demostrado que la salinidad (5 mg L<sup>-1</sup>) puede producir una menor concentración de Cu, Cd, Zn y Pb en los tejidos de plantas acuáticas, lo que puede deberse al aumento en la competencia con otros iones como el Na<sup>+</sup> por sitios de absorción en la membrana y en el interespacio de las paredes celulares (Fritioff *et al.*, 2005).

Por otro lado, Fritioff et al. (2005) encontraron que en plantas acuáticas como *Elodea canadensis* y *Potamogeton natans*, el incremento en la temperatura (5 a 20 °C), en la mayoría de los casos, aumenta la capacidad de acumulación de Cu, Zn, Cd y Pb; concluyendo que esto podría relacionarse con diversos factores como: a) al aumentar la temperatura aumenta la biomasa y, por lo tanto, el área de absorción de la planta, b) la concentración extracelular de metales pesados aumenta al incrementar la temperatura por cambios en el equilibrio entre los sitios de intercambio de la pared celular y el elemento en solución, c) a mayor temperatura cambia la composición lipídica de la membrana y su fluidez lo que facilita el transporte pasivo y activo del elemento a través de esta, d) al aumentar la temperatura incrementa el metabolismo y la síntesis de proteínas facilitando la absorción de metales pesados en sitios adicionales de captación de membranas o una mayor liberación de moléculas que ayudan a la captación de metal.

En el caso de ambientes inundables como en los manglares, las especies arbóreas presentan adaptaciones morfológicas en las raíces que les permiten sobrevivir a las condiciones anaerobias mediante la formación de aerénquima, lenticelas, raíces adventicias y deposición de suberina que impide la pérdida de oxígeno radial (ROL por sus siglas en inglés “Radial Oxygen Loss”) y permite su transporte hacia la rizósfera (Deng, 2005; Deng *et al.*, 2009). Estas barreras pueden servir como un mecanismo de defensa en las plantas contra los compuestos tóxicos que se acumulan en los suelos anaeróbios, regulando su entrada en las raíces (Cheng *et al.*, 2010 y 2015). La alta salinidad en el medio puede reducir la ROL mediante la estimulación de la lignificación dentro de la exodermis; por otro lado, la falta de nitrógeno en el medio reduce dicha lignificación; un estudio realizado en *Rhizophora stylosa* muestra que el aumento de la lignificación ayuda a retrasar la entrada y acumulación de Pb, Zn y Cu al disminuir la permeabilidad de la raíz, mientras que la reducción de la lignificación agrava la toxicidad de los metales pesados por el aumento de esta permeabilidad (Cheng *et al.*, 2012).

### **1.3 Las especies de manglar como indicadoras de contaminación por metales pesados**

La problemática ambiental que genera la alta toxicidad de los metales pesados y su incremento en las zonas costeras ha generado interés por diferentes grupos para investigar la capacidad de acumulación de las especies de manglar bajo diferentes niveles de

contaminación (Silva *et al.*, 1990; Lian *et al.*, 1999; Foroughbakhch *et al.*, 2004; MacFarlane *et al.*, 2007; Naranjo-Sánchez y Troncoso-Olivo, 2008; Nirmal Kumar *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Gabriel y Salmo III, 2014; He *et al.*, 2014; Paz-Alberto *et al.*, 2014; Ochoa *et al.*, 2016). En sitios donde la permanencia de los metales pesados es alta, se ha observado una mayor retención de contaminantes en los tejidos de las especies vegetales (Campos y Gallo, 1997; Ong Che, 1999; Villamil, 2010); también se han identificado algunas especies que podrían ser consideradas como hiperacumuladoras de Cd, Cu y Cr (Campos y Gallo, 1997; González-Mendoza *et al.*, 2007a; Villamil, 2010).

Sin embargo es necesario generar más información sobre los efectos que los metales pesados pueden provocar en el comportamiento y funcionamiento de los bosques de manglar con el fin de evaluar una posible capacidad de defensa y tolerancia a la toxicidad. La mayoría de estudios relacionados fueron reportados para especies de manglar localizadas en Vietnam, Australia y China (MacFarlane y Burchett, 2002; MacFarlane, 2002; MacFarlane, 2003; Yan *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2017); en México la información que se ha generado se centra generalmente en *A. germinans* (González-Mendoza *et al.*, 2007a, 2007b, 2013).

En el caso particular de México, Cabañas-Mendoza (2014) encontró que *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa* y *Rhizophora mangle* fueron capaces de acumular Pb en sus tejidos principalmente en las raíces (fitoestabilización), siendo más evidente en *A. germinans* y *L. racemosa*. El Pb, en altas concentraciones y en periodos de exposición prolongados, disminuyó la eficiencia máxima del fotosistema II, la tasa fotosintética, el contenido de clorofila *b*, aumentó la fuga de electrolitos de la membrana y causó un mayor daño físico en las hojas; por otro lado, también se observó aumento en la concentración de carotenoides como un posible mecanismo de tolerancia. *L. racemosa* fue la especie con mayor tolerancia a la exposición por Pb, mientras que *R. mangle* mostró la menor eficiencia al presentar el mayor daño físico, un efecto negativo en la mayoría de los parámetros y la menor capacidad para acumular Pb.

#### **1.4 Respuesta de las plantas a la exposición por metales pesados**

Algunas plantas han desarrollado mecanismos que les permiten crecer y establecerse en ambientes con una alta concentración de contaminantes y han demostrado tener la

capacidad de tolerar sus efectos tóxicos. En el caso de los metales pesados, los mecanismos de defensa de las plantas pueden ser externos, los cuales se basan principalmente en impedir la entrada de metales pesados a las células mediante la formación de barreras físicas, como la formación de placas de hierro y la lignificación y suberización de la raíz; por otro lado, la liberación de compuestos de bajo peso molecular por las raíces (ácidos orgánicos y aminoácidos) o la asociación de las plantas con microorganismos los cuales pueden precipitar a los metales pesados. Estos mecanismos de defensa suelen depender de las condiciones de la rizósfera (Alvarado *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2013; Tripathi *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2015).

Cuando la presencia de metales pesados es mayor y se acumulan en los tejidos, se activan diferentes mecanismos internos (tolerancia) que requieren de procesos especializados que actúan a distintos niveles de organización (Vinocur y Altman, 2005). La quelación es uno de los mecanismos más importantes, en el cual las plantas pueden integrar metales pesados en su citoplasma por medio de transportadores de membrana. Una vez adentro los detoxifican al unirlos con ligandos como las fitoquelatinas, metalotioneinas o con proteínas aglutinantes de metales pesados (Gupta *et al.*, 2013). También se pueden detoxificar afuera de la célula usando exudados como proteínas y ácidos orgánicos (Hall, 2002; Xie *et al.*, 2015). Los compuestos de alta afinidad como las fitoquelatinas y las metalotioneinas son formados por cisteína y glutatión que se unen a los metales pesados formando complejos no tóxicos que son transportados principalmente a las vacuolas (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). En diferentes especies vegetales, incluyendo manglares, se ha registrado un aumento en la biosíntesis del glutatión, en la actividad enzimática de la glutatión sintetasa y en la expresión de genes que codifican para las enzimas biocinéticas de estos compuestos cuando se han expuesto a diferentes concentraciones de Cd, Zn, Cu, Pb y Hg (Huang *et al.*, 2011 y 2012; Estrella-Gómez *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Los metales pesados pueden producir un alto estrés oxidativo debido a que generan un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y del radical hidroxilo que causan la peroxidación de lípidos, así como la inactivación de enzimas y la degradación de proteínas (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008; Song *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Para disminuir el estrés oxidativo, los tejidos de las plantas aumentan su actividad

antioxidante ayudando a estabilizar y eliminar a los radicales libres mediante la síntesis de enzimas como catalasas, peroxidasas o superóxido dismutasa (Feng-Qin *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2012; Yan y Tam, 2013); no obstante, esta actividad puede no ser enzimática participando algunas vitaminas, flavonoides, aminoácidos (prolina), carotenoides y péptidos como el glutatión (González–Mendoza y Zapata–Pérez, 2008; Peralta–Pérez y Volke–Sepúlveda, 2012).

## JUSTIFICACIÓN

Los diagnósticos ambientales que se han llevado a cabo en las lagunas costeras de México han demostrado que actualmente existe una gran problemática de contaminación por metales pesados principalmente en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Campeche, donde se han reportado concentraciones arriba de lo permitido por las normas oficiales (valores de hasta 267 µg/g en suelo y 5 mg/L en agua). Dentro de los ecosistemas costeros, en el manglar es donde se ha encontrado la mayor concentración de estos contaminantes, siendo el plomo uno de los más abundantes. Esto ha generado interés por identificar la eficiencia de las especies arbóreas de los bosques de manglar para la descontaminación del suelo.

Desde un enfoque ecológico, no solo es importante determinar el grado en que las plantas retienen los metales pesados en sus tejidos, sino también como influye su toxicidad y su acumulación en la supervivencia de los individuos. Por lo tanto, es necesario estudiar la respuesta al estrés que pueden presentar las especies, así como las variables microambientales que influyen en la disponibilidad de los metales pesados.

Debemos recordar que los metales pesados no pueden eliminarse completamente del ambiente debido a su propiedad no biodegradable, por lo que el estudio de especies acumuladoras, tolerantes o estabilizadoras de metales pesados podría ayudarnos a entender su importancia al incorporarse en los tejidos de las plantas y de esta forma aumentar las posibilidades de supervivencia de la vegetación en zonas contaminadas por metales pesados. Se ha demostrado que *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* son eficientes en la acumulación de Pb y que *L. racemosa* presenta una mayor tolerancia a la toxicidad (Cabañas-Mendoza, 2014); por lo tanto, estas especies deben ser estudiadas en diferentes condiciones ambientales para aumentar la información sobre el potencial para

remediación en sitios contaminados por Pb.

### **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

- a) ¿Cómo influye el grado de la salinidad en la acumulación de Pb en los tejidos de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* y en el pH del sustrato bajo estas condiciones?
- b) ¿En qué grado la acumulación del Pb en los tejidos de *A. germinans* y *L. racemosa* influye en la acumulación de prolina y capacidad antioxidante como respuesta al estrés abiótico?
- c) ¿Cuál de las dos especies podría ser más eficiente en la acumulación y tolerancia al Pb y en qué condiciones ambientales?

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la salinidad en el sustrato sobre la acumulación de plomo en los tejidos de dos especies de bosques de manglar (*Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*), y si la exposición al Pb produce cambios en su concentración de prolina y en su capacidad antioxidante.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **Capítulo II**

- Evaluar la influencia de la salinidad sobre la asimilación del Pb en los tejidos de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*, así como su relación con un cambio en el pH del sustrato.
- Comparar la eficiencia de acumulación y translocación de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*.

#### **Capítulo III**

- Evaluar la variación de la concentración de prolina en raíz, tallo y hoja de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* como respuesta de la acumulación de Pb en los tejidos.

- Evaluar la variación de la capacidad antioxidante, por captación de radicales libres y por poder reductor del  $\text{Fe}^{+3}$ , en raíz, tallo y hoja de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* como respuesta a la acumulación de Pb en los tejidos.
- Comparar la eficiencia de acumulación y tolerancia al plomo, así como el potencial para la detoxificación de Pb, de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*.

## HIPÓTESIS

### Capítulo II

- Conforme aumente la concentración de sal de mar en el sustrato, la disponibilidad del Pb será menor y por ende habrá una disminución en su acumulación en la raíz de las plantas. Esta disminución en la acumulación del Pb será más evidente a mayor tratamiento con plomo y a mayor tiempo de exposición.
- Un aumento de la salinidad podría causar un aumento en el pH del sustrato, haciendo menos disponible al Pb.

### Capítulo III

- Para *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*, la concentración de prolina y la actividad antioxidante aumentará conforme aumente la concentración de plomo en los tejidos.
- *Laguncularia racemosa* tendrá mayor potencial de respuesta fisiológica a la exposición por Pb, principalmente en la actividad antioxidante, bajo las condiciones estudiadas.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se colectaron de forma individual alrededor de 400 propágulos de *A. germinans* y *L. racemosa* en la Reserva de la Biosfera Ría Celestún, Yucatán, los propágulos se colocaron en bolsas con arena y agrolita, dentro de cajas de plástico cerradas que se mantuvieron en un invernadero bajo condiciones controladas de temperatura, agua y nutrientes (20 a 27 °C, humedad relativa de 55 a 84%, densidad de fotones diaria de 5.4 mol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, fertilizante Miracle-Gro1 g L<sup>-1</sup>). Todas las especificaciones y equipos utilizados durante los experimentos se muestran en el esquema de la figura 1.

El trabajo experimental consistió en dos etapas, en la primera parte plántulas de cuatro meses de edad se aclimataron y crecieron bajo 0, 7 y 15 mg L<sup>-1</sup> de sal de mar por un periodo de dos meses para después ser regadas con 1.5 litros de agua desionizada diluida con diferentes concentraciones de nitrato de plomo (0, 40, 80 y 160 µM). Se tomaron muestras de raíz, tallo y hoja a los 0, 2, 7, 15 y 30 días para la evaluación de Pb y los parámetros de crecimiento (altura total, peso fresco y seco total). Durante todas las etapas experimentales, se colectaron muestras de sustrato para la evaluación de la conductividad eléctrica y el pH mediante medidores portátiles.

La segunda etapa se llevó a cabo con plantas de seis meses de edad que fueron regadas con 1.5 litros de agua desionizada diluida con 0, 75, 150 y 300 µM de nitrato de plomo. Se hizo la evaluación de la asimilación de CO<sub>2</sub> en las hojas de ambas especies durante un mes de exposición al Pb, así mismo se colectaron muestras de la raíz, del tallo y de las hojas en diferentes días para la evaluación de los parámetros de crecimiento, cuantificación de plomo, prolina y actividad antioxidante.

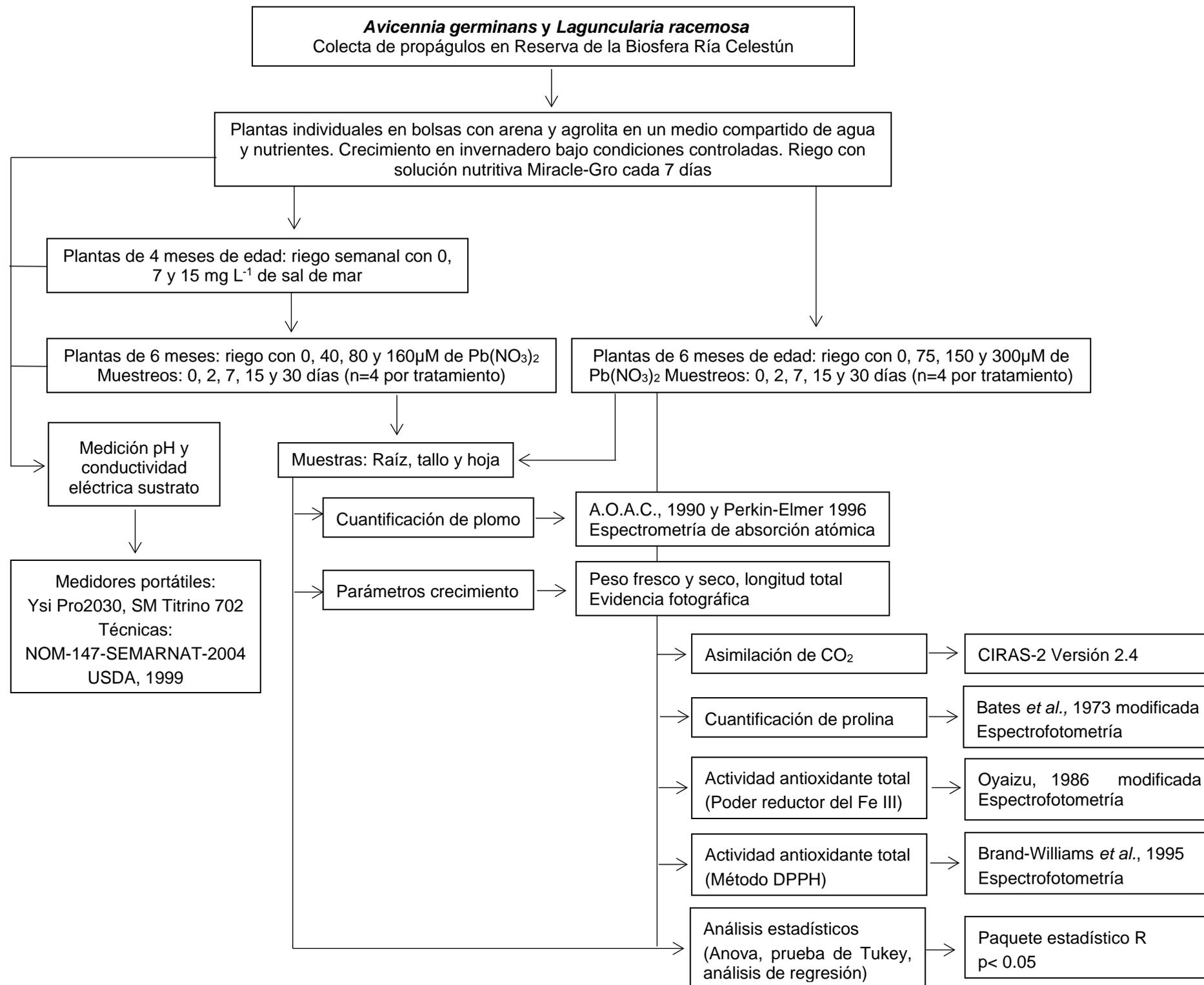


Figura 1.1 Esquema general de la estrategia experimental



## CAPÍTULO II

Publicado como:

Cabañas-Mendoza, M. R., Santamaría, M. J., Sauri-Duch, E., Escobedo-GraciaMedrano, R. M. & Andrade, J. L. (2020). Salinity affects pH and lead availability in two mangrove plant species. *Environmental Research Communications*, 2 (6), 1-14.

### **SALINITY AFFECTS pH AND LEAD AVAILABILITY IN TWO MANGROVE PLANT SPECIES**

#### **ABSTRACT**

Some tropical coastal areas that include mangroves are highly polluted by heavy metals, where lead (Pb) is prevalent. Few studies document how environment affects soil physicochemical characteristics and the availability of heavy metals. This study evaluated how different salt concentrations influenced the accumulation of Pb in plants of *Avicennia germinans* and *Laguncularia racemosa* and how salinity modified the substrate pH. Under unsalted conditions, Pb accumulation occurred continuously, mainly in *L. racemosa*, which was more tolerant to its toxic effects. Salt led to a decreased Pb uptake by the roots and an increase in the substrate pH. In addition, salinity also caused an increase in the translocation of Pb to the leaves. Because *L. racemosa* was tolerant to Pb, this species could be a better candidate for possible remediation and restoration programs in mangrove areas.

**Keywords:** *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa*, lead accumulation, mangrove forests, phytoremediation.

### INTRODUCTION

Industrial, agricultural and mining activity, in addition to the rise of solid waste and oil spills, have considerably increased the environmental contamination by heavy metals (Du Laing *et al.*, 2009; He *et al.*, 2014). Moreover, because these pollutants cannot be chemically or biologically degraded, they become highly toxic when they accumulate in soil and water, causing poor development and death in living organisms (Páez-Osuna, 2005).

Additionally, toxicity of heavy metals depends not only on their concentration but also on their degree of availability, which is determined by the chemical forms in which these elements are found. The speciation of metals depends on changes in the physicochemical parameters of soil and water such as pH, cation exchange capacity, organic matter content, redox conditions, dissolved oxygen concentrations, and lack or excess of nutrients, among others. At the same time, these parameters are influenced by environmental conditions such as hydroperiod, salinity, and temperature (Riba *et al.*, 2003; Du Laing *et al.*, 2009).

Metals with electropositive charges are attracted to surfaces with negative charges given by organic matter or clay, which determines the cation exchange capacity (CEC). A high CEC increases the retention of metal cations in the soil, reducing their metal mobility and availability (Du Laing *et al.*, 2009). In addition, pH is an important factor in the availability of metals in the soil. For instance, in acidic soils, where there is a greater release of hydrogen ions ( $H^+$ ), the competition of the metal cations with these  $H^+$  can cause the desorption of the metals, which increases their concentration and solubility in the soil solution and their possible absorption by the plant roots (García *et al.*, 2002).

In the soil, the fate of heavy metals is given by processes of adsorption/desorption, precipitation/dissolution, and reincorporation/mineralization, as well as by transport of solutes and extraction by plants (He *et al.*, 2005). In saline environments, the concentration of other cations that compete with metal ions for sorption sites increases and metals can then form complexes of high stability and solubility with chloride. Therefore, CEC decreases and metals increase their mobility in the soil. Conversely, metals can also form complexes with other anions (e.g. sulfur), which causes low mobility and availability (Leonard *et al.*, 2011). However, the higher the salinity, the more alkaline the soil pH becomes, generating lower metal availability because they precipitate as insoluble hydroxides (Alloway, 1995).

Salinity can affect metal ion absorption and transport to the roots. This is because  $\text{Na}^+$  can be absorbed through different channels that compete against other ions (e.g.  $\text{K}^+$ ) for entrance to cells. Conversely, internal transport of heavy metals is more limited and specific, so when competing for entrance to the same channel these are absorbed in lower concentration. This entrance is also influenced by the properties of transport and the concentration of ions in the soil (Li *et al.*, 2012; Mei *et al.*, 2014).

In Mexico, for several decades, the coast of the Gulf of Mexico has been the most impacted by heavy metals, where Pb has a major presence, in the range from 0.28 to 267  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight of sediment (Villanueva and Botello, 1992; Villanueva and Páez-Osuna, 1996; Botello *et al.*, 1999; Medina *et al.*, 2004; García, 2006; Páez-Osuna and Osuna-Martínez, 2011; Vázquez *et al.*, 2012; De la Cruz-Landero *et al.*, 2013; López 2015). Within these zones are mangroves, which are considered the most productive and diverse natural wetland systems (Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2013). However, few studies exist on the effect of these metal pollutants on mangrove species, despite that this coastal ecosystem helps to mitigate erosion and stabilize the coast by buffering floods and hurricanes, among other ecosystem services (Ezcurra *et al.*, 2009).

Mangrove tree species can accumulate various metals, mainly in their roots (Pulford and Watson, 2003; MacFarlane *et al.*, 2007; He *et al.*, 2014; Gabriel and Salmo III, 2014; Ochoa *et al.*, 2016). However, the influence of environmental conditions on the accumulation capacity of metals for plant species has been marginally studied (Riba *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2012). A previous study shows that plants of *Avicennia germinans* and *Laguncularia racemosa* have a greater capacity for accumulation and tolerance to lead than *Rhizophora mangle* under low salinity (Cabañas-Mendoza, 2014).

Plants of *A. germinans* and *L. racemosa* can grow in a large spectrum of salinities, ranging from 0 to 100 ‰ and 0 to 90 ‰, respectively (Wang *et al.*, 2011). In addition, these species have specialized structures in the leaves such as glands (*A. germinans*) or small protuberances on the petioles (*L. racemosa*) to excrete saline solution, which, when water evaporates, forms crystals on the leaf surface that are wind-dispersed (Sobrado, 2001 and 2004; Francisco *et al.*, 2009, Esteban *et al.*, 2013). Moreover, leaves accumulate salt as a function of the increase of salinity in the soil (Sobrado and Greaves, 2000; Sobrado, 2004) and, at maturity, they could accumulate salt even in the last stage before their abscission

(Cram *et al.*, 2002).

The aim of this study was to evaluate how different salinity gradients can cause a change in the pH of the substrate and affect the accumulation of lead in the species *A. germinans* and *L. racemosa*. The information obtained can be used as a basis to understand some of the factors that regulate the mobility of heavy metals in saline conditions, such as those where mangroves grow, and identify the responses of the species to lead contamination.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Plant material and growth conditions**

Black (*Avicennia germinans*) and white (*Laguncularia racemosa*) mangrove propagules (about 400 of each species) were collected in the Ria Celestun Biosphere Reserve (the points of collection were 20.857874, -90.383454, and 20.856782, -90.376828; Supplementary Figure 1). This is a pristine preserve in Yucatan, Mexico, and our group has been working there for about 10 years and has the required collection permits. Propagules were transported in plastic bags with water from the lagoon to a greenhouse. From the pool of propagules, we selected 240 individuals per species, washed them with distilled water, and placed them individually in black plastic bags (20x10cm) with silica sand 20/30 and agrolite (1:1). Bags with plants were then set into plastic boxes, so they had a shared medium of water and nutrients. Boxes were located in a greenhouse under an average temperature of 20 °C at night and 27 °C during the day, an average relative humidity ranging from 55% to 84%, and an average total daily photon flux density of 5.4 mol m<sup>-2</sup>. The photon flux density was measured with a light meter (Photosynthetic Light PAR, Smart Sensor, S-LIA-M003, Onset, EEUU), air temperature and relative humidity with a Temp Smart Sensor (S-TMB-M003, Onset). All variables were recorded simultaneously every 10 s and 10-min averages were stored with a data acquisition system (HOBO U30-NRC Weather Station Starter Kit, Onset). Plants received water weekly with the commercial fertilizer Miracle-Gro (1 g L<sup>-1</sup>, 200 ml of solution per plant).

### **2.2 Acclimatization of plants to salinity**

After 4 months, plants were randomly assigned to different saline treatments, with salt concentrations similar to those where species commonly grow under natural conditions.

Each week, 80 plants of each species were watered with 0, 7 and 15 mg L<sup>-1</sup> of commercial sea salt, during a period of two months; simultaneously, plants were irrigated with commercial fertilizer (Miracle-Gro; 1 g L<sup>-1</sup>, 200 ml of solution per plant).

### **2.3 Lead treatments**

After the 2-month period, individual plants were assigned to lead treatments within each salt treatment. For each salt treatment, 20 individuals of each species were irrigated with deionized water prepared with 0, 40, 80 and 160 µM of Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. During the experiment, plant leaves were fertilized weekly with a nutritive commercial solution (Miracle-Gro; 1 g L<sup>-1</sup>).

### **2.4 Concentration of lead in tissues**

Root, stem and leaf samples were taken at 0, 2, 7, 15 and 30 days after exposure for the Pb quantification (n=4). Samples were rinsed with distilled water to remove the external metal; only leaves of plants that were grown under salinity conditions were not washed to avoid the loss of the salt crystals. The complete tissue or, when appropriate, one gram of dry tissue was placed in crucibles inside a muffle furnace at 600 °C until obtaining white ash.

This ash was then diluted in 4 mL of 3M hydrochloric acid; each sample was adjusted to 6 mL with 1% nitric acid v/v (A.O.A.C. 1990, Perkin-Elmer 1996) to finally be centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes. All samples were measured in an atomic absorption spectrometer (model 55 AA, Agilent Technologies, EE. UU.), using a wavelength of 217 nm and a calibration curve of 0, 1, 5, 25, 50 and 100 ppm of PbNO<sub>3</sub>. Results were expressed based on 1 gram of dry weight; for the concentration of Pb in the plant, the total dry weight of each tissue was used.

### **2.5 Growth parameters**

After exposure to Pb and for both species, fresh weight, dry weight, and total length of individuals from all treatment were obtained at 0, 2, 7, 15 and 30 days. Total plant length was measured with a measuring tape from the tip of the longest root to the highest leaf, which was generally above the apical meristem of the stem. Total fresh weight was obtained with an analytical balance; subsequently, tissues were placed in a tumble dryer at 50 °C for

3 days to obtain the total dry weight. During the period of exposure to Pb, photographic evidence was also taken to register any physical change in the plants.

### 2.6 Physicochemical parameters

Samples of substrate of each plant were taken at a depth of approximately 5 to 7 cm procuring the area of greatest interaction with the roots; substrate was then dried at room temperature before measurements. Electrical conductivity and pH were measured according to the methodologies proposed by USDA (1999) and by NOM-147-SEMARNAT / SSA1-2004 with some modifications. Fifty grams of substrate were placed into a beaker, 50 ml of distilled water were added and solution was stirred for 5 minutes; samples were then allowed to stand for one minute for the sedimentation of solids and supernatant was placed in plastic tubes for measurement. Parameter measurements were made using the Ysi Pro model 2030 (Professional Series, YSI Incorporated, EE. UU.) with the sensor calibrated for conductivity with a 10,000

□S/cm calibration

calibrated with pH solutions of 7 and 4. Measurements were made every 7 or 15 days, before and during the salt acclimation and at 0, 7, 15 and 30 days during lead treatment.

### 2.7 Statistical analysis

Factorial analyses of variance were carried out to compare the means across the factors Pb treatment, salinity treatment, time of exposure, and tissue of each species for the response variables Pb tissue concentration, total fresh weight, total dry weight, total plant length, and substrate pH. Tukey comparison tests were performed to identify treatment differences. In addition, simple linear regression analyses were applied to explore the relationship between soil physicochemical parameters as well as the relationship of Pb concentration with the other variables analyzed. All analyses were determined at a confidence level of 95% ( $p < 0.05$ ) using the statistical package R version 3.5.1 for Windows.

## RESULTS

### 2.1 Concentration of lead in tissues

Tissues of *L. racemosa* had the highest Pb concentrations in all salt treatment, compared to tissues of *A. germinans* ( $p < 0.05$ ; Tables 1-3, Table S1). For both species, roots were the

tissues that accumulated the highest Pb concentrations.

**Table 2.1** Concentration of endogenous lead ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) found in plants exposed to different concentrations of lead, grown in the absence of salt ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ) during a 30-day exposure period. Data are means  $\pm$  standard error

|      |                | <i>Avicennia germinans</i> <b>A</b> |                   |                    | <i>Laguncularia racemosa</i> <b>B</b> |                    |                    |
|------|----------------|-------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------|
|      |                | 40 $\mu\text{M}$                    | 80 $\mu\text{M}$  | 160 $\mu\text{M}$  | 40 $\mu\text{M}$                      | 80 $\mu\text{M}$   | 160 $\mu\text{M}$  |
| Root | 2 <b>A A</b>   | 8.14 $\pm$ 1 a                      | 26.9 $\pm$ 4.4 a  | 58.7 $\pm$ 8.3 b   | 42.8 $\pm$ 9.3 a                      | 63.5 $\pm$ 12.4 a  | 155.9 $\pm$ 26 b   |
|      | 7 <b>AB AB</b> | 17.5 $\pm$ 1.8 a                    | 63.2 $\pm$ 5 b    | 89.1 $\pm$ 5.5 c   | 48.2 $\pm$ 11.9 a                     | 138.1 $\pm$ 20.3 b | 293.5 $\pm$ 21.2 c |
|      | 15 <b>B AB</b> | 40.2 $\pm$ 7.6 a                    | 72.8 $\pm$ 10.1 a | 172.8 $\pm$ 13.8 b | 58.9 $\pm$ 14.5 a                     | 226.9 $\pm$ 17.2 b | 336.4 $\pm$ 8.5 c  |
|      | 30 <b>B B</b>  | 44.9 $\pm$ 10 a                     | 78 $\pm$ 7.8 a    | 206.1 $\pm$ 17 b   | 61.5 $\pm$ 12.2 a                     | 331.9 $\pm$ 20.7 b | 488.2 $\pm$ 24.2 c |
| Stem | 2 <b>A A</b>   | 5.8 $\pm$ 1.3 a                     | 11.8 $\pm$ 2.4 ab | 12.6 $\pm$ 1.2 b   | 13.9 $\pm$ 4.1 a                      | 14.8 $\pm$ 5.2 a   | 17.5 $\pm$ 1.6 a   |
|      | 7 <b>A A</b>   | 10.8 $\pm$ 1.4 a                    | 12.5 $\pm$ 2.5 a  | 7.9 $\pm$ 0.9 a    | 16.3 $\pm$ 9 a                        | 18.1 $\pm$ 1.6 a   | 20.7 $\pm$ 4.4 a   |
|      | 15 <b>A A</b>  | 10.5 $\pm$ 1.5 a                    | 11.1 $\pm$ 2.5 a  | 13.7 $\pm$ 2.5 a   | 17.4 $\pm$ 3.3 a                      | 19.1 $\pm$ 2.5 a   | 22.5 $\pm$ 5.4 a   |
|      | 30 <b>A A</b>  | 10.2 $\pm$ 1.5 a                    | 11.9 $\pm$ 1.4 a  | 14.2 $\pm$ 2.2 a   | 20.6 $\pm$ 3.5 a                      | 20.1 $\pm$ 3.3 a   | 23 $\pm$ 2.7 a     |
| Leaf | 2 <b>A A</b>   | 11.6 $\pm$ 1 a                      | 12.1 $\pm$ 0.4 a  | 12.2 $\pm$ 0.4 a   | 10 $\pm$ 1.5 a                        | 10.4 $\pm$ 1.1 a   | 12.5 $\pm$ 3.4 a   |
|      | 7 <b>A AB</b>  | 10.4 $\pm$ 1 a                      | 12.5 $\pm$ 0.7 a  | 12.3 $\pm$ 1.4 a   | 12.3 $\pm$ 3 a                        | 18 $\pm$ 3.4 a     | 21.2 $\pm$ 4.2 a   |
|      | 15 <b>A AB</b> | 12.6 $\pm$ 0.6 a                    | 12.9 $\pm$ 3.4 a  | 15.6 $\pm$ 4 a     | 14.7 $\pm$ 3.3 a                      | 20.9 $\pm$ 6.7 a   | 21 $\pm$ 4.5 a     |
|      | 30 <b>A B</b>  | 12.8 $\pm$ 1 a                      | 14.1 $\pm$ 1.5 ab | 18.5 $\pm$ 1.6 b   | 14.7 $\pm$ 1.5 a                      | 22.7 $\pm$ 5.3 ab  | 29 $\pm$ 3.1 b     |

Different lowercase letters indicate significant differences among Pb treatments (columns) for each day of exposure, for each tissue and for each species (n=12). Different capital letters indicate significant differences for comparisons among tissue/species (bold, n=288), and among exposure days (rows) for each tissue and for each species (roman for *A. germinans* and italicized for *L. racemosa*, n=48).

In the absence of salt (Table 1), in both *A. germinans* and *L. racemosa* Pb uptake by the roots increased significantly with time, as the Pb concentration in the substrate increased. Lead translocated to the leaf was accumulated in proportions similar to those found in the stem, but leaf showed significant increases and the highest Pb concentration at the end of the experiment in both species.

Salinity significantly affected the Pb uptake capacity of both species. Accumulation of Pb by roots decreased and translocation of Pb to the leaves increased (highest values in *A. germinans* at  $7 \text{ mg L}^{-1}$  of salt and in *L. racemosa* at  $15 \text{ mg L}^{-1}$  of salt); the translocation to

the stem was similar in all treatments (Tables 2 and 3). During the first 15 days, the Pb concentration in the roots for plants of *A. germinans* and *L. racemosa* growing under 7 mg L<sup>-1</sup> of salt increased as Pb concentration in the medium increased (Table 2); however, at the end of the experiment the tissue concentration was maintained or even decreased. For both species, the translocation of Pb to the stem was similar among the different treatments and days of exposure. The Pb accumulation in leaves for *A. germinans* was significantly greater as the time of exposure passed, but it was similar among Pb treatments. At the end of the experiment, in *L. racemosa* the leaf Pb concentration values increased significantly.

**Table 2.2** Concentration of endogenous lead ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) found in plants exposed to different concentrations of lead, grown under 7 mg L<sup>-1</sup> of salt during a 30-day exposure period. Data are means  $\pm$  standard error.

|      |                 | <i>Avicennia germinans</i> <b>A</b> |                  |                   | <i>Laguncularia racemosa</i> <b>B</b> |                    |                   |
|------|-----------------|-------------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------------|-------------------|
| Day  |                 | 40 $\mu\text{M}$                    | 80 $\mu\text{M}$ | 160 $\mu\text{M}$ | 40 $\mu\text{M}$                      | 80 $\mu\text{M}$   | 160 $\mu\text{M}$ |
| Root | 2 <b>A A</b>    | 12 $\pm$ 3.3 a                      | 15.5 $\pm$ 2.9 a | 35.6 $\pm$ 7 b    | 12.3 $\pm$ 0.9 a                      | 24.3 $\pm$ 6.4 a   | 48.8 $\pm$ 8 b    |
|      | 7 <b>AB A</b>   | 24.7 $\pm$ 0.5 a                    | 27.4 $\pm$ 1 a   | 38.7 $\pm$ 4.6 b  | 22.8 $\pm$ 1 a                        | 35.7 $\pm$ 8 a     | 65.1 $\pm$ 8.9 b  |
|      | 15 <b>B A</b>   | 29 $\pm$ 6.6 a                      | 31 $\pm$ 1.7 a   | 49.3 $\pm$ 8.2 a  | 24.9 $\pm$ 2.4 a                      | 50.7 $\pm$ 16.5 ab | 65.2 $\pm$ 7.5 b  |
|      | 30 <b>A A</b>   | 12.3 $\pm$ 4.4 a                    | 22 $\pm$ 3.7 ab  | 28 $\pm$ 3.8 b    | 29.4 $\pm$ 3.7 b                      | 51.3 $\pm$ 8.4 a   | 50.5 $\pm$ 4.8 a  |
| Stem | 2 <b>A A</b>    | 6.2 $\pm$ 1 a                       | 10.5 $\pm$ 2.5 a | 11.6 $\pm$ 4.4 a  | 8.8 $\pm$ 1.3 a                       | 9.7 $\pm$ 1.2 a    | 11.9 $\pm$ 2.8 a  |
|      | 7 <b>A AB</b>   | 11.5 $\pm$ 3.1 a                    | 11.9 $\pm$ 1.9 a | 12.1 $\pm$ 2.7 a  | 15.9 $\pm$ 3.5 a                      | 16.8 $\pm$ 3.2 a   | 18.3 $\pm$ 6.5 a  |
|      | 15 <b>A B</b>   | 11.8 $\pm$ 2.2 a                    | 12.5 $\pm$ 1.8 a | 17.4 $\pm$ 4.8 a  | 18.1 $\pm$ 2 a                        | 18.7 $\pm$ 5 a     | 19.7 $\pm$ 4.6 a  |
|      | 30 <b>A B</b>   | 6.9 $\pm$ 0.8 a                     | 16.2 $\pm$ 3 a   | 19.1 $\pm$ 6.5 a  | 19.4 $\pm$ 3.7 a                      | 19.9 $\pm$ 2.1 a   | 22.8 $\pm$ 3.4 a  |
| Leaf | 2 <b>A A</b>    | 8.6 $\pm$ 0.7 a                     | 13.3 $\pm$ 2.9 a | 13.8 $\pm$ 1.6 a  | 10.3 $\pm$ 1.7 a                      | 12.5 $\pm$ 2.1 a   | 16.1 $\pm$ 0.6 a  |
|      | 7 <b>AB AB</b>  | 16.9 $\pm$ 4.7 a                    | 17.3 $\pm$ 4 a   | 23.2 $\pm$ 3.8 a  | 17.1 $\pm$ 4.9 a                      | 21.8 $\pm$ 4.8 a   | 24.2 $\pm$ 2.8 a  |
|      | 15 <b>AB AB</b> | 17.4 $\pm$ 3.3 a                    | 16.9 $\pm$ 3.2 a | 27.5 $\pm$ 6 a    | 18.2 $\pm$ 3.9 a                      | 22.1 $\pm$ 3.6 a   | 22.8 $\pm$ 4.7 a  |
|      | 30 <b>B B</b>   | 16.8 $\pm$ 1.6 a                    | 28.1 $\pm$ 5.3 a | 27.2 $\pm$ 6.6 a  | 20.2 $\pm$ 4 a                        | 25.1 $\pm$ 1.5 ab  | 35.4 $\pm$ 6 b    |

Different lowercase letters indicate significant differences among Pb treatments (columns) for each day of exposure, for each tissue and for each species (n=12). Different capital letters indicate significant differences for comparisons among tissue/species (bold, n=288), and among exposure days (rows) for each tissue and for each species (roman for *A. germinans* and italicized for *L. racemosa*, n=48).

**Table 2.3** Concentration of endogenous lead ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) found in plants exposed to different concentrations of lead, grown under  $15 \text{ mg L}^{-1}$  of salt during a 30-day exposure period. Data are means  $\pm$  standard error.

|      |                | <i>Avicennia germinans</i> <b>A</b> |                  |                    | <i>Laguncularia racemosa</i> <b>B</b> |                    |                    |
|------|----------------|-------------------------------------|------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------|
|      |                | 40 $\mu\text{M}$                    | 80 $\mu\text{M}$ | 160 $\mu\text{M}$  | 40 $\mu\text{M}$                      | 80 $\mu\text{M}$   | 160 $\mu\text{M}$  |
| Root | 2 <b>A A</b>   | 14.5 $\pm$ 2.5 a                    | 20.7 $\pm$ 1.6 a | 53.9 $\pm$ 5 b     | 39.2 $\pm$ 6 a                        | 44.9 $\pm$ 5.7 a   | 130.7 $\pm$ 7.6 b  |
|      | 7 <b>AB AB</b> | 31 $\pm$ 4.2 a                      | 43.4 $\pm$ 1.4 b | 80.2 $\pm$ 3.4 c   | 47 $\pm$ 5.6 a                        | 65.6 $\pm$ 12.8 a  | 186.9 $\pm$ 27.8 b |
|      | 15 <b>B AB</b> | 35.6 $\pm$ 7.1 a                    | 67.8 $\pm$ 6.4 a | 157.2 $\pm$ 17.9 b | 49 $\pm$ 9.9 b                        | 169.3 $\pm$ 33.6 a | 208.6 $\pm$ 16.3 a |
|      | 30 <b>A B</b>  | 33.4 $\pm$ 4.9 a                    | 34.7 $\pm$ 3.5 a | 50.6 $\pm$ 14.6 a  | 58.7 $\pm$ 18.5 a                     | 179.9 $\pm$ 14.2 b | 266 $\pm$ 5.2 c    |
| Stem | 2 <b>A A</b>   | 6.8 $\pm$ 0.5 a                     | 7.2 $\pm$ 0.8 a  | 9.5 $\pm$ 2 a      | 15.5 $\pm$ 1.2 a                      | 17.1 $\pm$ 1.2 a   | 22.2 $\pm$ 0.9 b   |
|      | 7 <b>B A</b>   | 10.3 $\pm$ 1.1 a                    | 11.5 $\pm$ 1.9 a | 11.8 $\pm$ 1.6 a   | 16.1 $\pm$ 2 a                        | 18.5 $\pm$ 3.4 a   | 23.9 $\pm$ 3.9 a   |
|      | 15 <b>B A</b>  | 11.5 $\pm$ 1.6 a                    | 12.2 $\pm$ 1.7 a | 12.5 $\pm$ 1.7 a   | 16.9 $\pm$ 3.7 a                      | 18.5 $\pm$ 6.3 a   | 35.6 $\pm$ 2.8 b   |
|      | 30 <b>B A</b>  | 13.9 $\pm$ 1.5 a                    | 14.3 $\pm$ 2.2 a | 15.2 $\pm$ 2.3 a   | 21.3 $\pm$ 3.2 a                      | 21.2 $\pm$ 4.8 a   | 24 $\pm$ 4.6 a     |
| Leaf | 2 <b>A A</b>   | 9.4 $\pm$ 1.6 a                     | 13.1 $\pm$ 1.8 a | 14.2 $\pm$ 2 a     | 12.3 $\pm$ 4.1 a                      | 19.7 $\pm$ 3.8 ab  | 26 $\pm$ 2.5 b     |
|      | 7 <b>A A</b>   | 12.2 $\pm$ 0.5 a                    | 14.1 $\pm$ 2.3 a | 19.4 $\pm$ 5.9 a   | 16.2 $\pm$ 1.8 a                      | 20.4 $\pm$ 5.4 ab  | 46 $\pm$ 12.2 b    |
|      | 15 <b>A A</b>  | 14.9 $\pm$ 2.4 a                    | 15.4 $\pm$ 3.4 a | 18 $\pm$ 1.9 a     | 18.8 $\pm$ 5.5 a                      | 21.3 $\pm$ 6.7 a   | 51.1 $\pm$ 10.2 b  |
|      | 30 <b>A A</b>  | 28.7 $\pm$ 16.8 a                   | 17.6 $\pm$ 2.3 a | 18.5 $\pm$ 2.2 a   | 18.9 $\pm$ 4.9 a                      | 28.6 $\pm$ 7.9 ab  | 50.1 $\pm$ 9.6 b   |

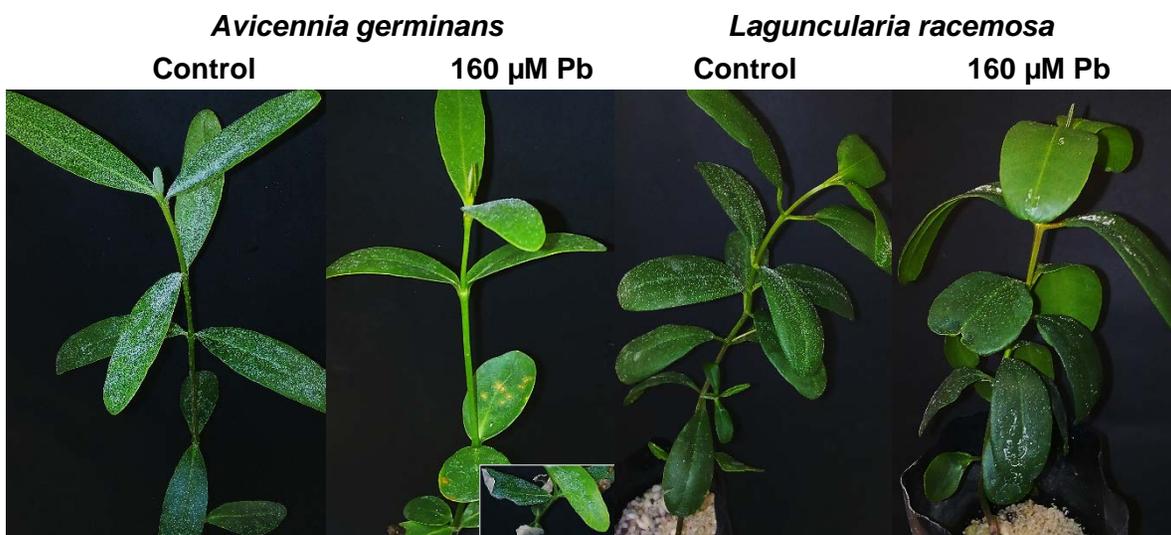
Different lowercase letters indicate significant differences among Pb treatments (columns) for each day of exposure, for each tissue and for each species (n=12). Different capital letters indicate significant differences for comparisons among tissue/species (bold, n=288), and among exposure days (rows) for each tissue and for each species (roman for *A. germinans* and italicized for *L. racemosa*, n=48).

Plants of *A. germinans* and *L. racemosa* under  $15 \text{ mg L}^{-1}$  of salt had a greater root Pb accumulation than at low salinity (Table 3). For *L. racemosa*, Pb accumulation increased significantly as Pb treatment concentration increased. For *A. germinans* this also occurred, but after day 15 Pb root concentration decreased. Only *L. racemosa* had the highest Pb concentrations in the leaf, which was greater than those found in the stem.

## 2.2 Effect of Pb accumulation on plant morphology

Although *L. racemosa* showed the highest Pb accumulation in all treatments, there were no visible symptoms of toxicity in any of the individuals analyzed even under high concentrations of Pb and at the end of the experiment (Fig. 1). Only some individuals of *A.*

*germinans* that grew with or without salt showed leaf yellowing and wilting from day 7, but most damage occurred at 15 and 30 days of exposure, and at the highest Pb concentration (Figure 1). In both species, salt crystals in leaves were observed in plants under halophytic conditions because of the mechanism of excretion characteristic of these species.



**Figure 2.1** Morphological damage and salt excretion in individuals of both species.

### 2.3 Effect of Pb and salinity on plant growth

The species with the highest weight and length was *A. germinans*, but *L. racemosa* values varied less with salinity than those of *A. germinans* at the end of the experiment (Table 4). In both species, although some plants exposed to 15 mg L<sup>-1</sup> of salt had a lower weight and length, there was no significant correlation between the growth variables studied and the electrical conductivity values of the substrate ( $R^2 < 0.1$ ), so that salinity did not influence growth.

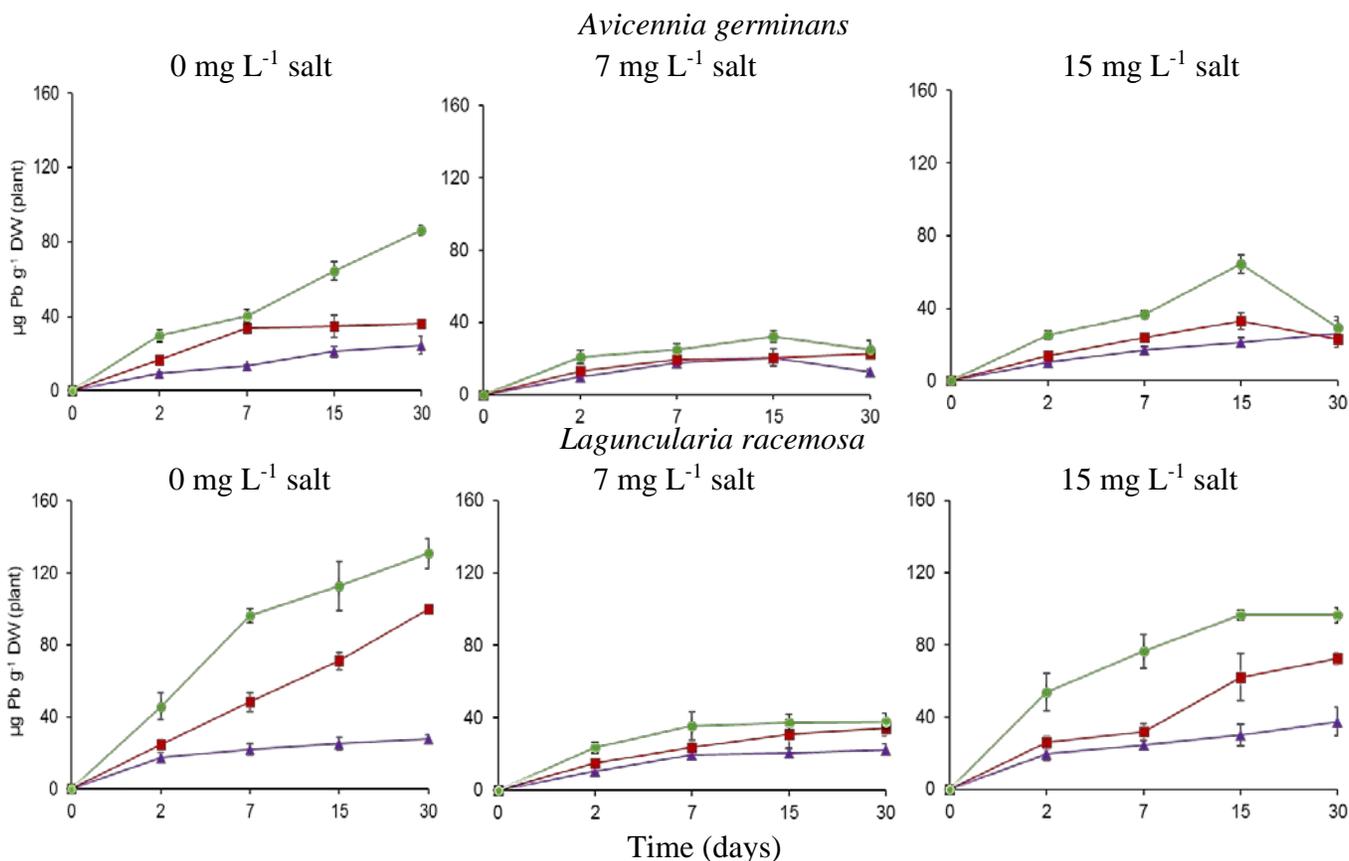
For *A. germinans*, the higher the Pb concentration the lower the biomass and length for the plants. In all salt treatments, the ratio of length and dry weight with respect to the total accumulation of Pb in the plant was negative (Figures 2 and 3 a-f); but, only in plants that were kept under 7 mg L<sup>-1</sup> of salt was the correlation significant. In addition, some decreasing tendencies in the growth values were observed for *L. racemosa*, but none was significant.

In addition, for the treatments of 0 and 15 mg L<sup>-1</sup> of salt in *L. racemosa*, most of the obtained correlations between Pb tissue concentration and plant biomass or length were positive, but not significant. Larger plants of this species accumulated higher Pb concentrations but toxic effect in this species was not visible (Figs. 2 and 3 g-l). However, in both species, it appears that small-sized plants tend to accumulate lower Pb concentrations (~10-40 ug/g in treatments with 40 and 80µM of Pb).

**Table 2.4** Growth parameters during 30 days of Pb treatments in plants of *A. germinans* and *L. racemosa* grown under different salinity conditions. Data are means ± standard error.

| Species                      | Salt treatment (mg/L) | Pb treatment (µM) | Fresh weight (g FW) | Dry weight (g DW) | DW/FW ratio (%) | Plant length (cm) |              |
|------------------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-----------------|-------------------|--------------|
| <i>Avicennia germinans</i>   | 0                     | <u>A</u>          | 0                   | 15.7 ± 1.5 a      | 4.2 ± 0.4 a     | 27.3 ± 0.6 a      | 72.3 ± 2.1 a |
|                              |                       | A                 | 40                  | 13 ± 1.3 ab       | 3.8 ± 0.3 a     | 30.1 ± 1.6 a      | 67.8 ± 2.2 a |
|                              |                       | <b>A</b>          | 80                  | 9.1 ± 1.3 b       | 2.5 ± 0.3 b     | 28.4 ± 1.4 a      | 55 ± 2.7 b   |
|                              |                       |                   | 160                 | 9.1 ± 0.8 b       | 2.5 ± 0.2 b     | 28.5 ± 1.3 a      | 56.5 ± 2.4 b |
|                              | 7                     | <u>B</u>          | 0                   | 18.7 ± 1.9 a      | 4.6 ± 0.5 a     | 24.1 ± 0.3 a      | 70.2 ± 3.1 a |
|                              |                       | A                 | 40                  | 15.1 ± 1.5 ab     | 3.6 ± 0.4 ab    | 23.8 ± 0.4 a      | 64.8 ± 3.6 a |
|                              |                       | <b>A</b>          | 80                  | 16.3 ± 1.5 ab     | 3.9 ± 0.3 ab    | 24.6 ± 0.5 a      | 67.1 ± 4.4 a |
|                              |                       |                   | 160                 | 12.6 ± 1.3 b      | 3.1 ± 0.3 b     | 24.8 ± 0.5 a      | 61.9 ± 3.4 a |
|                              | 15                    | <u>B</u>          | 0                   | 13.7 ± 0.8 a      | 3.5 ± 0.2 ab    | 25.8 ± 0.4 a      | 64.6 ± 2.3 a |
|                              |                       | A                 | 40                  | 15.9 ± 1.4 ab     | 3.9 ± 0.3 ab    | 24.7 ± 0.4 ab     | 62.5 ± 2.7 a |
|                              |                       | <b>A</b>          | 80                  | 18.5 ± 1.4 b      | 4.5 ± 0.4 a     | 24.2 ± 0.3 b      | 68.7 ± 1.9 a |
|                              |                       |                   | 160                 | 13 ± 1.1 a        | 3.2 ± 0.2 b     | 25.1 ± 0.3 ab     | 62.6 ± 2.6 a |
| <i>Laguncularia racemosa</i> | 0                     | <u>A</u>          | 0                   | 9.9 ± 1.5 a       | 2.1 ± 0.3 a     | 20.4 ± 0.7 a      | 49.9 ± 2.7 a |
|                              |                       | <i>AB</i>         | 40                  | 12.1 ± 1.7 a      | 2.6 ± 0.4 a     | 19.9 ± 0.7 a      | 49.2 ± 3.2 a |
|                              |                       | <b>A</b>          | 80                  | 10.9 ± 1.5 a      | 2.4 ± 0.4 a     | 21 ± 0.8 a        | 49.5 ± 2.8 a |
|                              |                       |                   | 160                 | 9.7 ± 1.3 a       | 2.1 ± 0.3 a     | 20.6 ± 0.8 a      | 47.5 ± 2.7 a |
|                              | 7                     | <u>A</u>          | 0                   | 13.3 ± 1.6 a      | 2.9 ± 0.4 a     | 21.7 ± 0.4 a      | 54.2 ± 2.6 a |
|                              |                       | A                 | 40                  | 12 ± 1.1 a        | 2.6 ± 0.2 a     | 21.6 ± 0.3 a      | 53.5 ± 2.1 a |
|                              |                       | <b>A</b>          | 80                  | 11.3 ± 1.3 a      | 2.5 ± 0.3 a     | 22.9 ± 0.7 a      | 49.5 ± 2.7 a |
|                              |                       |                   | 160                 | 10.3 ± 1.1 a      | 2.3 ± 0.2 a     | 24 ± 1.4 a        | 50.3 ± 2.9 a |
|                              | 15                    | <u>B</u>          | 0                   | 9.9 ± 2.2 a       | 2.2 ± 0.5 a     | 21.8 ± 1 a        | 43.2 ± 3.3 a |
|                              |                       | <i>B</i>          | 40                  | 7.4 ± 1.2 a       | 1.7 ± 0.3 a     | 21.6 ± 0.7 a      | 41.3 ± 2.3 a |
|                              |                       | <b>B</b>          | 80                  | 7.8 ± 1.1 a       | 1.7 ± 0.3 a     | 23.4 ± 1.7 a      | 38.9 ± 2.4 a |
|                              |                       |                   | 160                 | 8.2 ± 1.2 a       | 1.8 ± 0.3 a     | 21.5 ± 0.9 a      | 43.2 ± 2.3 a |

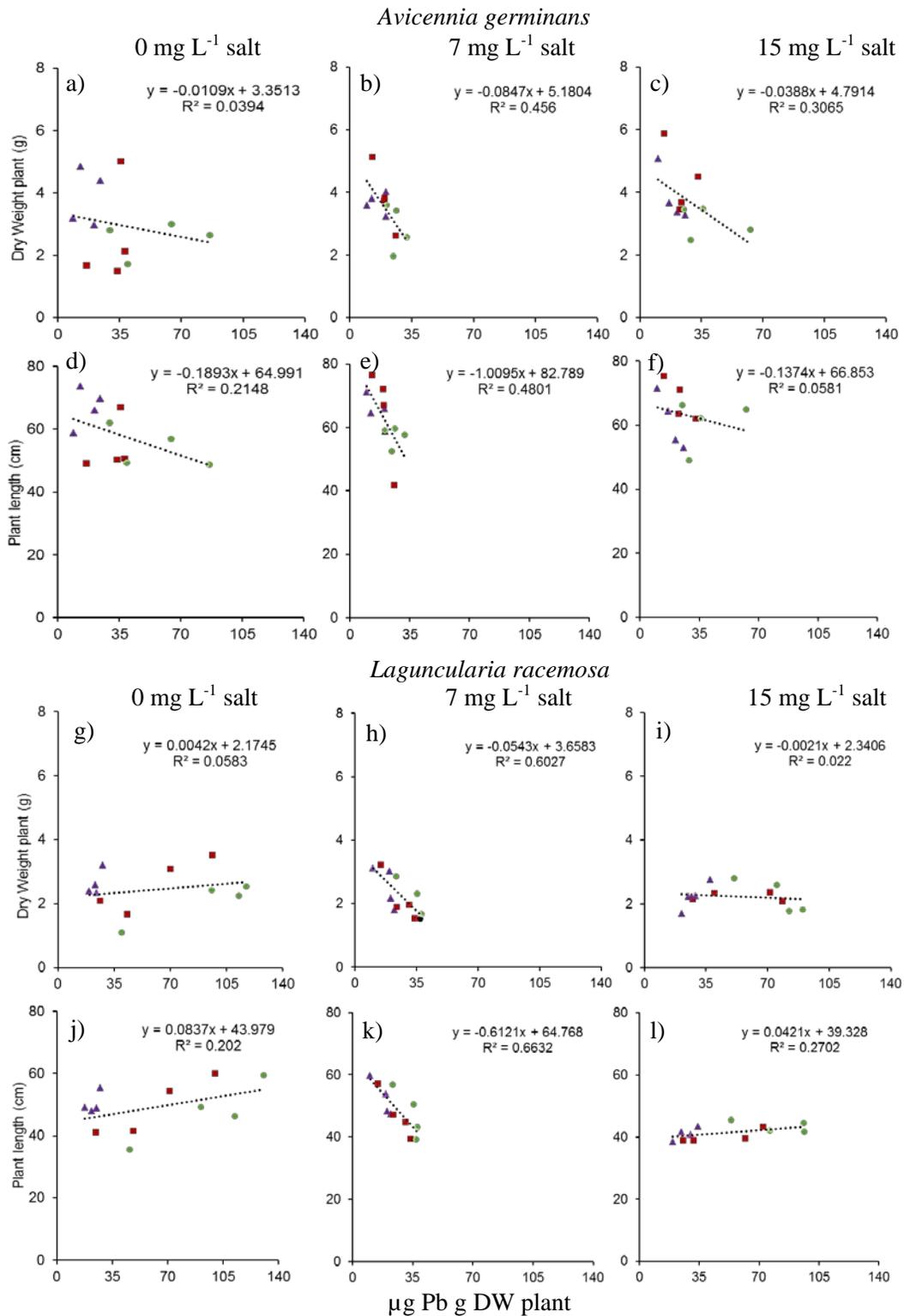
Different lowercase letters indicate significant differences for comparisons among Pb treatments for each parameter within each salinity and each species (n=80). Different capital letters indicate significant differences for comparison among salinity treatments (underlined for fresh weight, italicized for dry weight and bold for plant length) for each species (n=240).



**Figure 2.2** Average total concentration of Pb found in plants exposed to 40µM (▲), 80µM (■) y 160µM (●) Pb treatment over 30 days of exposure, for each salt treatment in *A. germinans* and *L. racemosa*. Data are means ± standard errors.

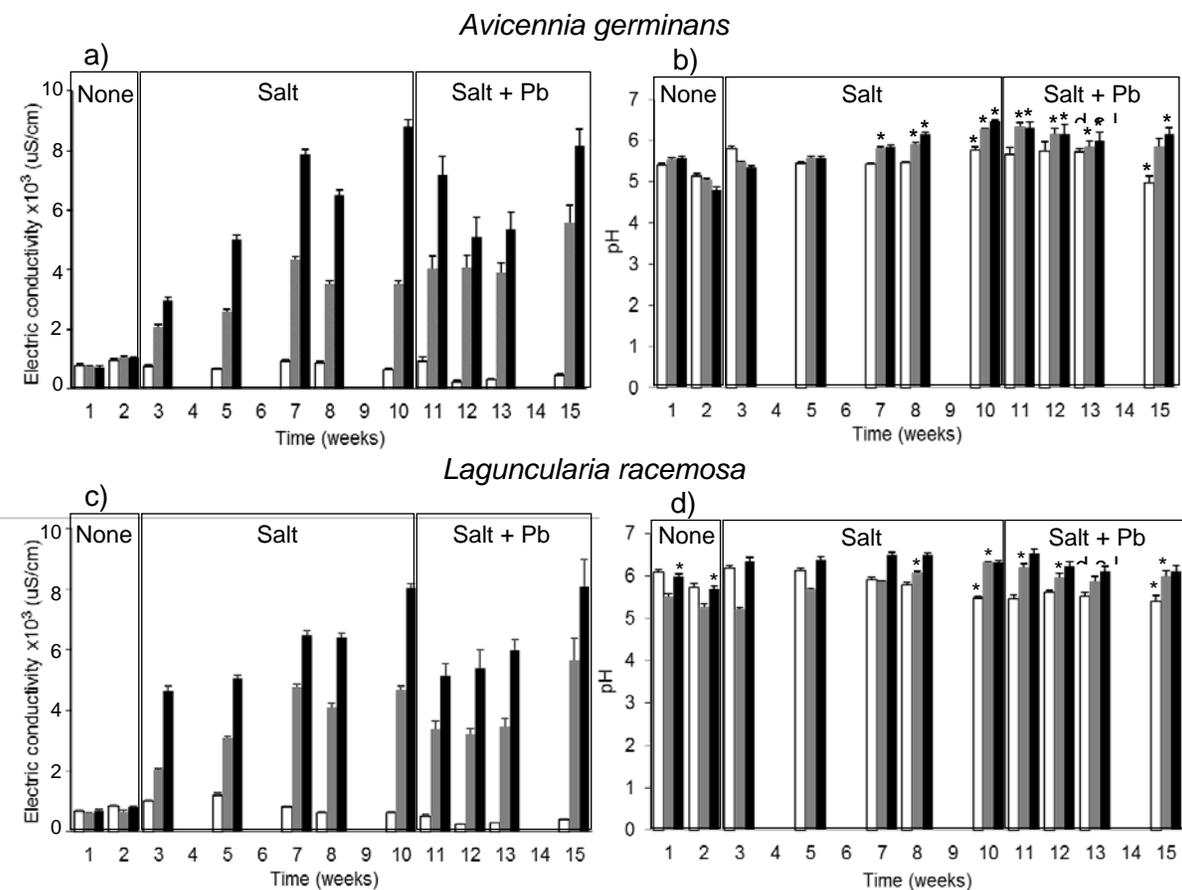
#### 2.4 Effect of salinity on pH and its relation to Pb uptake

In both species, as expected, electrical conductivity (EC) was proportional to the amount of salt in the substrate. Plants grown without salt presented the lowest EC values, which decreased significantly in the last weeks of the experiment (Fig. 4a and c). With 7 and 15 mg L<sup>-1</sup> of salt, EC increased drastically and gradually; when irrigating with salt and Pb, EC values first decreased and later gradually increased again. In both species and for both treatments with salt, EC values of all weeks of measurement differed statistically.

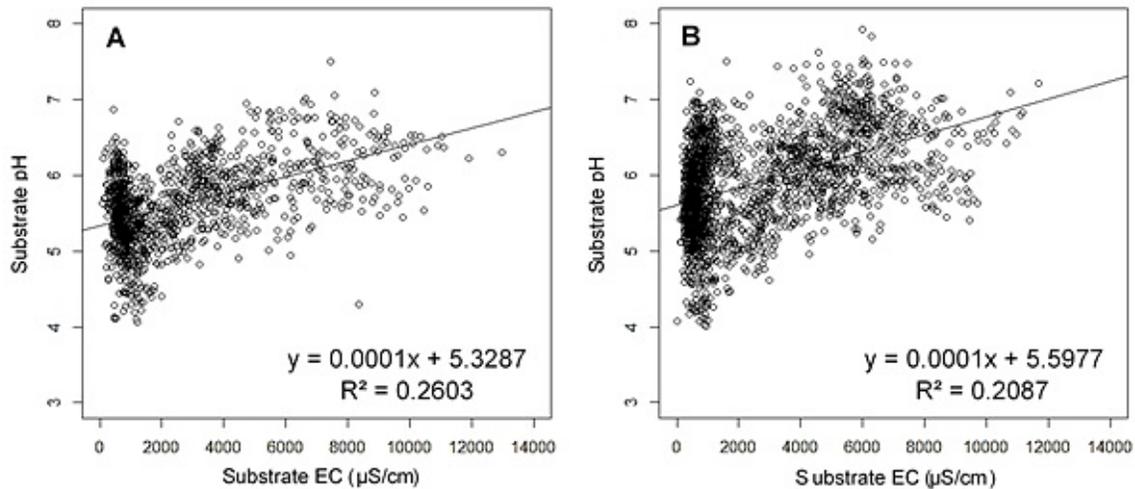


**Figure 2.3** Relationships between tissue Pb concentration and dry weight (a, b, c, g, h, i) and plant length (d, e, f, j, k, l) for the 40µM (▲), 80µM (■) y 160µM (●) treatment of Pb over 30 days of exposure, for each salt treatment in *A. germinans* and *L. racemosa*.

Substrate pH for plants of *A. germinans* growing without salt maintained an average range of 4.9 to 5.8, being the lowest among all treatments (Fig. 4b, Table S1). For the salt treatments, pH increased gradually and significantly four weeks after starting the salt irrigation and stabilizing at the end of the experiment. Plants of *L. racemosa* that grew without salt initially had a higher pH ( $\geq 6$ ) than plants of *A. germinans*, but gradually decreased until the end of the experiment (average range of 5.4 to 6.1, Fig. 4d). Under salinity conditions, the former species grew in a less acidic environment compared to *A. germinans*, since some plants showed point values of pH  $\geq 7$  when the plants were acclimated to 15 mg L<sup>-1</sup> of salt.



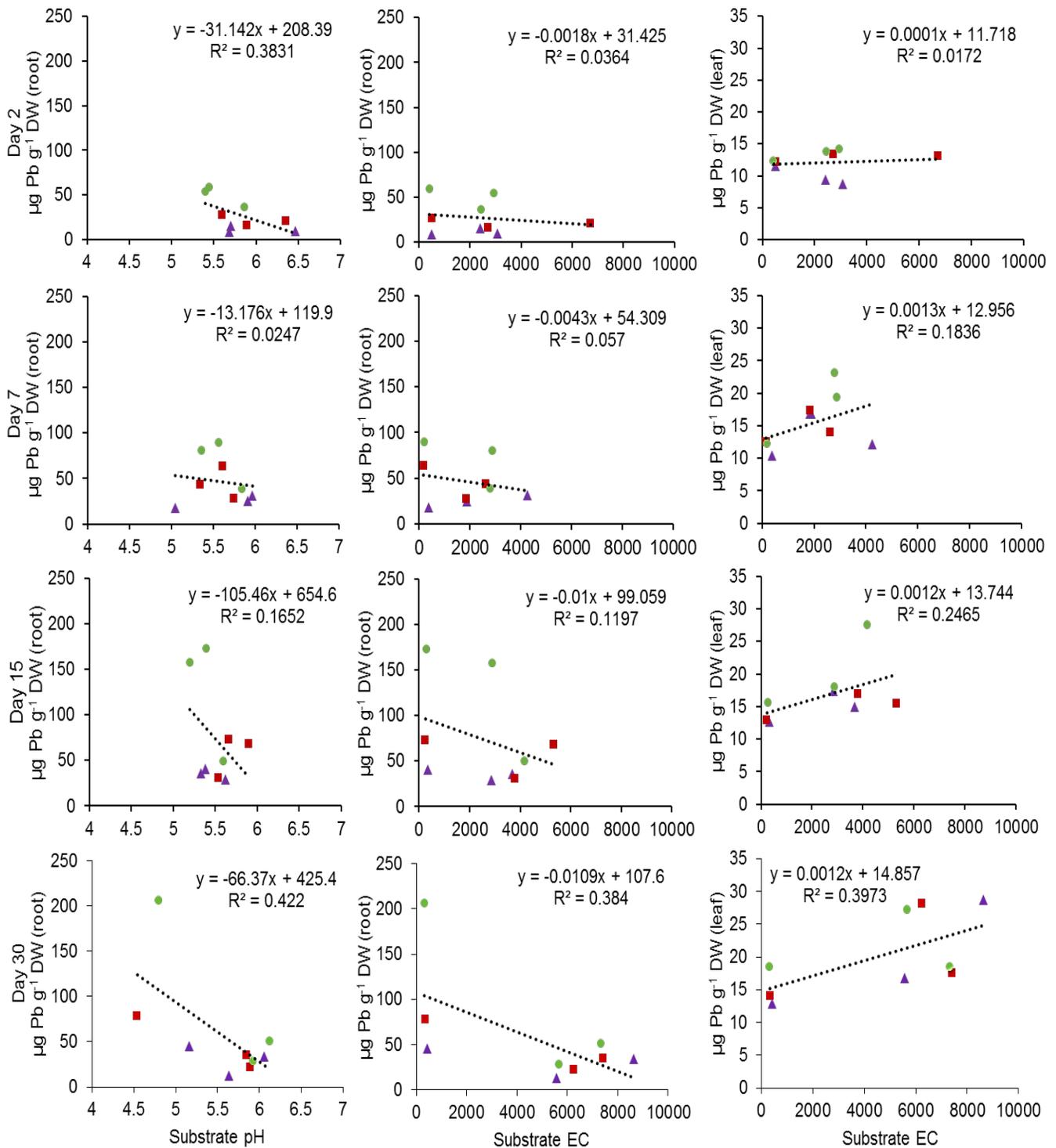
**Figure 2.4** Electrical conductivity and pH from substrate of plants of *A. germinans* and *L. racemosa* before exposure to salt (none), during exposure to salt (salt) and during exposure to salt and lead (salt + Pb). White bars are for treatment of 0 mg L<sup>-1</sup> of salt, gray bars for 7 mg L<sup>-1</sup>, and black bars for 15 mg L<sup>-1</sup>. For panels b and d, asterisks indicate significant pH differences among salt treatment. Data are means  $\pm$  standard errors. (n=80 for none and salt, and n= 16 for salt + Pb).



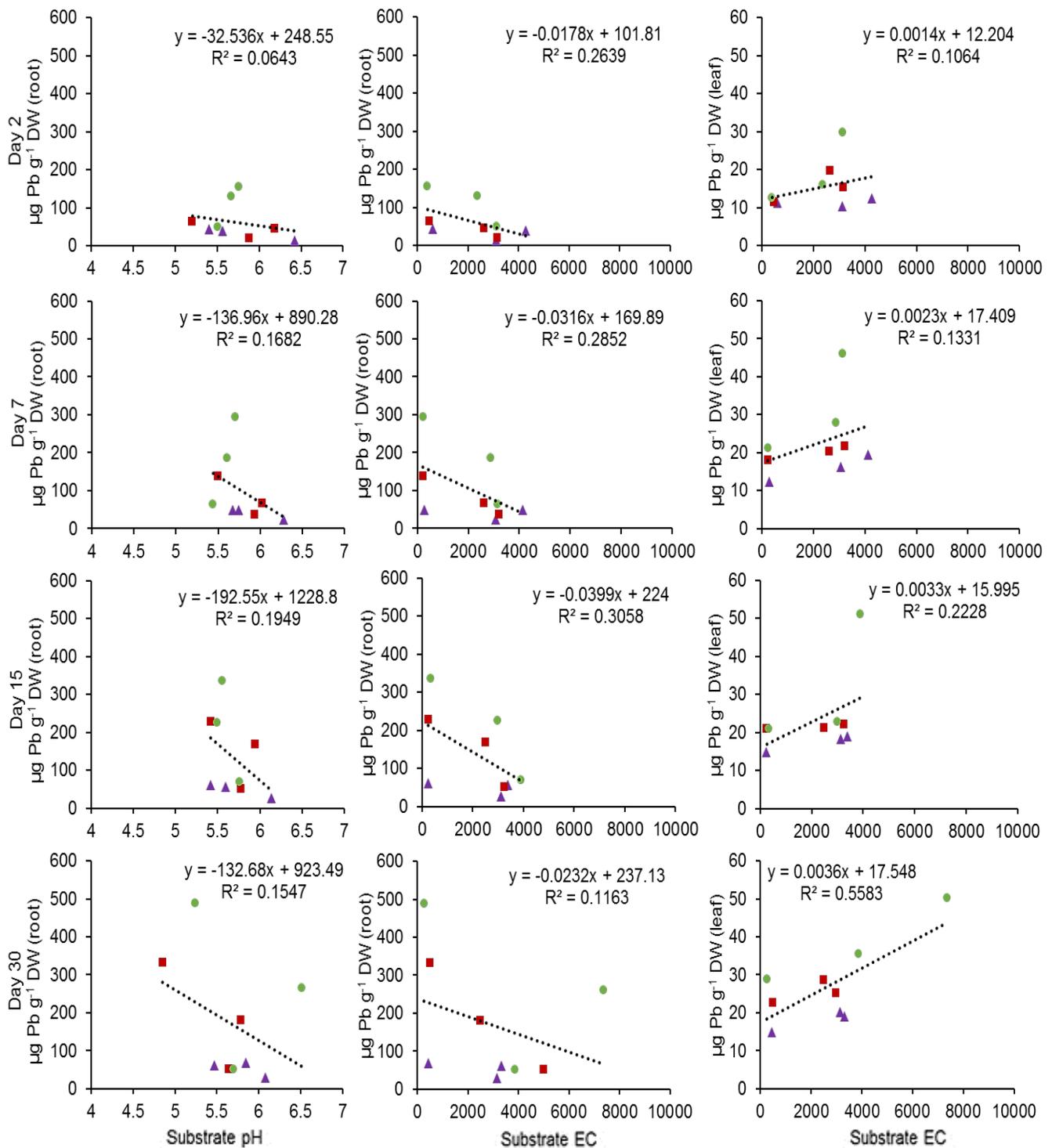
**Figure 2.5** Relationship between electrical conductivity (EC) and pH for substrate of plants of *Avicennia germinans* (A) and *Laguncularia racemosa* (B).

In both species, the relationship between EC and pH was significant showing that an increase in the salinity of the substrate can increase the pH; although, the correlation was low ( $R^2= 0.26$  for *A. germinans* and  $R^2= 0.21$  for *L. racemosa*; Fig. 5). Also, EC and pH were related to the roots Pb concentration as well as the EC with the leaf Pb concentration (Figs. 6 and 7).

For *A. germinans*, an increase in EC and pH, as well as a longer exposure time to the metal, leads to a lower accumulation of Pb in the roots. Also, *L. racemosa* had a negative relationship between EC and pH, which increase the first 15 days of exposure. However, correlation values were lower compared to those of *A. germinans*. Furthermore, for both species, the higher the salinity and longer the time of exposure, the higher accumulation of Pb in the leaf was, especially for *L. racemosa* at day 30.



**Figure 2.6** Relationships between tissue Pb concentration (roots and leaves of *Avicennia germinans*) and substrate electrical conductivity (EC) and pH, for the three salinity treatments at 2, 7, 15 and 30 d for Pb treatments of 40µM (▲), 80µM (■) y 160µM (●).



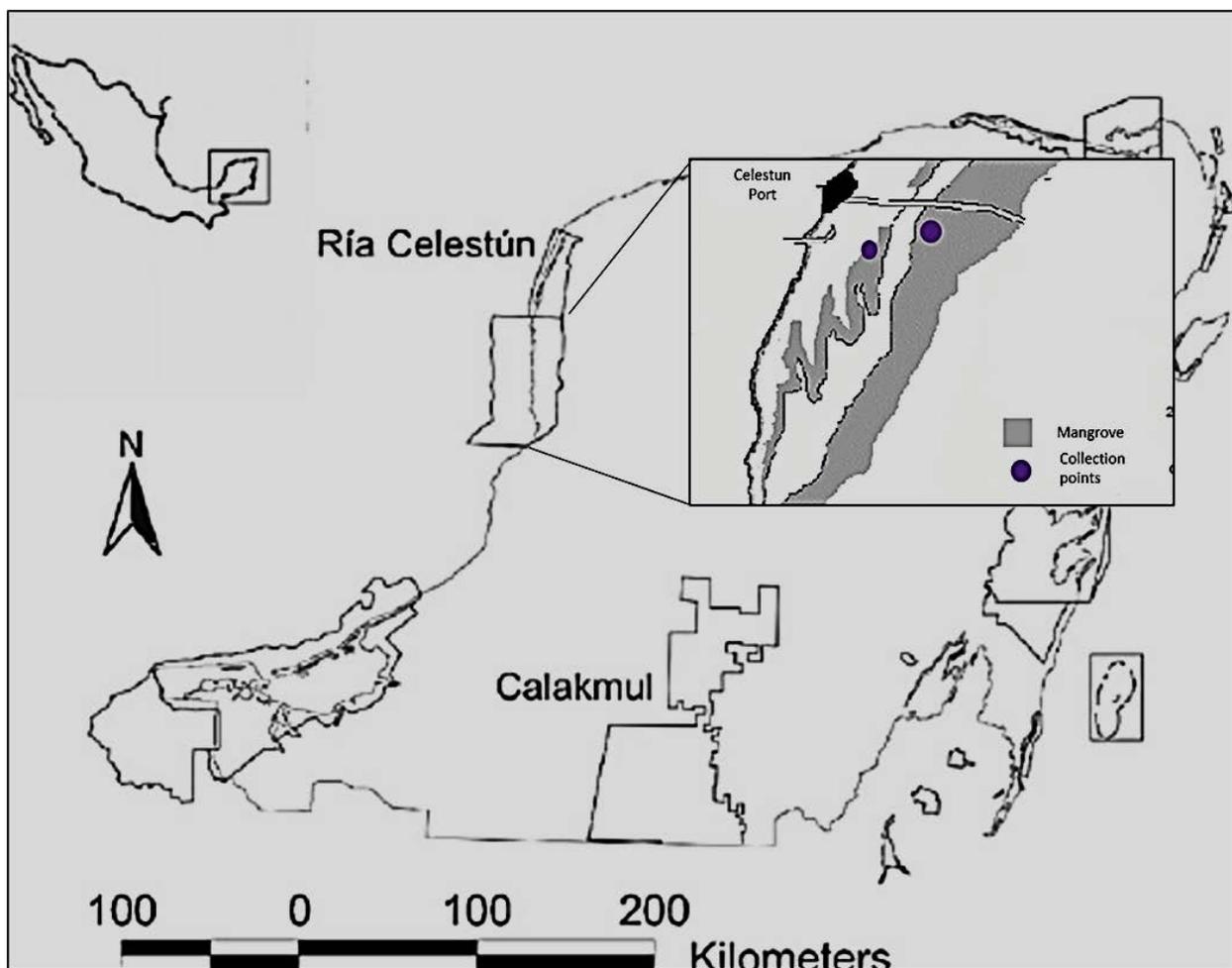
**Figure 2.7** Relationships between tissue Pb concentration (root and leaves of *Laguncularia racemosa*) and substrate electrical conductivity (EC) and pH, for the three salinity treatments at 2, 7, 15 and 30 d for Pb treatments of 40 $\mu\text{M}$  ( $\blacktriangle$ ), 80 $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) y 160 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ).

**Table S1.** Analyses of variance for plant tissues, plant growth and substrate pH variables of experimental plants of *A. germinans* and *L. racemosa*; factors were concentrations of Pb (4), times of exposure (5), and salinity (3). The factor plant tissue was considered nested within species.

| Response variable | Source of variation                  | Df   | MS      | F       | P           |
|-------------------|--------------------------------------|------|---------|---------|-------------|
| Pb                | Pb treatment                         | 3    | 150471  | 162.87  | < 0.001 *** |
|                   | Exposure day                         | 1    | 194009  | 210.007 | < 0.001 *** |
|                   | Salinity                             | 1    | 9475    | 10.25   | 0.0013 **   |
|                   | Species                              | 5    | 141826  | 153.52  | < 0.001 *** |
|                   | Treatment : day                      | 3    | 36600   | 39.62   | < 0.001 *** |
|                   | Treatment : salinity                 | 3    | 4261    | 4.61    | 0.003 **    |
|                   | Day : salinity                       | 1    | 12042   | 13.03   | <0.001 ***  |
|                   | Treatment : speciesbb                | 15   | 37847   | 40.96   | < 0.001 *** |
|                   | Day : species                        | 5    | 49038   | 53.08   | < 0.001 *** |
|                   | Salinity : species                   | 5    | 9522    | 10.31   | < 0.001 *** |
|                   | Treatment : day : salinity           | 3    | 5610    | 6.07    | <0.001 ***  |
|                   | Treatment : day : species            | 15   | 12918   | 13.98   | < 0.001 *** |
|                   | Treatment : salinity : species       | 15   | 3525    | 3.81    | < 0.001 *** |
|                   | Day : salinity : species             | 5    | 6696    | 7.24    | < 0.001 *** |
|                   | Treatment : day : salinity : species | 15   | 2644    | 2.86    | <0.001 ***  |
| Residuals         |                                      | 1344 | 924     |         |             |
| Plant dry weight  | Pb treatment                         | 3    | 10.813  | 4.74    | 0.003 **    |
|                   | Exposure day                         | 1    | 1.144   | 0.501   | 0.479       |
|                   | Salinity                             | 1    | 0.088   | 0.04    | 0.8446      |
|                   | Species                              | 1    | 225.112 | 98.73   | < 0.001 *** |
|                   | Treatment : day                      | 3    | 2.190   | 0.96    | 0.411       |
|                   | Treatment : salinity                 | 3    | 4.745   | 2.08    | 0.102       |
|                   | Day : salinity                       | 1    | 24.788  | 10.87   | 0.001 **    |
|                   | Treatment : species                  | 3    | 4.135   | 1.81    | 0.144       |
|                   | Day : species                        | 1    | 1.374   | 0.602   | 0.438       |
|                   | Salinity : species                   | 1    | 20.379  | 8.93    | 0.003 **    |
|                   | Treatment : day : salinity           | 3    | 2.724   | 1.19    | 0.311       |
|                   | Treatment : day : species            | 3    | 0.684   | 0.29    | 0.825       |
|                   | Treatment : salinity : species       | 3    | 9.955   | 4.36    | 0.005 **    |
|                   | Day : salinity : species             | 1    | 24.713  | 10.84   | 0.001 **    |
|                   | Treatment : day : salinity : species | 3    | 4.168   | 1.82    | 0.141       |
| Residuals         |                                      | 448  | 2.28    |         |             |
| Plant length      | Pb treatment                         | 3    | 660     | 4.39    | 0.004 **    |
|                   | Exposure day                         | 1    | 1850    | 12.33   | <0.001 ***  |
|                   | Salinity                             | 1    | 864     | 5.76    | 0.017 *     |
|                   | Species                              | 1    | 34434   | 229.55  | < 0.001 *** |
|                   | Treatment : day                      | 3    | 96      | 0.63    | 0.591       |
|                   | Treatment : salinity                 | 3    | 396     | 2.64    | 0.049 *     |
|                   | Day : salinity                       | 1    | 1757    | 11.71   | <0.001 ***  |
|                   | Treatment : species                  | 3    | 206     | 1.37    | 0.250       |
|                   | Day : species                        | 1    | 1857    | 12.38   | <0.001 ***  |
|                   | Salinity : species                   | 1    | 1884    | 12.56   | <0.001 ***  |
|                   | Treatment : day : salinity           | 3    | 20      | 0.13    | 0.940       |
|                   | Treatment : day : species            | 3    | 91      | 0.605   | 0.612       |
|                   | Treatment : salinity : species       | 3    | 670     | 4.46    | 0.004 **    |
|                   | Day : salinity : species             | 1    | 350     | 2.33    | 0.127       |
|                   | Treatment : day : salinity : species | 3    | 118     | 0.78    | 0.503       |
| Residuals         |                                      | 448  | 150     |         |             |

|                 |                                      |       |        |        |             |
|-----------------|--------------------------------------|-------|--------|--------|-------------|
| Substrate<br>pH | Pb treatment                         | 3     | 2.957  | 16.42  | < 0.001 *** |
|                 | Exposure day                         | 1     | 10.099 | 56.08  | < 0.001 *** |
|                 | Salinity                             | 1     | 31.643 | 175.71 | < 0.001 *** |
|                 | Species                              | 1     | 0.547  | 3.04   | 0.082       |
|                 | Treatment : day                      | 3     | 0.416  | 2.31   | 0.075       |
|                 | Treatment : salinity                 | 3     | 0.211  | 1.17   | 0.319       |
|                 | Day : salinity                       | 1     | 0.264  | 1.46   | 0.226       |
|                 | Treatment : species                  | 3     | 0.127  | 0.703  | 0.55        |
|                 | Day : species                        | 1     | 0.027  | 0.15   | 0.697       |
|                 | Salinity : species                   | 1     | 0.477  | 2.64   | 0.104       |
|                 | Treatment : day : salinity           | 3     | 1.252  | 6.95   | <0.001 ***  |
|                 | Treatment : day : species            | 3     | 0.09   | 0.49   | 0.684       |
|                 | Treatment : salinity : species       | 3     | 0.291  | 1.61   | 0.184       |
|                 | Day : salinity : species             | 1     | 0.611  | 3.39   | 0.066       |
|                 | Treatment : day : salinity : species | 3     | 0.008  | 0.05   | 0.986       |
| Residuals       | 448                                  | 0.180 |        |        |             |

ANOVAS for each variable and possible interactions between variables are shown; degrees of freedom (df), mean square error (MS). Significance codes: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$



**FIGURE S1.** Location of the Ria Celestun Biosphere Reserve in Yucatan, Mexico. The road to the main town crosses the lagoon and the collection points are shown. This map also shows other main preservation areas of the Yucatan Peninsula.

## DISCUSSION

We found that *Avicennia germinans* and *Laguncularia racemosa* accumulated Pb, mainly in the roots, and translocate it in low concentrations towards the aerial parts (phyto-stabilization), which has already been reported for other mangrove species (Nirmal Kumar *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013, Cabañas-Mendoza, 2014; Pérez-Sirvent *et al.*, 2017, Qiu and Qiu, 2017). This mechanism is common in tree species because it allows them to be more tolerant to the toxic effects (Diez, 2008; Trejo-Calzada *et al.*, 2015; Salas-Luévano *et al.*, 2017). Under no salinity conditions, Pb accumulation tends to be higher when the level of contamination and the time of exposure to the Pb is higher.

In all Pb treatments, *L. racemosa* not only had the highest accumulation capacity but also the highest tolerance without showing any visible damage; both biomass and length did not change for this species, even though some plants accumulated high Pb concentrations. Our results showed that *A. germinans* could have a greater vulnerability to the toxic effects of Pb as time of exposure passed.

We corroborated that pH increased in the substrate at higher salinities, but the relationship between these two variables was low. Few studies have shown the influence of salinity on pH (Saraswat *et al.*, 2015). More experiments with longer residence times and higher salt concentrations in the soil are required to show an evident relationship. Besides, other environmental variables can also influence changes in pH, such as temperature which, when increases, causes a decrease in pH (Dotro *et al.*, 1994).

At higher salt concentrations there is an increase in the uptake of Cd, Zn and Pb in some plants, due to competition with other cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) for sorption sites. This could increase the formation of complexes with chloride anions, causing desorption of metals and their mobility (Fritioff *et al.*, 2005; Manousaki and Kalogerakis 2009; Manousaki *et al.*, 2009; Gharaibeh *et al.*, 2015). Additionally, some studies on sediments and different plant species show that higher salinity leads to a decrease in the mobilization and accumulation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in plant tissues (Smolders and McLaughlin, 1996; Riba *et al.*, 2003; Fritioff *et al.*, 2005; Manousaki and Kalogerakis, 2009; Leblebici *et al.*, 2011). These last studies support our results, because we found that salinity caused a lower accumulation of Pb in the root. In addition, in this study, the greater the exposure period, a

decrease in Pb availability of the metal occurred, mainly in *A. germinans*. This can occur because metals can also bind to other anions forming less soluble complexes that can limit the absorption of the metal through coagulation, precipitation and flocculation (Smolders and McLaughlin, 1996).

Few studies mention the influence of environmental variables on the uptake of metals for mangrove species (Dai *et al.*, 2017; Pittarello *et al.*, 2018). For instance, Cheng *et al.* (2012) reported that an increase in salinity reduces the loss of radial oxygen, which stimulates the lignification of the exodermis, and alters the permeability of the root, influencing a lesser accumulation of metals (Pb, Zn and Cu) at low salinity. Our results agreed with these findings, since at low salinity in the substrate there was the lowest Pb tissue accumulation.

Nevertheless, some studies show that the transformation of free ion metals to complexes, and their low availability, is not the only reason why metal accumulation in plants decreases in the presence of salt. Mei *et al.* (2014) show that a blockage in the  $\text{Ca}^{2+}$  channels significantly decreases the absorption of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  by the root of amaranth plants grown under different concentrations of NaCl. This study also reports that a blockage of the  $\text{K}^+$  channels diminishes the uptake of  $\text{Na}^+$ , and  $\text{K}^+$  but not of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Cd}^{2+}$ , which suggests competition between the  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cd}^{2+}$  for passage through the channels of  $\text{Ca}^{2+}$ . This affinity of  $\text{Na}^+$  for the sites of sorption in the walls of the root cells displaces other ions and, consequently, results in a low accumulation of the metal in the roots. These findings can help explain the decrease of metal in mangrove roots, which can lead to more studies on the specificity of the transporters in the accumulation of metals in mangroves.

Our results showed that the accumulation of Pb in roots was associated with pH changes; and that the decrease in the availability of Pb in the roots is more evident at longer time of exposure to the metal. A study also reports that the accumulation of metals in plants is more effective when the pH is low, since acidification releases metals associated with sediments (Riba *et al.*, 2003). But further studies are needed to know how pH increase of the substrate affects Pb availability.

An interesting finding in our study was that salinity also influences a greater translocation of Pb to the leaves. This can occur because these species excrete salt through their leaves.

MacFarlane and Burchett (1999, 2000) show that the mangrove species *Avicennia marina*, treated with Zn and Cu, has an increase in these metals in the leaf and in the salt crystals on leaf surfaces, suggesting a strategy of the plant to deal with excess micronutrients by eliminating them through the glandular trichomes of the epidermis. This could help explaining the lowest root Pb concentration values at the end of the experiment for mangrove plants in the low salinity treatment.

Soils in mangrove ecosystems, in addition to having a wide salinity gradient, are also flooded either temporarily or permanently and are rich in organic matter, which influences changes in pH and other physicochemical variables, such as processes of oxide reduction (Lugo and Medina, 2014; Naidoo, 2016). Plants of *A. germinans* and *L. racemosa* can co-exist in basins or semi-flooded areas, but when salinity is high, *A. germinans* dominates, whereas when salinity is low the dominant species can be *L. racemosa* (Reese, 2009; Zaldivar-Jiménez *et al.*, 2013). Both species are distributed within bands or plots along the Gulf of Mexico and the Pacific coast (López-Portillo and Ezcurra, 2002). Based on our findings, *L. racemosa* has several advantages that would allow it to be a better candidate for the remediation of Pb in these ecosystems. However, more studies under higher salinities need to be done to show the potential of *A. germinans*.

## CONCLUSION

Salinity, and the changes caused in pH, influenced the availability, accumulation and translocation of Pb in *A. germinans* and *L. racemosa*, which was more evident under prolonged periods of time. Nevertheless, *L. racemosa* not only had a greater capacity for Pb accumulation and tolerance, but this species also occurs in conditions where the availability of Pb discharges may be greater, which makes it more efficient for phytoremediation. Additionally, *A. germinans* can be more efficient for phytoremediation in places with low pollution. The contamination by heavy metals in coastal lagoons of Mexico is worrisome so it is urgent to carry out more studies on how these species, and other mangrove species, can coexist and cope with these pollutants and if this could somehow help heavy metal pollution remediation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Roberth Us-Santamaria for help in the laboratory and in the field. We also appreciate the help of Modesto Antonio Palacios-Pérez in the greenhouse and the laboratory. We also thank two anonymous reviewers for providing comments to improve this manuscript. Grant number CB 221208-Z from basic science Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) project of JMS supported this research. MRCM was the recipient of a Ph. D. fellowship by Conacyt (number 419215).

## ORCID iDs

María del Refugio Cabañas-Mendoza <https://orcid.org/0000-0003-2775-4614>

Jorge M. Santamaría <https://orcid.org/0000-0002-6801-034X>

Enrique Sauri-Duch <https://orcid.org/0000-0003-2181-8592>

Rosa María Escobedo-GraciaMedrano <https://orcid.org/0000-0002-5296-7745>

José Luis Andrade <https://orcid.org/0000-0002-4991-5020>



## CAPÍTULO III

### EL PLOMO AFECTA DIFERENCIALMENTE ALGUNOS INDICADORES DE RESPUESTA AL ESTRÉS EN LAS ESPECIES *Avicennia germinans* Y *Laguncularia racemosa*

#### INTRODUCCIÓN

Las adaptaciones de las plantas al estrés por metales pesados se producen a través de mecanismos de resistencia que reducen su entrada a la planta, o que una vez absorbidos, permiten su almacenamiento en lugares no perjudiciales para las células (García, 2006). Un efecto rápido y directo de los metales pesados en las células es catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales producen oxidación de los componentes celulares cuando estos reaccionan con los electrones desapareados de las EROs; los radicales libres que se generan pueden inducir la peroxidación de los lípidos lo que modifica la estructura de las membranas (León y Sepúlveda-Jiménez, 2012).

Las plantas poseen mecanismos de defensa antioxidante encargados de prevenir el daño celular causado por las EROs. Esto lo hacen a través de la capacidad de sus tejidos para reaccionar y estabilizar a los radicales libres, y para retardar la degradación oxidativa (Avello y Suwalsky, 2006). Existe una gran variedad de sistemas de defensa antioxidante que pueden ser enzimáticos, como la superóxido dismutasa, las catalasas, las peroxidasas; y no enzimáticos, como el glutatión, el ascorbato, las vitaminas, los flavonoides, los carotenoides y los polifenoles (Aránguiz *et al.*, 2009; Londoño, 2012).

También, se han identificado otras moléculas que pueden ayudar a prevenir el estrés abiótico, entre ellos están los aminoácidos, las aminas, los azúcares y los ácidos orgánicos. Su acción puede ser de dos formas: aumentando su producción o por una reducción en el nivel de compuestos tóxicos (Vinocur y Altman, 2005). La prolina es un aminoácido presente en cantidades pequeñas en las plantas, que bajo condiciones de estrés abiótico, o por deficiencia de nutrientes, incrementa su concentración notoriamente. La prolina actúa como un agente osmótico protegiendo a las enzimas y a la estabilización de las proteínas, en la regulación del pH del citoplasma, así como fuente de carbono y nitrógeno para la rehidratación celular (Tripathi y Gaur, 2004; O-Quezada *et al.*, 2011).

En el estrés por metales pesados, la prolina en su forma libre puede interactuar como inhibidor de la peroxidación lipídica eliminando las EROs (Choudhary *et al.* 2007) o como agente antioxidante que evita que las EROs reaccionen con el glutatión. El glutatión es un péptido que forma parte de la estructura de las fitoquelatinas, estas se unen a los metales para transportarlos fuera de la célula o a organelos donde son menos perjudiciales. Al mantener niveles bajos de EROs también se mantienen niveles estables de glutatión facilitando la síntesis de fitoquelatinas y un posible incremento de la tolerancia al metal (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). Esto fue confirmado por Yonamine *et al.* (2004) en cultivos celulares de *Nicotiana tabacum*, en donde al estimular la inducción temporal del gen *NtHAL3a* se generó una mayor biosíntesis de prolina libre, que disminuyó la presencia de especies reactivas de oxígeno e incrementó la tolerancia de las células al litio.

El objetivo principal de este capítulo fue determinar el efecto que tiene el Pb en la morfología, crecimiento y capacidad fotosintética de plantas de dos especies de manglar; así como evaluar la respuesta de algunos indicadores de estrés abiótico (acumulación de prolina y capacidad antioxidante) bajo diversas concentraciones de Pb en diferentes tiempos de exposición, y de esta forma entender los procesos bioquímicos y fisiológicos de las plantas de manglar para tolerar y sobrevivir a la contaminación por Pb. Como hipótesis planteamos que la acumulación de ambos indicadores de respuesta será mayor entre mayor sea la concentración y tiempo de exposición que tengan las plantas al Pb y *L. racemosa* será la especie que presente el mayor contenido, lo que podría indicar una mayor tolerancia al Pb.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Cultivo y crecimiento de las especies de estudio

Se colectaron propágulos de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* en la Reserva de la Biosfera Ría Celestún en Yucatán y se transportaron en bolsas de plástico con agua salina al laboratorio de Fisiología Vegetal en el CICY. Cada planta se enjuagó con agua destilada y se colocó en una bolsa de plástico (20 x 10 cm) con arena 20/30 y agrolita (1:1). Las bolsas con las plantas se colocaron en cajas de plástico dentro de una cámara de invernadero con condiciones ambientales de 21 a 25 °C, humedad relativa promedio de 57% durante el día y 86% durante la noche, y una densidad promedio de flujo de fotones

de  $5.4 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  durante seis meses. Las plantas se regaron semanalmente con el fertilizante comercial Miracle-Gro ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ).

### **3.2 Exposición al plomo**

Después de seis meses de crecimiento, 80 plantas individuos de cada especie fueron divididos en cuatro tratamientos con Pb. Las plantas fueron regadas con 1.5 litros de agua desionizada preparada con 0, 75, 150 y 300  $\mu\text{M}$  de nitrato de plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ). Para la evaluación de los parámetros, se tomaron muestras de raíz, tallo y hoja de plantas de cada uno de los tratamientos anteriores, a los 0, 2, 7, 15 y 30 días después de la exposición al Pb. Durante esta etapa, solo las hojas de las plantas se regaron semanalmente con el fertilizante para evitar la precipitación de Pb en el sustrato (Miracle-Gro  $1 \text{ g L}^{-1}$ ).

### **3.3 Concentración de plomo en tejidos**

Se analizaron los tejidos de ambas especies mediante las técnicas descritas por la A.O.A.C. (1990) y Perkin-Elmer (1996). Un gramo de tejido seco se colocó en una mufla a  $600 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta la obtención de cenizas blancas, las cuales se disolvieron en 4 ml de ácido clorhídrico 3M y se aforaron a 6 ml con ácido nítrico al 1% v/v, para finalmente centrifugarse a 4000 rpm durante 10 minutos. Todas las muestras se midieron en un espectrómetro de absorción atómica (modelo 55 AA, Agilent Technologies, California, EE. UU.), a una longitud de onda de 217 nm y la cuantificación se realizó mediante una curva de calibración de 0, 1, 5, 25, 50 y 100 ppm de  $\text{PbNO}_3$ .

### **3.4 Parámetros de crecimiento**

Para ambas especies, el peso fresco total se obtuvo con una balanza analítica (modelo PB403-S, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) y la longitud total se midió con una cinta métrica desde la punta de la raíz más larga hasta la hoja más alta, que generalmente estaba por encima del meristemo apical del tallo. Durante el período de exposición a Pb, también se tomaron fotografías para registrar los cambios morfológicos en las plantas.

### **3.5 Evaluación de la asimilación de $\text{CO}_2$**

Se llevaron a cabo evaluaciones puntuales de la asimilación de  $\text{CO}_2$  en las hojas de

individuos de todos los tratamientos los días 0, 2, 7, 15 y 30, con mediciones cada tres horas de 9:00 a las 17:00 h; horario basado en un estudio previo (Cabañas-Mendoza, 2014). Las mediciones se hicieron con un analizador de gases (CIRAS-2, PP Systems, Boston, EE. UU.), tanto la humedad relativa como la concentración de CO<sub>2</sub> se mantuvieron constantes dentro de la cámara en valores de 50% y de 420 ppm respectivamente; además, se midió la luz visible ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mediante un medidor de luz (LI-189) al que se conectó un cuantómetro (LI-190, marca Licor en ambos casos; LI-COR Inc., Nebraska, EE. UU.); en cada medición, se colocaron los valores de humedad, CO<sub>2</sub> y luz en el equipo CIRAS-2. Se calcularon los valores de asimilación neta diaria de CO<sub>2</sub> al calcular con integrales el área de los valores positivos de asimilación (tasas de asimilación instantánea arriba de cero).

### **3.6 Cuantificación de prolina**

La evaluación de la concentración de prolina se hizo con la determinación de Bates *et al.* (1973) con modificaciones. Se maceraron 250 mg de tejido fresco con nitrógeno líquido y se homogeneizó la muestra con 3 ml de ácido sulfosalicílico al 3% para después ser centrifugadas a 13 000 rpm durante 15 minutos. Un mililitro del sobrenadante se mezcló con 1 ml de ninhidrina y 1 ml de ácido acético glacial, los tubos se taparon y se cubrieron con papel aluminio para colocarse a baño María durante una hora a 95 - 100 °C. Al finalizar, los tubos se pusieron en baño de hielo por 5 minutos y se agregaron 2 ml de tolueno, se mezclaron y dejaron reposar hasta la separación de las fases. El sobrenadante se leyó a 520 nm en un espectrómetro (DU-650, Beckman Coulter, EE. UU.); para la cuantificación se utilizó una curva de calibración de 0 a 1 mM de prolina.

### **3.7 Determinación de la actividad antioxidante**

#### *3.7.1 Extracción de compuestos antioxidantes*

Una muestra de 0.5 g de tejido fresco se maceró con metanol al 80%, la mezcla se colocó en tubos de ensayo; posteriormente estos se colocaron en un baño ultrasónico por una hora, agitando cada 15 minutos. Las muestras se filtraron y el sobrenadante se colocó en tubos de ensayo forrados con papel aluminio para su almacenamiento a -20 °C, hasta su análisis.

### 3.7.2 Capacidad antioxidante por reducción del Fe (III)

Este ensayo se realizó a partir de los extractos de tejido de raíz, tallo y hoja siguiendo la metodología de Oyaizu (1986) con modificaciones. A 1.2 ml del extracto de tejido se añadieron 1.25 ml de buffer de fosfato (0.2 M, pH 6.6) y 1.25 ml de ferricianuro de potasio (1%). Después de un período de incubación de 20 minutos en baño maría a 50 °C, se le agregó 1.25 ml de ácido tricloroacético (10%). De esta solución se tomaron 2.5 ml para mezclarlo con 2 ml de agua destilada y finalmente se agregó 0.5 ml de cloruro férrico (1%). Se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos. Se evaluó el incremento de la absorbancia a 700 nm con un espectrofotómetro (UV-Vis Cary 60, Agilent Technologies). El resultado fue expresado como  $\mu$ moles equivalentes a Trolox (antioxidante comercial, ET) por gramo de tejido, usando una curva de calibración de 0, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800 y 1000  $\mu$ moles ET/ml para la cuantificación.

### 3.7.3 Capacidad captadora de radicales libres

Esta técnica se basa en la estabilización de un radical libre sintético metaestable, como el DPPH, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio de color que puede ser detectado mediante su absorbancia. La evaluación de la actividad captadora del radical libre se analizó en cada uno de los extractos empleando la metodología de Brand-Williams *et al.* (1995) con modificaciones. Se preparó una solución stock mezclando 2.5 mg de DPPH por cada 100 ml de metanol puro y con un espectrómetro (UV-Vis Cary 60, Agilent Technologies) se ajustó una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a 515 nm con metanol como blanco. A 3.9 ml de solución DPPH se le agregaron 100  $\mu$ L del extracto, se leyó la absorbancia en intervalos de 30 minutos hasta que las lecturas ya no tuvieran variación (absorbancia  $\pm 0.005$ ). El resultado fue expresado como  $\mu$ moles equivalentes a Trolox (ET)/g de tejido, usando una curva de calibración con concentraciones entre 5 y 600  $\mu$ moles ET/ml para la cuantificación.

## 3.7 Análisis estadísticos

Se hicieron ANOVAS factoriales de tres vías para comparar las medias entre los factores de tratamiento de Pb, tiempo de exposición y tejido de cada especie, con las variables de respuesta: concentración de Pb en tejidos, peso fresco y longitud total de la planta, tasa

fotosintética, contenido de prolina y actividad antioxidante ( $n = 4$  por cada tratamiento, cada día y cada tejido). Para determinar las diferencias significativas se usaron pruebas de comparación de Tukey. Se realizaron además pruebas de regresión lineal simple relacionando la concentración de Pb en los tejidos (variable independiente) con los parámetros de asimilación de  $\text{CO}_2$ , prolina y actividad antioxidante (variables dependientes). Todos los análisis se determinaron bajo un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) utilizando el paquete estadístico R versión 3.5.1 para Windows.

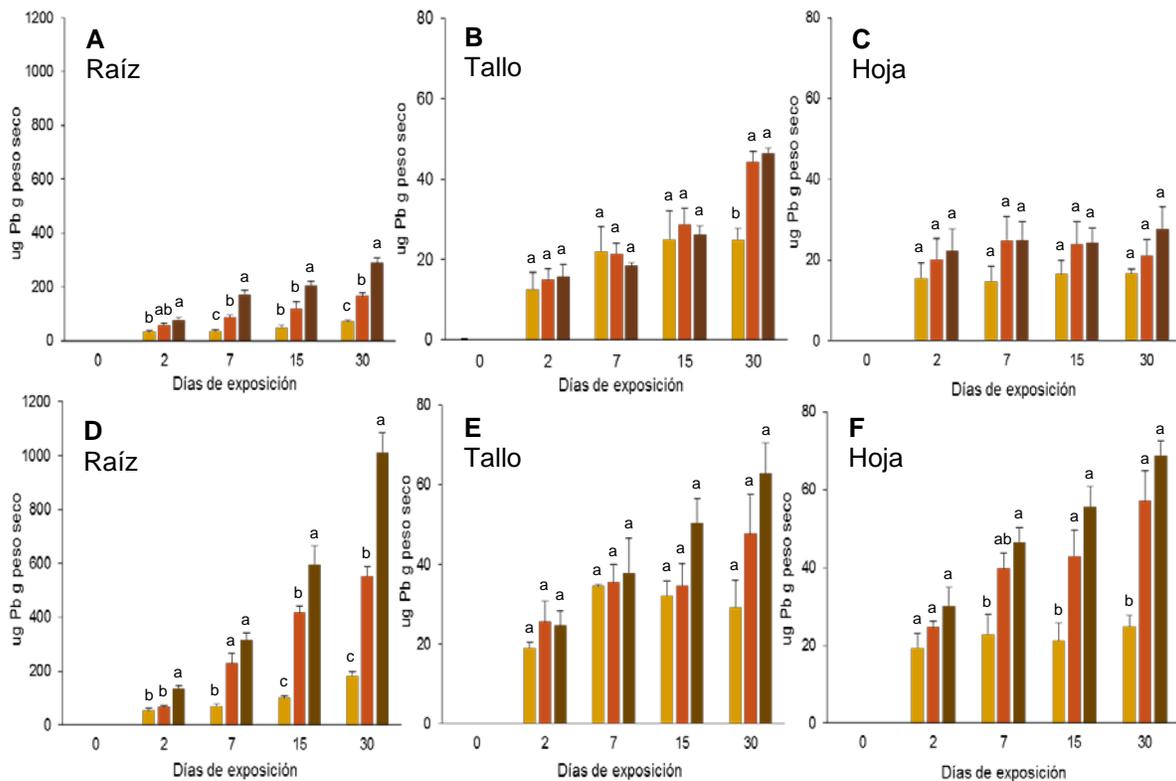
## RESULTADOS

### 3.1 Concentración de Pb en los tejidos

*Laguncularia racemosa* presentó una mayor capacidad de acumulación de plomo en sus tejidos que *Avicennia germinans* (Figura 1). En ambas especies la acumulación de plomo fue mayor en la raíz, aumentando significativamente a mayor concentración de Pb en el sustrato, y a mayor tiempo de exposición a los tratamientos con Pb (valores promedio al día 30 con  $300\mu\text{M}$  de Pb en *A. germinans* de  $289.6 \pm 17.1 \mu\text{g/g}$  y en *L. racemosa* de  $1012.2 \pm 73.5 \mu\text{g/g}$ ).

No hubo diferencias significativas entre la concentración de plomo encontrada en el tallo (de  $14.5 \pm 1.8 \mu\text{g/g}$  en día 2 a  $38.5 \pm 3.2 \mu\text{g/g}$  en día 30 para *A. germinans* y de  $23.1 \pm 2.1 \mu\text{g/g}$  en día 2 a  $46.6 \pm 6 \mu\text{g/g}$  en día 30 para *L. racemosa*) y la concentración en hoja (de  $19.3 \pm 2.7 \mu\text{g/g}$  en día 2 a  $21.9 \pm 2.4 \mu\text{g/g}$  en día 30 para *A. germinans* y de  $27.8 \pm 2.3 \mu\text{g/g}$  en día 2 a  $48.3 \pm 5.7 \mu\text{g/g}$  en día 30 para *L. racemosa*) en cada especie ( $p=0.9104$  en *A. germinans* y  $p=0.9983$  en *L. racemosa*). En *A. germinans*, se observa que a altas concentraciones de Pb en el sustrato y a tiempo de exposición prolongado, la translocación de Pb al tallo aumenta de forma significativa ( $p=0.00019$ ), pero no aumentó significativamente la concentración en hojas ( $p=0.8886$ ) (Figura 1, B-C).

En *L. racemosa* la concentración de Pb en el tallo fue similar entre los tratamientos durante todo el experimento, pero entre tiempo de exposición si hubo diferencias siendo significativo el día dos del día 15 ( $p=0.032$ ) y 30 ( $p=0.00073$ ). La acumulación de plomo en las hojas de *L. racemosa* aumentó significativamente ( $p=0.00091$ ) mientras aumentó la concentración de Pb en el sustrato, encontrándose los valores más altos en el día 30 (Figura 1, E-F).

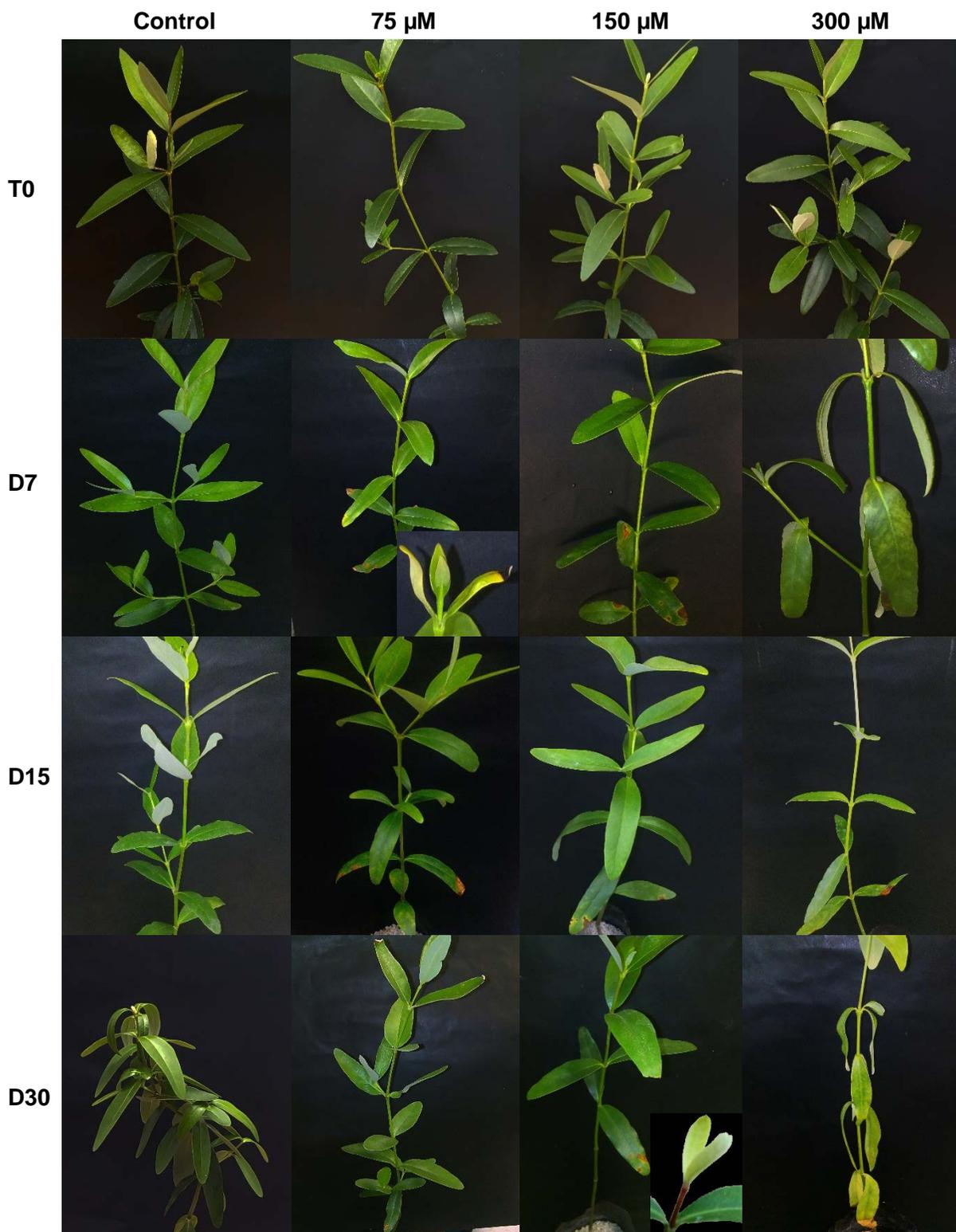


**Figura 3.1** Concentración promedio de Pb en los tejidos de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F) expuestas a 75µM (■), 150µM (■) y 300µM (■) de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> que se obtuvieron durante un periodo de 30 d. La escala del eje “y” en las concentraciones de Pb en raíz es mayor a la de los otros dos tejidos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb, para cada día de exposición, para cada tejido y para cada especie, n=12. Se muestran barras de error estándar. Ni en tiempos ni en el control se detectó Pb en los tejidos.

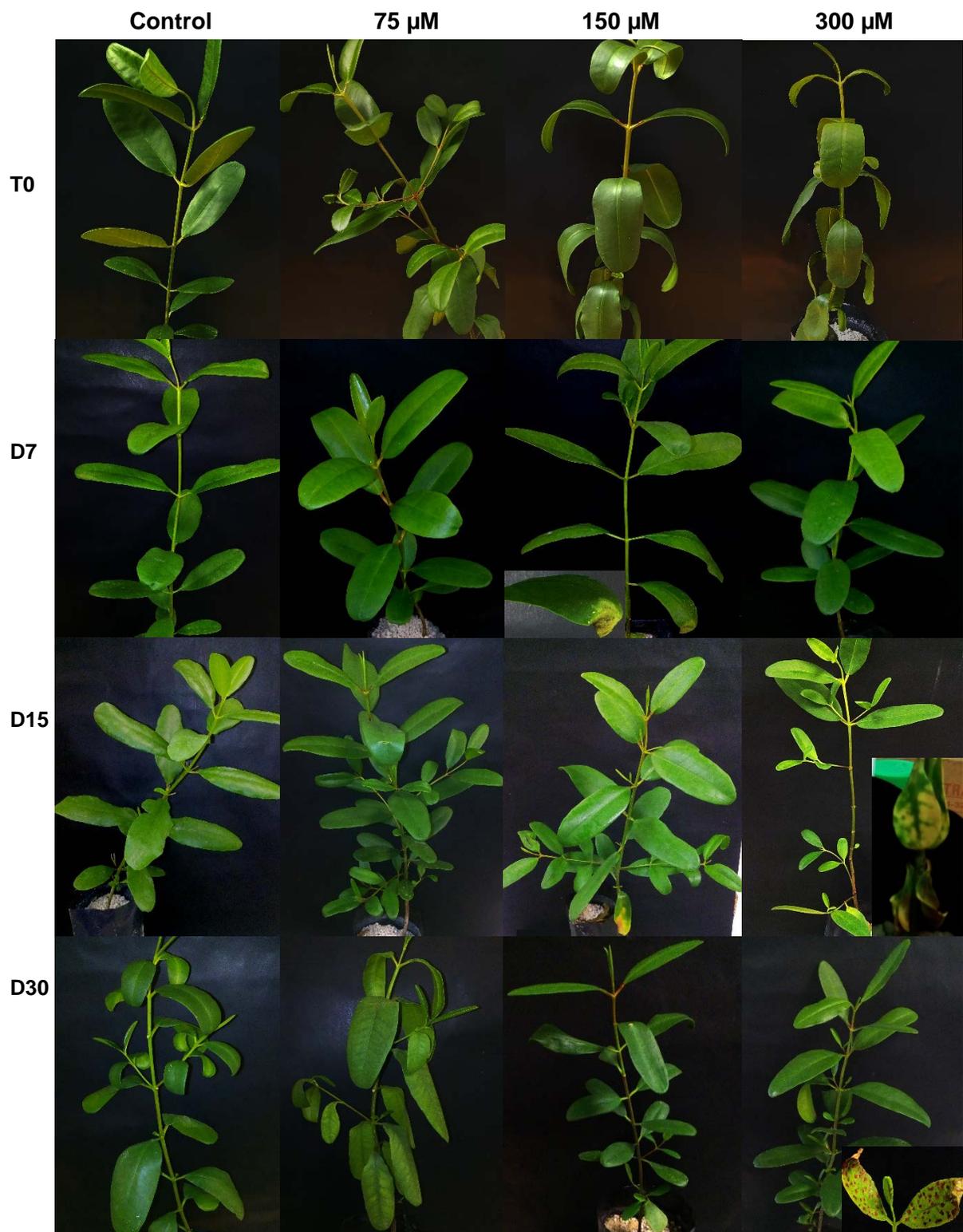
### 3.2 Efecto del Pb en la morfología de las plantas de manglar

En ambas especies, las hojas de plantas expuestas a Pb fueron el único tejido donde se observaron daños visibles. La mayoría de los individuos de *A. germinans* tuvieron clorosis y marchitamiento parcial o total en las hojas desde el día 7 de exposición hasta finalizar el experimento; con una visible toxicidad en todos los tratamientos con Pb (Figura 2). También se observó en algunos individuos el crecimiento de nuevas hojas, pero con clorosis. A pesar de esto, todos los individuos sobrevivieron.

En general, las plantas de *L. racemosa* expuestas al Pb no presentaron daños visibles. Algunos individuos presentaron clorosis y marchitamiento en las hojas, principalmente bajo los tratamientos de media y alta concentración de Pb y a periodos largos de exposición (Figura 3). Pero no se encontraron marcas de alta toxicidad en los tejidos de *L. racemosa*.



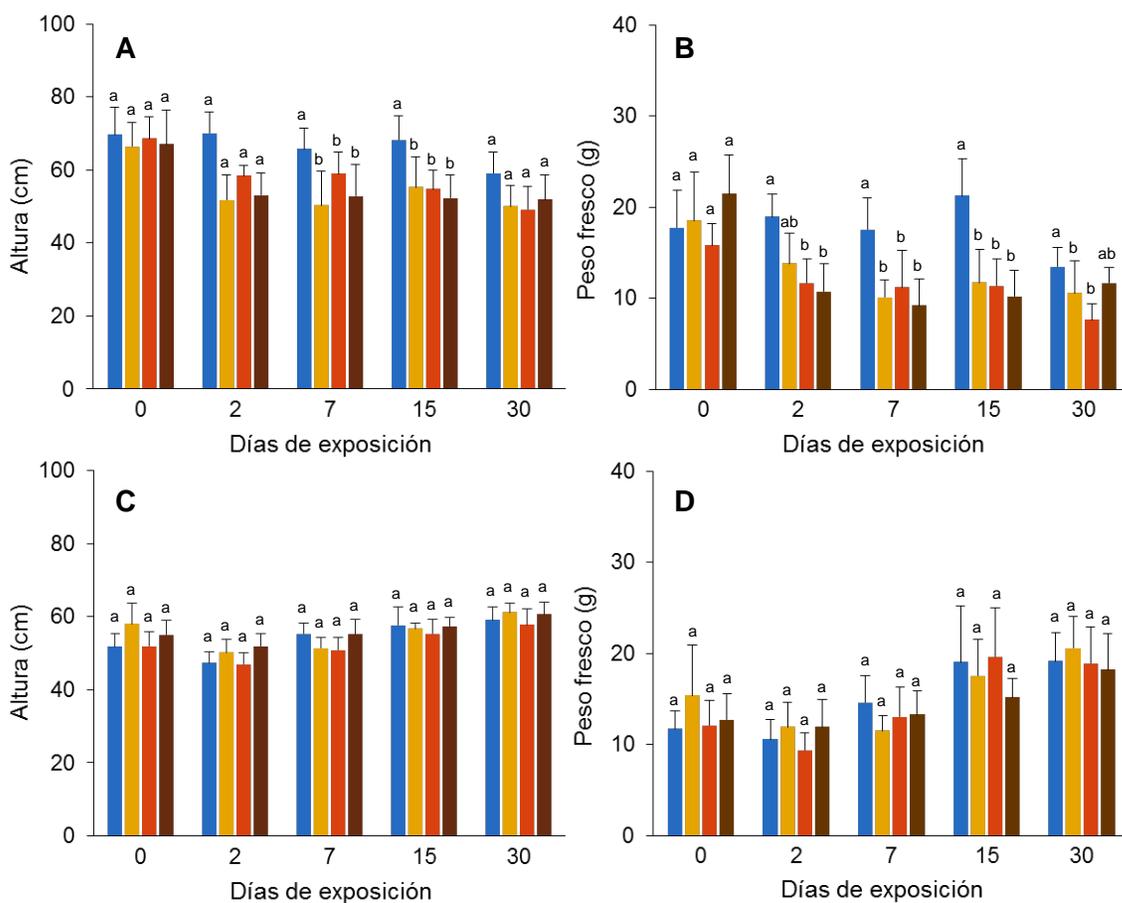
**Figura 3.2** Daño morfológico visible en plantas de *Avicennia germinans* expuestas a diferentes concentraciones de nitrato de plomo en diferentes días de exposición.



**Figura 3.3** Daño morfológico visible en plantas de *Laguncularia racemosa* expuestas a diferentes concentraciones de nitrato de plomo en diferentes días de exposición.

### 3.3 Efecto del Pb en el crecimiento

*A. germinans* presentó un efecto negativo como respuesta a la concentración de Pb en el crecimiento de los individuos, tanto en la altura total como en el peso fresco (Figura 4, A y B). En comparación con las plantas control y el tiempo 0, las plantas correspondientes a los días 7, 15 y 30 tuvieron un crecimiento menor que fue significativo (longitud total  $p=0.00044$ , peso fresco  $p=0.0024$ ), pero fue similar entre las diferentes concentraciones de Pb (longitud total de  $67.9 \pm 3.3$  cm en tiempo 0 a  $52.6 \pm 2.9$  cm en día 30 y peso fresco de  $18.4 \pm 1.9$  g en tiempo 0 a  $10.9 \pm 0.9$  g en día 30).

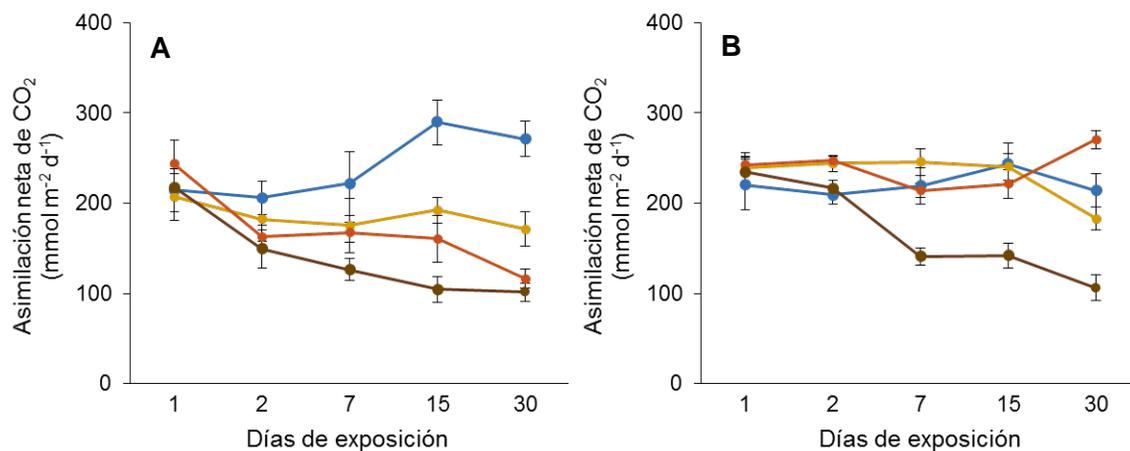


**Figura 3.4** Valores promedio de altura y peso fresco total de plantas de *Avicennia germinans* (A y B) y *Laguncularia racemosa* (C y D) expuestas a 0µM (■), 75µM (■), 150µM (■) y 300µM (■) de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> durante un periodo de 30 días. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb, para cada día de exposición y para cada especie, n=16,  $p < 0.05$ . Se muestran barras de error estándar.

Al finalizar el experimento, a pesar de que en *L. racemosa* se observa una tendencia de aumento principalmente en el peso fresco, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento en ningún tratamiento (Figura 4, C y D), por lo que muestra una mayor tolerancia al Pb (longitud total de  $54.2 \pm 2.1$  cm en tiempo 0 a  $59.7 \pm 1.7$  cm en día 30,  $p=0.377$ ; y peso fresco de  $13 \pm 1.4$  g en tiempo 0 a  $19.2 \pm 1.7$  g en día 30,  $p=0.5695$ ).

### 3.4 Efecto del Pb en la tasa fotosintética

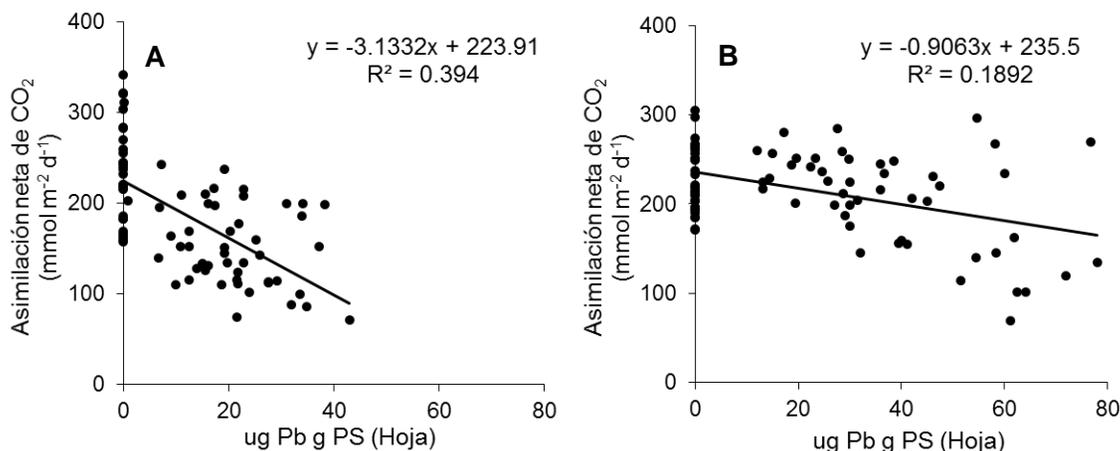
Se observó una disminución de la actividad fotosintética en *A. germinans* ya que la asimilación de  $\text{CO}_2$  disminuyó significativamente en plantas que fueron tratadas con las tres concentraciones de Pb, principalmente en los últimos 15 días de exposición ( $p=9.805e-06$ ). En *L. racemosa* también hubo una disminución en la asimilación de  $\text{CO}_2$ , pero solo fue evidente y significativa en plantas que fueron expuestas a la concentración más alta de Pb ( $p=1.039e-06$ ), no hubo diferencias entre días de exposición ( $p=0.0956$ ).



**Figura 3.5** Tasa de fotosíntesis neta en plantas de *Avicennia germinans* (A) y *Laguncularia racemosa* (B) expuestas a 0  $\mu\text{M}$  (■), 75  $\mu\text{M}$  (■), 150  $\mu\text{M}$  (■) y 300  $\mu\text{M}$  (■) de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  durante un periodo de 30 días. Las líneas indican el error estándar.

Los análisis de regresión indican una relación negativa en *A. germinans* y *L. racemosa* que fue significativa ( $p=4.62e-10$  y  $5.52e-05$ , respectivamente), en donde la asimilación de  $\text{CO}_2$  disminuyó a mayor acumulación de Pb en la hoja. Se muestra en *L. racemosa* que la pendiente de la recta es más baja y con un menor coeficiente de determinación ( $R^2$ ), también se observa que esta especie, a diferencia de *A. germinans*, requiere de una mayor concentración de Pb en la hoja para que el efecto negativo en la asimilación de  $\text{CO}_2$  sea

mayor, esto pudiera estar atribuido a una mayor tolerancia por parte de *L. racemosa*.



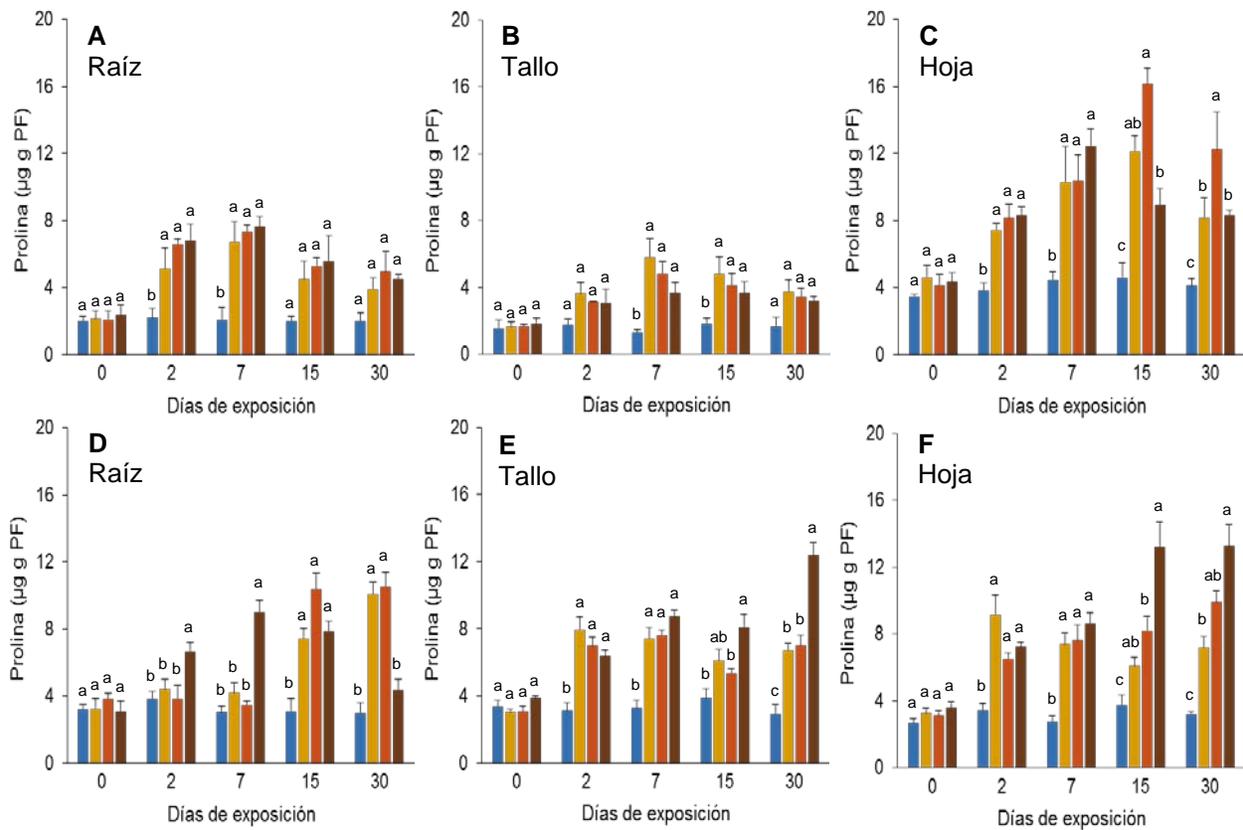
**Figura 3.6** Relación entre la concentración promedio de Pb en la hoja y la asimilación neta de CO<sub>2</sub> en plantas de *Avicennia germinans* (A) y *Laguncularia racemosa* (B), bajo todos los tratamientos y durante 30 días de exposición,  $p < 0.05$ .

### 3.5 Efecto del Pb en la acumulación de prolina

Durante la primera semana de exposición al Pb se observó un aumento significativo en la concentración de prolina en la raíz de plantas de *A. germinans* en las tres concentraciones de Pb y con similar acumulación entre los tratamientos ( $2.07 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$  en el control y  $5.24 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$  con Pb, incremento de 143 a 195% en plantas expuestas a Pb). No obstante, en las siguientes semanas la concentración de prolina disminuyó y se observaron valores similares que en las raíces de las plantas control (Figura 7, A). En comparación con la raíz y las hojas, el tallo tuvo la menor concentración de prolina ( $1.63 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$  en el control y  $3.6 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$  con Pb,  $p=0.015$ ), la cual aumentó de manera similar en todas las plantas expuestas al Pb principalmente en el día 7 y 15 del experimento (incremento de 111 a 184% en plantas expuestas a Pb) (Figura 7, B).

Las hojas, de plantas control y en el tiempo 0, presentaron altos valores de prolina y los mayores aumentos del aminoácido en respuesta al Pb; esto último podría estar relacionado al daño en el tejido y en la especie ( $4.1 \pm 1.01 \mu\text{g/g}$  en el control y  $9.4 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$  con Pb,  $p=0.0000$ ). Este aumento (de 122 a 174% en plantas expuestas a Pb) se observó desde el segundo día de exposición hasta finalizar el experimento, siendo mayor a los 7 y 15 días y con una disminución al día 30, principalmente en hojas de plantas con la concentración más

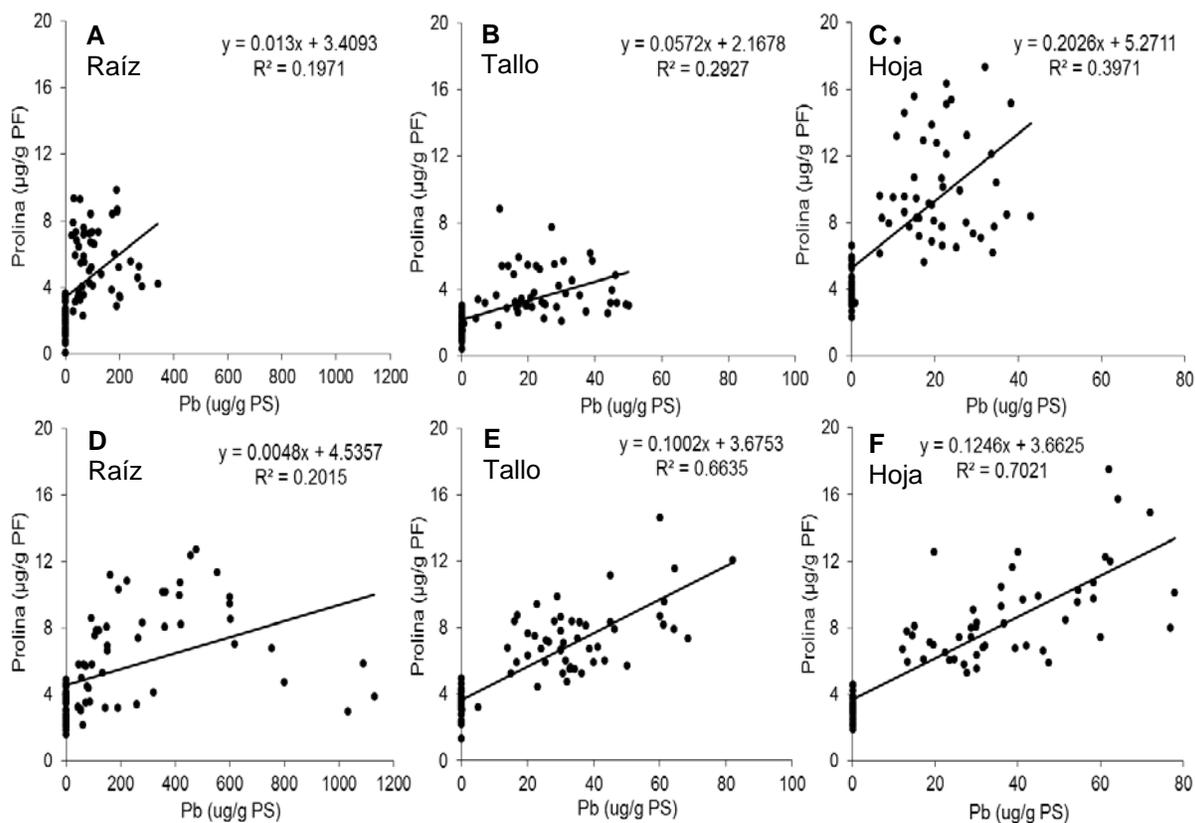
alta de Pb (Figura 7, C).



**Figura 3.7** Concentración promedio de prolina obtenida en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F) expuestas a 0µM (■), 75µM (■), 150µM (■) y 300µM (■) de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> durante un periodo de 30 días. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb, para cada día de exposición, para cada tejido y para cada especie, n=16;  $p < 0.05$ . Se muestran barras de error estándar.

Para *L. racemosa*, la concentración de prolina fue similar en todos los tejidos ( $p=0.0809$ ) y hubo un aumento significativo durante todo el periodo experimental ( $p=0.00015$  en raíz,  $p=0.0001$  en tallo y  $p=5.809e-05$  en hoja). En la raíz ( $3.24 \pm 0.21$  µg/g en el control y  $6.4 \pm 0.4$  µg/g con Pb, incremento de 106 a 125% en plantas expuestas a Pb), para el día 2 y 7 solo fue significativo en plantas expuestas con la concentración más alta de Pb, hubo un aumento similar en todas las plantas expuestas al Pb para el día 15, y el aumento fue mayor al día 30 en plantas tratadas con 75 y 150 µM de Pb, pero disminuyó en las plantas tratadas con 300 µM de Pb (Figura 7, D). En el tallo este aumento fue similar entre los tres tratamientos con Pb principalmente en la primera semana de medición; al finalizar el

experimento, se observaron los valores más altos de prolina a mayor concentración de Pb ( $3.3 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$  en el control y  $7 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$  con Pb, incremento de 108 a 176% en plantas expuestas a Pb) (Figura 7, E). En las hojas de plantas expuestas al Pb, la concentración de prolina aumentó desde los días 2 y 7 y siguió aumentando de forma gradual en los demás días del experimento ( $3.2 \pm 0.17 \mu\text{g/g}$  en el control y  $7.9 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$  con Pb, incremento de 130 a 222% en plantas expuestas a Pb) (Figura 7, F).



**Figura 3.8** Relación entre la concentración promedio de Pb y la concentración promedio de prolina en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F), bajo todos los tratamientos y durante 30 días de exposición,  $p < 0.05$ . La escala del eje x es diferente para cada tejido.

En ambas especies se puede observar que existe una tendencia de aumento significativa (Raíz:  $p=3.71e-05$  en *A. germinans* y  $2.95e-05$  en *L. racemosa*, tallo:  $p=2.21e-07$  en *A. germinans* y  $3.92e-20$  en *L. racemosa*, hoja:  $p=3.78e-10$  en *A. germinans* y  $3.3e-22$  en *L. racemosa*); la relación entre estas variables fue menor en la raíz y mayor en la hoja. Además de tener los valores y porcentajes de incremento más altos, *L. racemosa* tuvo los coeficientes de determinación más altos y fue la especie que requiere de una mayor

---

concentración de Pb en los tejidos, principalmente en el tallo y la hoja, para tener concentraciones de prolina similares o más altas que *A. germinans* (Figura 8 D, E, F).

### 3.6 Efecto del Pb en la capacidad antioxidante

#### 3.6.1 Reducción del Fe (III)

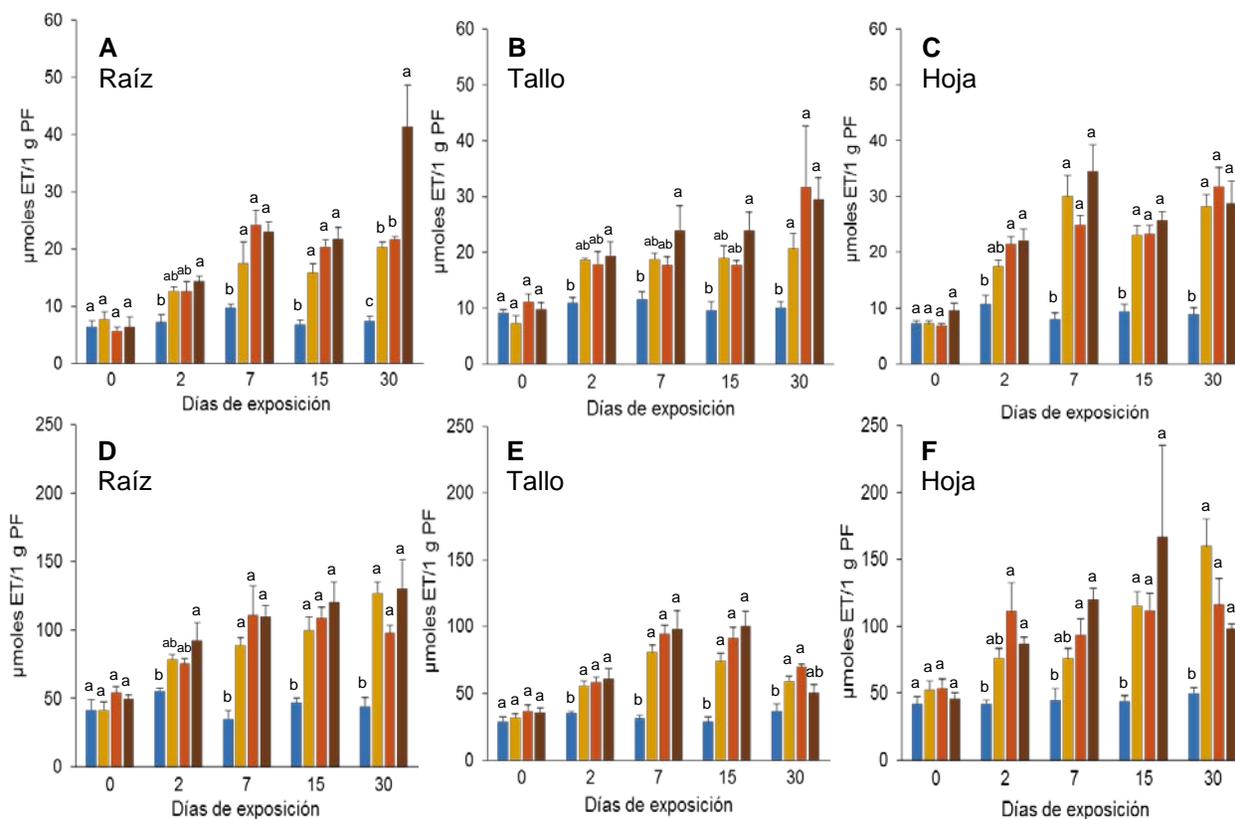
La figura 9 muestra la capacidad que tienen extractos de raíz, tallo y hoja de las plantas de *A. germinans* y *L. racemosa* para reducir el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ , bajo diferentes concentraciones de Pb exógeno; este poder reductor se asocia con la actividad antioxidante. Al comparar los extractos metanólicos correspondientes a los diferentes tratamientos con Pb con el control, podemos observar que, en todos los tejidos de ambas especies, hay un aumento de la capacidad antioxidante en los días analizados en comparación al tiempo cero.

Las raíces de *A. germinans* (Figura 9, A), tuvieron un aumento en la concentración de antioxidantes a partir del día dos de exposición al Pb, pero solo en el tratamiento con la concentración más alta del Pb. En los siguientes días, la actividad antioxidante aumentó de forma significativa y similar para todos los tratamientos con Pb, con aumentos del 116 al 230% en comparación con el control ( $7.7 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $17.8 \pm 1.3 \mu\text{mol/g}$  con Pb,  $p=9.235e-06$ ). Incluso, al finalizar el experimento se obtuvieron los valores más altos de actividad antioxidante a mayor concentración de Pb exógeno (aumento del 464%).

En los tallos (Figura 9, B), el aumento de la capacidad antioxidante fue significativo bajo el tratamiento con  $300 \mu\text{M}$  de Pb durante todos los días de medición; los valores más altos fueron del día 7 al 30, con aumentos del 83 al 130% comparados con el control ( $10.3 \pm 0.48 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $19.3 \pm 1.17 \mu\text{mol/g}$  con Pb,  $p=1.949e-05$ ). En las hojas (Figura 9, C) se encontró un aumento en la concentración de antioxidantes ( $8.9 \pm 0.5 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $23 \pm 1.2 \mu\text{mol/g}$  con Pb) de 175 a 208%, que fue significativo en los tres tratamientos con Pb ( $p=1.736e-07$ ) y en los todos los días analizados ( $p=0.001998$ ).

La *L. racemosa* fue la que, de manera inicial y aún en ausencia del metal, tuvo el poder reductor más alto en todos los tejidos, siendo cinco veces mayor que el poder reductor de *A. germinans* (Figura 9, D-F). En las raíces, se observó que el aumento antioxidante, en los primeros dos días, fue en plantas crecidas con la concentración más alta de Pb, y posteriormente la capacidad antioxidante aumentó en todas las concentraciones del metal

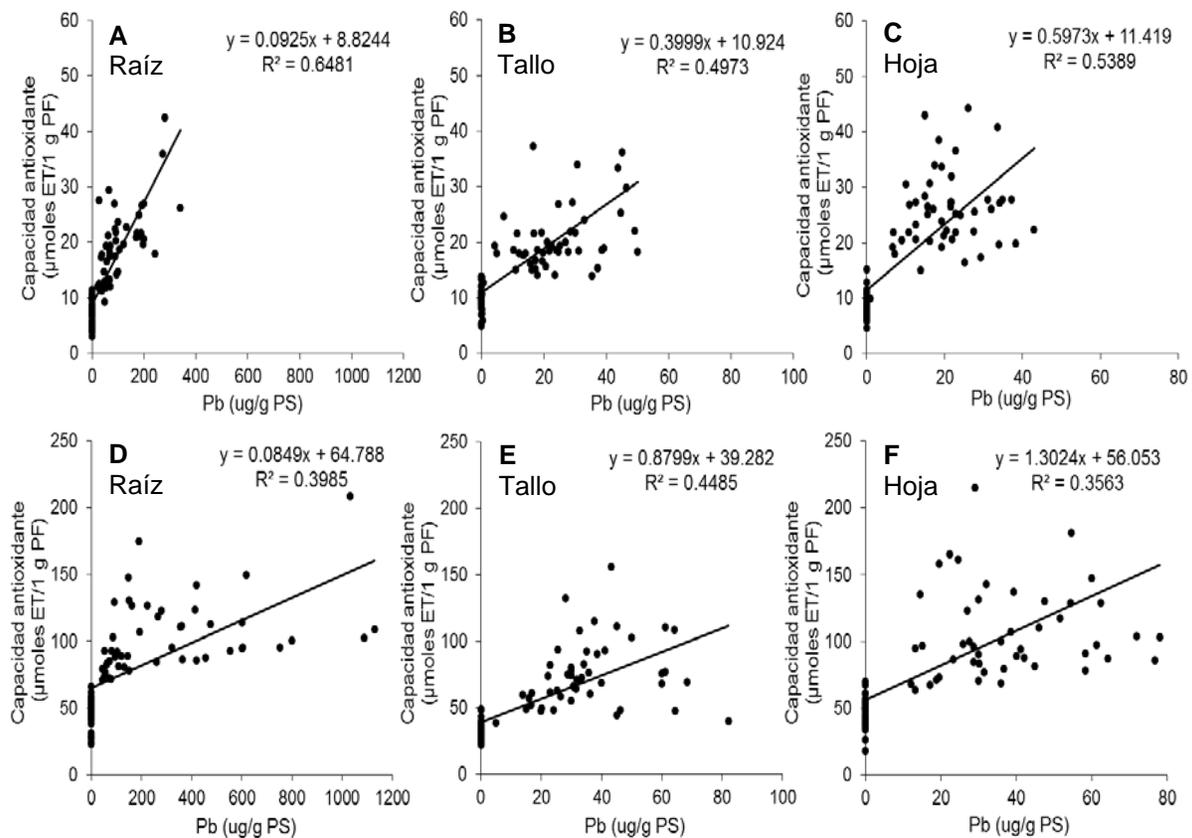
( $44.7 \pm 2.6 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $96.3 \pm 4.2 \mu\text{mol/g}$  con Pb). En los tallos, la actividad antioxidante tuvo el menor aumento; solo los días 7 y 15 tuvieron los valores más altos de antioxidantes ( $32.1 \pm 1.5 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $69.7 \pm 3.5 \mu\text{mol/g}$  con Pb). Las hojas, junto con la raíz, son los tejidos donde se encontró mayor actividad antioxidante por el efecto del Pb; en los días del 7 al 30 se observó el mayor aumento de esta actividad en los tres tratamientos con Pb ( $44.51 \pm 2.3 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $102.9 \pm 6.6 \mu\text{mol/g}$  con Pb). El aumento en la concentración de antioxidantes para *L. racemosa* fue de 123 a 158% en raíz, de 109 a 143% en tallo y de 133 a 162% en hoja con respecto al control.



**Figura 3.9** Concentración promedio de antioxidantes reductores de Fe III obtenidos en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F) expuestas a  $0\mu\text{M}$  (■),  $75\mu\text{M}$  (■),  $150\mu\text{M}$  (■) y  $300\mu\text{M}$  (■) de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  durante un periodo de 30 días. La escala del eje y en *A. germinans* es menor que en *L. racemosa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb, para cada día de exposición, para cada tejido y para cada especie,  $n=16$ ;  $p < 0.05$ . Las líneas indican el error estándar.

A pesar de que naturalmente *L. racemosa* tiene una mayor capacidad antioxidante, ambas especies solo tuvieron porcentajes similares de aumento en la reducción de  $\text{Fe}^{+3}$  en el tallo, y en los demás tejidos el aumento fue mayor en *A. germinans*. En la figura 10, en ambas

especies, se observa una tendencia significativa donde a mayor concentración de plomo en los tejidos, mayor es la capacidad antioxidante (Raíz:  $p=2.27e-19$  en *A. germinans* y  $p=3.44e-10$  en *L. racemosa*, tallo:  $p=2.83e-13$  en *A. germinans* y  $p=1.1e-11$  en *L. racemosa*, hoja:  $p=9.35e-15$  en *A. germinans* y  $p=5.09e-09$  en *L. racemosa*). En *A. germinans* las pendientes de la recta en todos los tejidos fueron más pronunciadas que en *L. racemosa* con un valor de  $R^2$  más alto en la raíz, seguida de la hoja y finalmente del tallo. En el caso de *L. racemosa* la magnitud del efecto del Pb sobre la capacidad antioxidante por reducción de  $Fe^{+3}$  fue mayor en el tallo, seguido de la raíz y después la hoja.

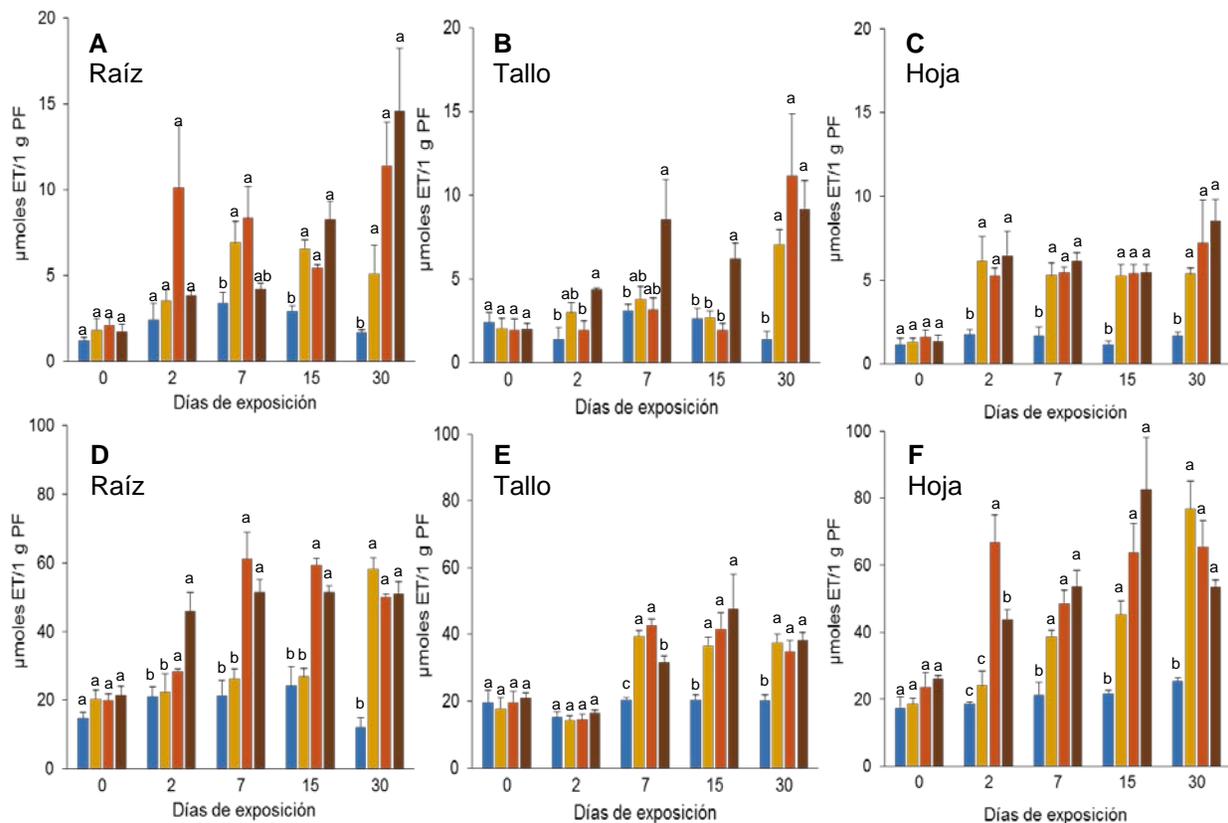


**Figura 3.10** Relación entre la concentración promedio de Pb y la concentración promedio de antioxidantes reductores de Fe III encontrados en cada tejido de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F), bajo todos los tratamientos y durante 30 días de exposición,  $p < 0,05$ . Las escalas de los ejes son diferentes entre especies y entre tejidos.

### 3.6.2 Captación de radicales libres

En la figura 11 (A, B, C) se puede observar que *A. germinans* presenta inicialmente una menor capacidad antioxidante, con concentraciones similares entre tejidos, pero al ser

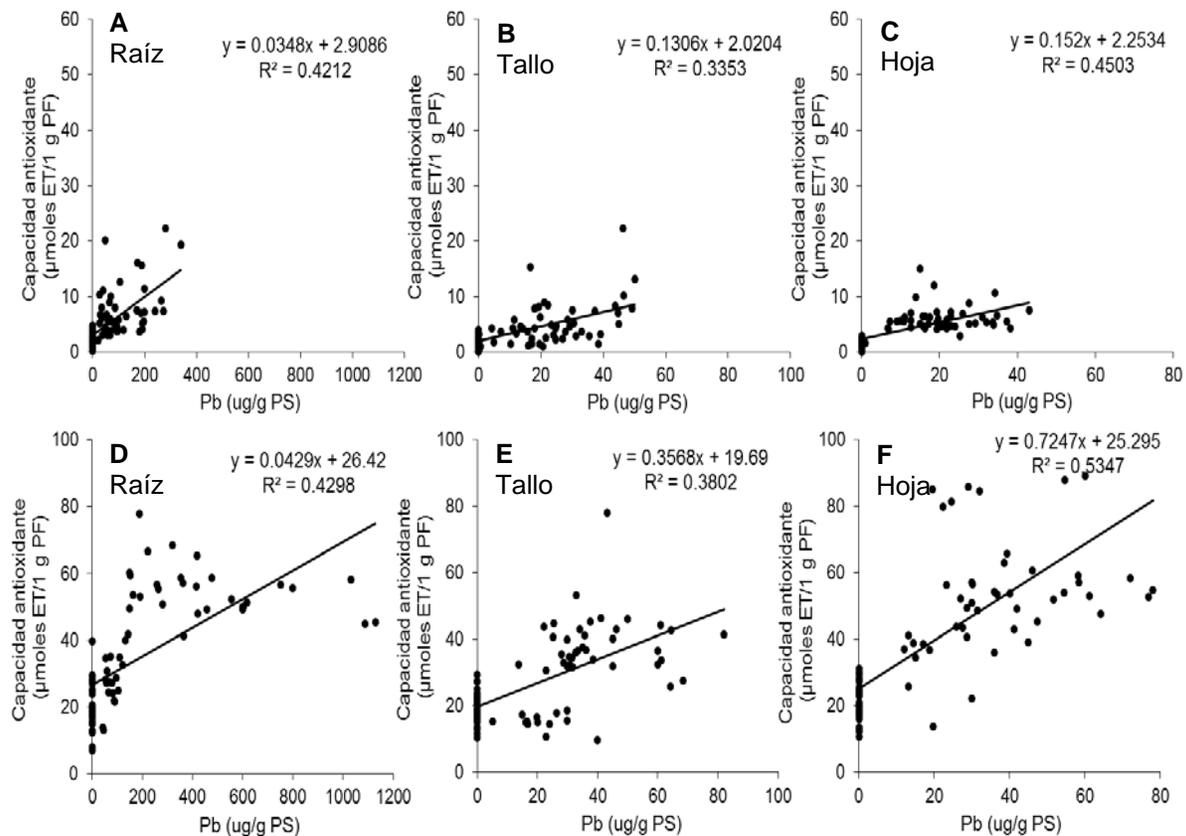
expuesta a las diferentes concentraciones de Pb fue capaz de aumentar la captura de radicales libres.



**Figura 3.11** Concentración promedio de antioxidantes captadores de radicales libres obtenida en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A-C) y *Laguncularia racemosa* (D-F) expuestas a 0µM (■), 75µM (■), 150µM (■) y 300µM (■) de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> durante un periodo de 30 días. La escala del eje “y” en *A. germinans* es menor que en *L. racemosa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos con Pb para cada día de exposición, para cada tejido y para cada especie, n=16; p < 0.05. Las líneas indican el error estándar.

En la raíz de estas plantas, se encontró un incremento de antioxidantes ( $p= 0.00029$ ) en un rango 120 a 282% con respecto al blanco en los tres tratamientos con el Pb desde el día siete hasta finalizar el experimento ( $2.3 \pm 0.28 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $6.6 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$  con Pb). En el tallo, se observó la mayor actividad en plantas crecidas con la concentración más alta de Pb ( $p= 0.0002$ ), solo en el día 30 el aumento fue en todos los tratamientos con Pb y fue el de mayor significancia ( $p=7.2\text{e-}05$ ) ( $2.2 \pm 0.26 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $4.77 \pm 0.5 \mu\text{mol/g}$  con Pb; porcentajes promedio de incremento en plantas expuestas a Pb de 137 a 270%). En las hojas, se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante de todas

las plantas que fueron expuestas con el Pb en comparación con el control ( $p=1.033e-07$ ) diferenciándose también entre días de medición ( $p= 0.00012$ ) ( $1.5 \pm 0.1 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $5.3 \pm 0.3 \mu\text{mol/g}$  con Pb; porcentajes promedio de incremento en plantas expuestas a Pb de 257 a 328%). No hubo diferencias estadísticas entre los tejidos de *A. germinans* ( $p= 0.055$ ).



**Figura 3.12** Relación entre la concentración promedio de Pb y la concentración promedio de antioxidantes captadores de radicales libres en tejidos de plantas de *Avicennia germinans* (A) y *Laguncularia racemosa* (B), bajo todos los tratamientos y durante 30 días de exposición,  $p < 0,05$ . Las escalas de los ejes son diferentes entre especies y entre tejidos.

En la figura 11 (D, E, F) también se muestra la capacidad captadora del radical libre de *L. racemosa* en donde se observa un aumento de su actividad antioxidante al ser expuestas al Pb. El aumento en raíz, en los primeros dos días, solo se dio en plantas tratadas con 300  $\mu\text{M}$  de Pb y con el tiempo ( $p= 9.9e-07$ ) fue evidente en todas las plantas expuestas al Pb diferenciándose del control ( $p= 2.4e-10$ ), con porcentajes de incremento del 87 al 173% ( $18.7 \pm 4 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $41 \pm 2.2 \mu\text{mol/g}$  con Pb). En el tallo, en las últimas tres

semanas, se incrementó significativamente la capacidad antioxidante con respecto al control ( $p=0.00075$ ), aunque fue similar entre tratamientos con Pb y fue el tejido donde se encontró la menor actividad antioxidante ( $p=0.021$ ) con porcentajes del 86 al 95% ( $19.1 \pm 0.96 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $31.1 \pm 1.7 \mu\text{mol/g}$  con Pb). En las hojas, en comparación con los otros tejidos, se acumuló una mayor concentración de antioxidantes ( $p=0.014$ ) en todos los días analizados principalmente en el día 15 y 30 ( $p= 4.527\text{e-}05$ ) con aumentos de 131 a 169% en comparación con el control ( $p= 2.220\text{e-}09$ ) ( $21 \pm 1.1 \mu\text{mol/g}$  en el control y  $51 \pm 2.9 \mu\text{mol/g}$  con Pb).

A pesar de que *L. racemosa* tiene naturalmente una mayor capacidad antioxidante, fue *A. germinans* la especie que tuvo un mayor incremento en la concentración de estas moléculas debido a la presencia de Pb en los tres tejidos. Los análisis de regresión (Figura 12) muestran una tendencia en la cual a mayor acumulación de Pb mayor será la acumulación de antioxidantes con valores de  $R^2$  más altos en la hoja a diferencia del tallo.

## DISCUSIÓN

A mayor contaminación de Pb en el suelo, y mayor permanencia de las plantas bajo estas condiciones, mayor será la capacidad de acumulación en las raíces de *A. germinans* y *L. racemosa*. En estas especies la translocación del Pb de la raíz a los tejidos aéreos se observó principalmente en las hojas de *L. racemosa* y solo bajo una alta contaminación de Pb en el sustrato y un mayor tiempo de exposición (Tabla 1). Son escasos los estudios realizados en laboratorio que apoyen la alta capacidad de acumulación de Pb en *L. racemosa*; un estudio previo (Cabañas-Mendoza, 2014) demostró que la acumulación de Pb fue similar en *A. germinans* y *L. racemosa*, por lo que dicha capacidad puede variar y depender de otras variables como las condiciones ambientales (Fritioff *et al.*, 2005).

Asimismo, *L. racemosa*, a pesar de acumular un mayor contenido de Pb, también fue la especie que tuvo la mayor tolerancia (poco daño físico visible y la menor reducción en la asimilación de  $\text{CO}_2$  y en el crecimiento) que ya había sido señalado anteriormente por Cabañas-Mendoza (2014). Incluso, en las últimas semanas de medición, las plantas mostraron un aumento en los valores de crecimiento. Se ha observado que algunas especies arbóreas pueden mejorar su funcionamiento cuando se encuentran bajo condiciones estresantes (fenómeno del disturbio intermedio: Vega y Peters, 2003); tal es el

caso de *Quercus oleoides*, que al estar presente en suelos contaminados con bajo nivel de diésel (2 y 3.5%) pueden mostrar una tasa fotosintética y un crecimiento mayor en comparación con plantas sin diésel (Castro-Mancilla *et al.*, 2019). Este fenómeno probablemente pueda suceder en *L. racemosa* que es capaz de mantener sus actividades fisiológicas aún en altas concentraciones de Pb (300µM), lo que la haría más eficiente para la fitorremediación de suelos.

**Tabla 3.1** Análisis de varianza factorial de los parámetros analizados en *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* para las diferentes concentraciones de Pb (4) y tiempos de exposición (5). El factor tejido vegetal se consideró anidado dentro de las especies.

| Variable respuesta             | Fuente de variación         | Gl  | ECM     | F       | p          |
|--------------------------------|-----------------------------|-----|---------|---------|------------|
| Pb                             | Tratamiento Pb              | 2   | 246124  | 226.987 | < 0.001    |
|                                | Día de exposición           | 1   | 518701  | 478.369 | < 0.001    |
|                                | Especies                    | 5   | 614968  | 567.152 | < 0.001    |
|                                | Tratamiento : día           | 2   | 91918   | 84.771  | < 0.001    |
|                                | Tratamiento : especie       | 10  | 103360  | 95.323  | < 0.001    |
|                                | Día : especie               | 5   | 245870  | 226.753 | < 0.001    |
|                                | Tratamiento : día : especie | 10  | 48077   | 44.339  | < 0.001    |
|                                | Residuales                  | 252 | 1084    |         |            |
| Peso fresco planta             | Tratamiento Pb              | 3   | 318.31  | 3.8959  | 0.01032 *  |
|                                | Día de exposición           | 1   | 15.59   | 0.1908  | 0.6629     |
|                                | Especies                    | 1   | 1738.94 | 21.2836 | < 0.001    |
|                                | Tratamiento : día           | 3   | 56.99   | 0.6975  | 0.555      |
|                                | Tratamiento : especie       | 3   | 155.54  | 1.9038  | 0.1316     |
|                                | Día : especie               | 1   | 707.98  | 8.6653  | 0.0037 **  |
|                                | Tratamiento : día : especie | 3   | 36.6    | 0.448   | 0.719      |
|                                | Residuales                  | 144 | 81.7    |         |            |
| Altura total planta            | Tratamiento Pb              | 3   | 1085.99 | 7.9201  | < 0.001    |
|                                | Día de exposición           | 1   | 1599.76 | 11.667  | < 0.001    |
|                                | Especies                    | 1   | 1.43    | 0.0104  | 0.9189     |
|                                | Tratamiento : día           | 3   | 138.96  | 1.0134  | 0.3887     |
|                                | Tratamiento : especie       | 3   | 562.28  | 4.1007  | 0.0079 **  |
|                                | Día : especie               | 1   | 1539.46 | 11.2272 | 0.00102 ** |
|                                | Tratamiento : día : especie | 3   | 47.65   | 0.3475  | 0.79101    |
|                                | Residuales                  | 144 | 137.12  |         |            |
| Asimilación de CO <sub>2</sub> | Tratamiento Pb              | 3   | 42141   | 27.8892 | < 0.001    |
|                                | Día de exposición           | 1   | 24533   | 16.236  | < 0.001    |
|                                | Especies                    | 1   | 37453   | 24.7861 | < 0.001    |
|                                | Tratamiento : día           | 3   | 17785   | 11.7702 | < 0.001    |
|                                | Tratamiento : especie       | 3   | 13876   | 9.1831  | < 0.001    |
|                                | Día : especie               | 1   | 115     | 0.0759  | 0.7833     |
|                                | Tratamiento : día : especie | 3   | 8951    | 5.9237  | < 0.001    |
|                                | Residuales                  | 144 | 1511    |         |            |

### CAPÍTULO III

|                                      |                             |     |         |          |         |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----|---------|----------|---------|
| Prolina                              | Tratamiento Pb              | 3   | 364.88  | 83.683   | < 0.001 |
|                                      | Día de exposición           | 1   | 324.42  | 74.4038  | < 0.001 |
|                                      | Especies                    | 5   | 226.54  | 51.9551  | < 0.001 |
|                                      | Tratamiento : día           | 3   | 43.59   | 9.9961   | < 0.001 |
|                                      | Tratamiento : especie       | 15  | 15.77   | 3.6178   | < 0.001 |
|                                      | Día : especie               | 5   | 25      | 5.7326   | < 0.001 |
|                                      | Tratamiento : día : especie | 15  | 21.02   | 4.8197   | < 0.001 |
|                                      | Residuales                  | 432 | 4.36    |          |         |
| Antioxidantes<br>(Fe <sup>3+</sup> ) | Tratamiento Pb              | 3   | 25322   | 51.3701  | < 0.001 |
|                                      | Día de exposición           | 1   | 32061   | 65.0406  | < 0.001 |
|                                      | Especies                    | 5   | 87400   | 177.3067 | < 0.001 |
|                                      | Tratamiento : día           | 3   | 3546    | 7.1934   | < 0.001 |
|                                      | Tratamiento : especie       | 15  | 2153    | 4.3672   | < 0.001 |
|                                      | Día : especie               | 5   | 2984    | 6.0545   | < 0.001 |
|                                      | Tratamiento : día : especie | 15  | 877     | 1.78     | 0.035 * |
|                                      | Residuales                  | 432 | 493     |          |         |
| Antioxidantes<br>(radical libre)     | Tratamiento Pb              | 3   | 4770.6  | 58.9042  | < 0.001 |
|                                      | Día de exposición           | 1   | 9908    | 122.3365 | < 0.001 |
|                                      | Especies                    | 5   | 23402.3 | 288.9539 | < 0.001 |
|                                      | Tratamiento : día           | 3   | 1079.2  | 13.3257  | < 0.001 |
|                                      | Tratamiento : especie       | 15  | 714.8   | 8.8255   | < 0.001 |
|                                      | Día : especie               | 5   | 1106.8  | 13.6661  | < 0.001 |
|                                      | Tratamiento : día : especie | 15  | 224.2   | 2.7686   | < 0.001 |
|                                      | Residuales                  | 432 | 81      |          |         |

Se muestran ANOVAS para cada variable y posibles interacciones entre variables; grados de libertad (gl), error cuadrático medio (ECM). Códigos de significancia: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

La prolina y la capacidad antioxidante son considerados como mecanismos de tolerancia al ayudar a la quelación y secuestro de metales así como a la eliminación de radicales libres (Celedón *et al.*, 2012; Luna-Esquivel *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2016). Las especies de manglar analizadas en este estudio presentaron un claro aumento en ambos parámetros a medida que aumentaba la acumulación de Pb en los tejidos (Tabla 1). *A. germinans* aumenta principalmente su concentración de antioxidantes a diferencia de *L. racemosa* que tiene un mayor aumento de prolina.

*L. racemosa* tuvo una respuesta más eficiente ya que, al parecer, la concentración de prolina y la gran concentración de antioxidantes que presenta naturalmente esta especie, le ayudó a contrarrestar el estrés requiriendo un menor incremento de estas moléculas en la primera semana de exposición; solo a mayor tiempo de permanencia con el metal pesado

necesitó incrementar en mayor concentración la prolina y los antioxidantes para disminuir la toxicidad, lo cual se vio reflejado en la ausencia de daños morfológicos importantes. Por el contrario, *A. germinans* es menos tolerante ya que, con una menor concentración de Pb en los tejidos, requiere aumentar la concentración de prolina y antioxidantes desde los primeros días de exposición haciéndose mayor este aumento a mayor exposición al metal, aun así el aumento de estos mecanismos no fue suficiente para contrarrestar los efectos dañinos del Pb en las hojas de esta especie.

En otros estudios se ha encontrado que, en tejidos de plantas como *Cicer arietinum*, *Brassica oleracea* y *Salvinia minima*, también hay un mayor contenido de prolina a mayor concentración de metales pesados como Cr, Zn, Cd y Ni; este indicador también se ha relacionado con el aumento en la concentración de malondialdehído un producto de la peroxidación lipídica, por lo que a mayor concentración de metales pesados, mayor estrés oxidativo y mayor acumulación de prolina que podría tener una función protectora ante la peroxidación de lípidos de la membrana (Theriappan *et al.* 2011; Fuentes, 2017; Saif y Khan, 2018).

Yan y Tam (2012) reportan que la especie de manglar *Acanthus ilicifolius* tuvo un mayor incremento en la concentración de prolina, al día 49 de exposición al Pb (800 mg/Kg de nitrato de Pb exógeno), en las hojas (15 mg/Kg de prolina bajo 112 mg/kg de Pb en tejido) y la raíz (9 mg/kg de prolina bajo 2494 mg/kg de Pb en tejido). Para la especie *Kandelia obovata* no hubo algún cambio en la concentración de este aminoácido en todo el experimento, lo cual se deba probablemente a que tuvo una baja acumulación de Pb (9 mg/Kg en hoja y 425 mg/Kg en hoja) y a que prefiera incrementar la actividad enzimática del antioxidante superóxido dismutasa. Nuestro estudio concuerda con los resultados encontrados por estos autores ya que hubo valores de incremento similares y una mayor respuesta en la hoja, pero las especies aquí analizadas tuvieron una respuesta más rápida. Ambos trabajos demuestran como las especies de manglar difieren en su capacidad para hacer uso de este indicador y, en el caso de nuestra investigación, se aportan nuevos datos sobre la respuesta de la prolina ante la presencia del Pb en este tipo de especies.

El uso de antioxidantes es la estrategia principal que utilizan las plantas contra el aumento en la producción de EROs que causan los metales pesados. En este trabajo, se utilizaron dos técnicas para conocer la capacidad antioxidante no enzimática: un método que se basa

en el poder reductor de un antioxidante para reducir el ion férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) al ion ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ); y un método que estudia la habilidad de un antioxidante para estabilizar e inactivar a un radical libre, en este caso el DPPH, mediante a la donación de un átomo de hidrógeno.

Estas técnicas no han sido usadas en otros estudios en especies de manglar (ej. MacFarlane y Burchett, 2001; Bhaduri *et al.*, 2012; Thatoi *et al.*, 2014). Por lo general, han evaluado la capacidad antioxidante ante la defensa por metales pesados a través de la medición de enzimas peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, donde se ha encontrado que especies como *Acanthus ilicifolius*, *Avicennia marina*, *Kandelia candel*, *Kandelia obovata* aumentan la actividad de dichas enzimas entre mayor es el contenido de Zn, Pb o Cu en hoja y principalmente en la raíz; en algunos estudios, cuando la contaminación o el tiempo de exposición son muy altos, la efectividad de estos mecanismos disminuye (Rahman *et al.*, 2012; Yan y Tam, 2012). En nuestro estudio, también se encontró que el incremento de la capacidad antioxidante se produce a mayor acumulación de Pb, pero el tiempo es el factor más importante para que la respuesta sea más evidente, además de que en *A. germinans* y *L. racemosa* la hoja es el tejido que presenta un mayor incremento. Los valores de incremento reportados en dichos trabajos varían mucho en comparación con los valores aquí encontrados, mostrando que la respuesta de la capacidad antioxidante ante la presencia de metales pesados depende de la inversión de energía y eficiencia de la maquinaria propia de cada especie.

En resumen, el análisis de los resultados confirma que hay un efecto tóxico del Pb en ambas especies, pero también tienen la capacidad de aumentar los productos antioxidantes, así como producir osmolitos como la prolina para contrarrestar la toxicidad. Los resultados obtenidos abren un conjunto de posibilidades para obtener un mejor conocimiento de los mecanismos de toxicidad inducidos por metales pesados en estas plantas, por lo que es necesario conocer la respuesta de otros mecanismos de tolerancia para tener un panorama más completo del funcionamiento de estas especies.

## CONCLUSIÓN

A pesar de que el plomo ha demostrado ser un metal altamente tóxico, se corroboró que *Laguncularia racemosa* no solo es eficiente en su acumulación, sino que puede ser más tolerante al no presentar daños visibles en su morfología, en su fisiología y tampoco en el

crecimiento. En ambas especies, se demostró que el Pb puede provocar un aumento en el contenido de prolina principalmente en *L. racemosa*.

*L. racemosa* inicialmente presenta una mayor concentración de antioxidantes, en comparación con *A. germinans*, por lo que en presencia de Pb no requiere aumentar en forma importante la concentración de antioxidantes, a menos que el estrés sea alto (una alta concentración de Pb en el suelo y un mayor tiempo de exposición) lo que podría traducirse en una mayor eficiencia en el uso de estos compuestos. Un mayor incremento en estos mecanismos de respuesta no implica necesariamente una mayor tolerancia por parte de la especie, como fue el caso *A. germinans* que a pesar de tener porcentajes de incremento mayores, principalmente en la capacidad antioxidante, tuvo la mayor disminución fotosintética y la mayor clorosis en hojas.



## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN GENERAL

Las especies de manglar presentan adaptaciones morfológicas que les han permitido sobrevivir a las condiciones ambientales extremas de su entorno; en el caso de México, estas especies además han podido sobrellevar la alta contaminación por metales pesados presentes en las lagunas costeras. En condiciones normales, estas especies son capaces de acumular diversos metales pesados en sus tejidos principalmente en la raíz, la cual es más eficiente a mayor contaminación y a mayor permanencia de las plantas en suelos contaminados (e. g. Ong Che, 1999; Qiu *et al.*, 2011; Cabañas-Mendoza, 2014; Qui y Qui, 2017). Hay una baja translocación de metales pesados a las partes aéreas debido a la banda de Caspari de la endodermis de la raíz que sirve como barrera (García, 2006); en el caso de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*, el tallo parece funcionar solo como transportador de Pb y no como reservorio, siendo la hoja el tejido aéreo que pudiera acumular la mayor concentración del metal pesado (capítulo II y III).

Una alta acumulación de Pb en *L. racemosa* y principalmente en *A. germinans* produce efectos negativos en la fotosíntesis y en el crecimiento de plantas con daños físicos visibles en las hojas. No obstante, también produce un aumento en la concentración de prolina y de antioxidantes no enzimáticos en los tejidos que funcionan como mecanismos de tolerancia al estrés.

Plantas de *L. racemosa* pueden ser más tolerantes al Pb y tener una mayor eficiencia de los mecanismos de tolerancia, a pesar de acumular concentraciones mayores de Pb; esta especie tiene una alta capacidad antioxidante, al ser expuesta a bajas concentraciones del metal pesado y a poco tiempo de exposición esta concentración natural de antioxidantes parece ser suficiente para sobrellevar el estrés, por lo que el incremento de estos mecanismos es bajo, pero cuando las condiciones son más extremas se da un mayor incremento en las concentraciones de prolina y antioxidantes. En plantas menos tolerantes, como las de *A. germinans*, el incremento de estos mecanismos se da al poco tiempo de exposición y, a pesar de que puede alcanzar los porcentajes de aumento más altos a mayor periodo de exposición, estos no son suficientes para contrarrestar la toxicidad del Pb

(capítulo III); no obstante, *A. germinans* podría ser más eficiente en sitios con baja contaminación.

Con respecto a otras especies de manglar en México, se sabe que *Rhizophora mangle* es una especie vulnerable a la contaminación por Pb, tiene baja capacidad para acumularlo, y presenta alta toxicidad tanto en su fisiología como en su morfología (Cabañas-Mendoza, 2014); los mecanismos de respuesta de esta especie al parecer son principalmente de defensa, es decir, que limitan la entrada de los metales pesados a las células de las plantas (Walsh *et al.*, 1979), probablemente esto pueda explicar su baja tolerancia. Por otro lado, *Conocarpus erectus* ha sido considerada como posible hiperacumuladora ya que a mayor presencia de arsénico y cadmio en el suelo hay una mayor acumulación de estos en la raíz y brotes, no obstante, las plantas se vuelven poco tolerantes debido a que el crecimiento (altura y biomasa), el contenido de agua foliar y la concentración de clorofila se ven afectados (Hussain *et al.*, 2017; Ashraf *et al.* 2018).

La tolerancia de estas especies está en función de la concentración de metales pesados que puedan ser acumulados en los tejidos y, a su vez, la capacidad de acumulación no solo va a depender de la especie sino también del grado de disponibilidad en la que se encuentren los metales pesados. Las condiciones ambientales afectan la movilización y disponibilidad de los metales pesados en las plantas, debido a la modificación de las propiedades fisicoquímicas del sustrato (e. g. Atkinson *et al.*, 2007; Leblebici *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2012; Gharaibeh *et al.*, 2015).

La salinidad afecta negativamente la acumulación de Pb en las raíces de *A. germinans* y *L. racemosa* y es más evidente a periodos largos de exposición (capítulo II); esta disminución en la acumulación de Pb puede deberse a la competencia del metal pesado con otros cationes por los sitios de adsorción o formar complejos con aniones que lo precipitan (Leonard *et al.*, 2011), o bien los iones de sodio podrían competir con el Pb por los transportadores de membrana (Mei *et al.*, 2014) y por lo tanto habría una menor toma del Pb. Una mayor salinidad en el sustrato también influye en un aumento del pH, por la acumulación de sodio, calcio y otros iones presentes en la sal de mar, además un pH alcalino tiende a precipitar los metales pesados debido a la formación de complejos (Alloway, 1995). La salinidad también repercute en la translocación del Pb a las partes

aéreas ya que se da un aumento en la acumulación de las hojas, este comportamiento podría ser atribuido a las adaptaciones fisiológicas y morfológicas propias de estas dos especies ya que se sabe que tanto *A. germinans* como *L. racemosa* presentan glándulas especializadas en las hojas que funcionan para eliminar el exceso de sal del suelo (Esteban *et al.*, 2013) eliminando, a su vez, el exceso de Pb de la planta (MacFarlane y Burchett, 2000).

Para tener una mejor comprensión de cómo se vería afectada la acumulación de Pb en el ecosistema hay que tomar en cuenta la distribución espacial de estas especies y cuáles serían las condiciones del sitio que influirán en la especiación del metal pesado y en su captación por parte de las plantas. La zonación común de las especies de manglar consta de una parte más externa conocida como “zona de incidencia del oleaje” y está caracterizada por individuos de *R. mangle* que crecen sobre el suelo hasta quedar sumergidas en el agua de manera semipermanente soportando salinidades cercanas al mar. A esta zona pionera le sigue usualmente una franja dominada por *A. germinans* la cual puede crecer en sitios semi inundados temporalmente y llegar a tolerar altas concentraciones de sal; esta zona puede estar asociada a individuos de *L. racemosa* que crecen preferentemente en suelos drenados y con una baja salinidad. La zona más interna del manglar está compuesta por individuos de *C. erectus* que crecen en terreno firme donde no hay presencia de mareas y la salinidad es muy baja (Reese, 2009; Pannier y Fraïno de Pannier, 1989). Es posible que organismos de diferentes poblaciones presenten una respuesta diferente a las condiciones ambientales, debido a que estas pueden variar de un lugar a otro dependiendo del sitio, por lo que responderán de manera diferente a la contaminación por metales pesados (Deruytter *et al.*, 2017).

El Pb tiene poca movilidad, se retiene por corto tiempo en el agua ya que tiene una alta afinidad con la materia orgánica y a pH alcalino puede precipitar como hidróxido, estas características por lo general lo hacen ser de baja asimilación para las plantas (Manousaki *et al.*, 2009; Manousaki & Kalogerakis, 2009). En estuarios y lagunas costeras la fase estable dominante es el carbonato de plomo ( $\text{PbCO}_3$ ) que presenta una elevada solubilidad principalmente en aguas superficiales, volviéndose inestable en condiciones ácidas; por otro lado, los sulfatos se reducen a sulfuros donde se forman compuestos insolubles como el sulfuro de plomo ( $\text{PbS}$ ) que es estable bajo condiciones reductoras (Hernández, 2012).

Por lo tanto, la forma en que puede encontrarse el Pb en el medio y la influencia de las condiciones ambientales sobre su especiación hacen que este elemento sea poco disponible, por lo que los manglares podrían funcionar más como reservorios de metales pesados.

El hecho de que *L. racemosa* este adaptada a sitios con baja salinidad e inundación donde la disponibilidad de metales pesados puede ser mayor, que presente una mayor eficiencia de los indicadores de tolerancia, como la prolina y los antioxidantes, y por lo tanto menor daño, así como una mayor acumulación de Pb aún bajo condiciones de salinidad, la hace una mejor candidata a las tecnologías de fitorremediación en zonas de manglar. No obstante, para tener un mejor conocimiento de las especies, es necesario realizar protocolos en campo que permitan conocer de manera específica el comportamiento de los metales pesados y de las especies en el ecosistema.

### CONCLUSIONES GENERALES

- Las especies de manglar pueden aclimatarse a condiciones de contaminación por Pb, ya que su absorción y acumulación en la raíz es mayor a mayor tiempo de exposición.
- La estabilización de Pb en las raíces, y su menor acumulación en tallo y hoja, es muy común en especies de manglar y se ha asociado con un mecanismo que le confiere tolerancia a las plantas ante la toxicidad. No obstante, a pesar de la baja translocación que hay hacia la parte aérea, la hoja suele ser el tejido que presenta más daños asociados al Pb. El tallo podría servir solo como un medio de transporte del Pb a la parte aérea de la planta.
- La salinidad influye en el pH del sustrato, en la disponibilidad y translocación de Pb en *A. germinans* y *L. racemosa*.
- La mayor acumulación de Pb en los tejidos de *L. racemosa* generó un aumento en la concentración de prolina y antioxidantes, sugiriendo una mayor tolerancia.
- El comportamiento de los parámetros, evaluados a lo largo de todo el trabajo, se vió más afectado a mayor concentración de Pb; sin embargo, el tiempo de exposición fue el factor más importante para que el daño por Pb fuera más evidente.

Hay que tomar en cuenta que en las especies arbóreas, al presentar una mayor biomasa, inicialmente el Pb no sería lo suficientemente tóxico hasta cierto límite de estrés, que es hasta cuando se disparían los mecanismos de tolerancia para disminuir el daño por el metal pesado.

- *L. racemosa* podría ser un buen candidato para los programas de restauración en áreas de manglar, por su capacidad para acumular Pb, presentar una menor toxicidad, una mayor respuesta de los indicadores de tolerancia analizados y por crecer en condiciones donde la disponibilidad del Pb podría ser mayor.

## **PERSPECTIVAS**

Ya se ha demostrado en muchos estudios la capacidad de acumulación a metales pesados que tienen las especies de manglar y la toxicidad que pueden causar en el desarrollo y crecimiento de las plantas. No obstante, los efectos que producen estos contaminantes en los mecanismos de defensa y tolerancia, así como la influencia de las variables ambientales en su disponibilidad, han sido muy poco estudiados o se han analizado en especies de otros países. Por lo que este trabajo genera información novedosa e importante sobre el comportamiento de especies dominantes de manglar en México.

Sin embargo, es necesario realizar más estudios en donde se analicen otras variables ambientales sobre la disponibilidad de los metales pesados, ya sea de manera individual o conjunta, y así determinar si realmente existe una alta toxicidad de los metales pesados en los manglares o solo sirven como fuente de almacenamiento; o bien, realizar análisis *in situ* para detectar zonas con disponibilidad de los metales pesados para las plantas.

También es importante obtener información más amplia, a nivel bioquímico y genético, sobre otros mecanismos de defensa y tolerancia, así como el papel que juegan las adaptaciones morfológicas en la detoxificación, para crear un panorama más completo de cómo es que funcionan y evolucionan las especies de manglar ante la alta contaminación por metales pesados presente en las lagunas costeras de México.

## LITERATURA CITADA

- Al-Khashman, O. A. (2004). Heavy metal distribution in dust, street dust and soils from the work place in Karak industrial estate, Jordan. *Atmospheric environment*, 38, 6803-6812.
- Alloway, B. J. (1995) Soil process and the behavior of the heavy metals, en *Heavy metals in soils*, B. J. Alloway (ed.). Blackie Academic and Professional. Pp. 38-57.
- Alvarado, J., N. Dasgupta-Schubert, E. Ambriz, M. Sánchez-Yañez y J. Villegas (2011). Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27, 357-364.
- Álvarez, R., H. Rosales y E. Carranza (1986). Heavy metals in Blanco river sediments, Veracruz, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 13, 1-10.
- Aránguiz, F., H. Gaete, M. E. Hidalgo y G. Lobos (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.
- Ashraf, F., G. Abbas, B. Murtaza, M. Amjad, M. Muhammad, M. A. M. Saqib, N. Khan Niazi, A. Zakir, M. Hussain and R. Shabir (2018). Comparative tolerance and phytostabilization potential of *Conocarpus erectus* and *Eucalyptus camaldulensis* grown in cadmium contaminated soil.
- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C). (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Byrds Press. EE. UU. pp. 762.
- Atkinson, A., D. F. Jolley y L. Simpson (2007). Effect of overlying water pH, dissolved oxygen, salinity and sediment disturbances on metal release and sequestration from metal contaminated marine sediments. *Chemosphere*, 69, 1428-1437.
- Avello, M. y M. Suwalsky (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494, 161–172.
- Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205–207.
- Bhaduri, A. M. and M. H. Fulekar (2012). Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 11, 55–69.

- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier and C. Berset (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Botello, A. V. y F. Páez-Osuna (1986). El problema crucial: la contaminación, en: Serie Medio Ambiente en Coatzacoalcos. Centro de Ecodesarrollo. México. pp. 62-85.
- Botello, A. V., G. Ponce-Vélez y F. Villanueva (1999). Procesos de contaminación de humedales en el sureste de México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 49, 57-73.
- Botello, A. V., J. Rendón von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (2005). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 696.
- Botello, A. V., F. Páez-Osuna, L. Méndez-Rodríguez, M. Betancourt-Lozano, S. Álvarez-Borrego y R. Lara-Lara (2014). Pacífico mexicano, Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. UAC, UNAM-ICMYL, CIAD-MAZATLÁN, CINBOR, CICESE. México. pp. 930.
- Cabañas-Mendoza, M. (2014). Efectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos de la exposición al plomo en las especies *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa* y *Rhizophora mangle*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. pp. 98.
- Campos, N. y M. Gallo (1997). Contenidos de Cd, Cu y Zn en *Rhizophora mangle* y *Avicennia germinans* de la ciénaga grande de Santa Marta y Bahía de Chengue, Costa Caribe Colombiana. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, 21, 73–90.
- Caso, M., I. Pisanty y E. Ezcurra (2004). Diagnóstico ambiental del Golfo de México, Vol. 2. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Instituto de Ecología A.C. y Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies. México. pp. 683-712.
- Castro-Mancilla, Y. V., E. de la Rosa-Manzano, S. Castro-Nava y J. G. Martínez-Avalos (2019). Physiological responses of *Quercus oleoides* (Schltdl & Cham) to soils contaminated by diesel. *Plant Production Science*, 22(4), 519-529.
- Celedón, M., M. Gil, R. Ferreyra, P. Maldonado and C. Barrera (2012). Sensitivity and variability of two plant water stress indicators: exploring criteria for choosing a plant monitoring method for avocado irrigation management. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72, 379–387.

- Cheng, H., Y. Liu, N. F. Y. Tam, X. Wang, S. Y. Li, G. Z. Chen y Z. H. Ye (2010). The role of radial oxygen loss and root anatomy on zinc uptake and tolerance in mangrove seedlings. *Environmental Pollution*, 158, 1189-1196.
- Cheng, H., Y. S. Wang, Z. H. Ye, D. T. Chen, Y. T. Wang, Y. L. Peng y L. Y. Wang (2012). Influence of N deficiency and salinity on metal (Pb, Zn and Cu) accumulation and tolerance by *Rhizophora stylosa* in relation to root anatomy and permeability. *Environmental Pollution*, 164, 110–117.
- Cheng, H., Y. S. Wang, Y. Liu, Z. H. Ye, M. L. Wu y C. C. Sun (2015). Pb uptake and tolerance in the two selected mangrove with different root lignification and suberization. *Ecotoxicology*, 24, 1650-1658.
- Choudhary, M., U. K. Jetley, M. A. Khan, S. Zutshi, T. Fatma (2007). Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 204–209.
- Contreras, V., F. Páramo y S. Tolvet (2009). Guía metodológica para la estimación de emisiones vehiculares en ciudades mexicanas. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Western Governor's Association (2009). México. pp. 111.
- CONABIO (2009). Manglares de México: Extensión y distribución. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp. 99.
- Cortés, J., F. Bautista, C. Delgado, P. Quintana, D. Aguilar, A. García, C. Figueroa y A. Gogichaishvili (2017). Spatial distribution of heavy metals in urban dust from Ensenada, Baja California, Mexico. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23, 47-60.
- Corzo, E., y H. Velásquez (2014). El plomo y sus efectos en la salud. *Acta Médica del Centro*, 8(3), 141-148.
- Cram, W., G. Torr and A. Rose (2002). Salt allocation during leaf development and leaf fall in mangroves. *Trees*, 16, 112–119.
- Cuizano, A., F. Reyes, S. Domínguez, P. Llanos y A. Navarro (2009). Relevancia del pH en la adsorción de iones metálicos mediante algas pardas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76, 123-130.

- Dai, M., J. Liu, W. Liu, H. Lu, H. Jia, H. Hong and C. Yan (2017). Phosphorus effects on radial oxygen loss, root porosity and iron plaque in two mangrove seedlings under cadmium stress. *Mar Pollution Bulletin*, 119, 262–269.
- De La Cruz-Landero, N., C. Alderete y L. Laffón (2013). Acumulación de metales pesados en sedimentos del ecosistema manglar en Laguna de Términos, Campeche, México. *Foresta Veracruzana*, 15, 25-30.
- Delgadillo-López, E., A. González-Ramírez, F. Prieto-García, R. Villagómez-Ibarra y O. Acevedo-Sandoval (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 597- 612.
- Deng, H. (2005). Metal (Pb, Zn, Cu, Cd, Fe) uptake, tolerance and radial oxygen loss in typical wetland plants. Tesis de Doctorado. Baptist University. pp. 253.
- Deng, H., Z. H. Ye and M. H. Wong (2009). Lead, zinc and iron (Fe<sup>2+</sup>) tolerances in wetland plants and relation to root anatomy and spatial pattern of ROL. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 353-362.
- Deruytter, D., B. Vandegehuchte, J. Garrevoet, R. Blust, L. Vincze, A. C. de Schamphelaere and R. Janssen (2017). Salinity, dissolved organic carbon, and interpopulation variability hardly influence the accumulation and effect of copper in *Mytilus edulis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36, 2074–2082.
- Diario Oficial de la Federación (1996). NOM-001-SEMARNAT. *Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales*. México.
- Diario Oficial de la Federación (2007). NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. *Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio*. México.
- Díaz, G. (2011). Una revisión sobre los manglares: características, problemáticas y su marco jurídico. Ra Ximhai, *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 7, 355-369.
- Diez, L. (2008). Fitorrección de suelos contaminados con metales pesados: evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas. Tesis de Doctorado.

- Universidad de Santiago de Compostela, España. pp. 336.
- Dimas, M. J., G. D. Ortiz y R. G. Ortega (2018). Metales pesados en la laguna Negra de Puerto Marqués del municipio de Acapulco, Guerrero, en Impacto Socio- Ambiental, Territorios Sostenibles y Desarrollo Regional desde el Turismo. Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación Mexicana de Ciencias para el Desarrollo Regional A.C. México. pp. 21-37.
- Dotro, P., M. Nardi, D. Rodríguez and V. Rodríguez (1994). Estudio de la Evolución del pH en función de la Temperatura. Club de Ciencias "Leonardo Da Vinci", departamento de Investigación y Desarrollo. Argentina.
- Du Laing, G., R. De Vos, B. Vandecasteele, E. Lesage, F.M. Tack and M.G. Verloo (2008). Effect of salinity on heavy metal mobility and availability in intertidal sediments of the Scheldt estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 77, 589-602.
- Du Laing, G., J. Rinklebe, B. Vandecasteele, E. Meers and F. Tack (2009). Trace metal behaviour in estuarine and riverine floodplain soils and sediments: A review. *Science Total Environmental*, 407, 3972–3985.
- Esteban, R., *et al* (2013). Salt crystal deposition as a reversible mechanism to enhance photoprotection in black mangrove. *Trees*, 27, 229–237.
- Estrada-Vargas, L. (2008). Determinación de metales pesados en agua, sedimento y coral (*Pocillopora damicornis*) en Bahías de Huatulco, Oaxaca. Tesis de Maestría. Universidad del Mar. México. pp. 101.
- Estrella-Gómez, N., E. Sauri-Duch, O. Zapata-Pérez y J. M. Santamaría (2012). Glutathione plays a role in protecting leaves of *Salvinia minima* from Pb<sup>2+</sup> damage associated with changes in the expression of SmGS genes and increased activity of GS. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 188– 194.
- Ezcurra, E., O. Aburto and L. Rosenzweig (2009). Los riñones del mundo: ¿por qué debemos proteger los manglares de México?. *Investigación ambiental*, 2, 202-206.
- Fergusson, J. E. (1990). *The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects*. Pergamon Press, Oxford. pp. 614.

- Foroughbakhch, R., C. Céspedes, V. Alvarado, G. A. Núñez y H. B. Mohammad (2004). Aspectos ecológicos de los manglares y su potencial como fitorremediadoras en el Golfo de México. *Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León*, 7, 203–208.
- Francisco, A., M. Dí, M. Romano and F. Sánchez (2009). Descripción morfo anatómica de los tipos de glándulas foliares en el mangle blanco *Laguncularia racemosa* L. Gaertn (f.). *Acta microscópica*, 3, 237–252.
- Fritioff, A., L. Kautsky and M. Greger (2005). Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants. *Environmental Pollution*, 133, 265–274.
- Fuentes, F. (2017). Efecto del Níquel en la fisiología y bioquímica de *Salvinia minima* Baker. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. pp. 108.
- Fuentes, F., F. Espadas-Gil, C. Talavera-May, G. Fuentes y J. M. Santamaría (2014). Capacity of the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker) to accumulate high concentrations of nickel in its tissues, and its effect on plant physiological processes. *Aquatic Toxicology*, 155, 142–150.
- Gabriel, S. and G. Salmo III (2014). Assessment of trace metal bioaccumulation by *Avicennia marina* (Forsk.) in the last remaining mangrove stands in Manila Bay, the Philippines. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 93, 722-727.
- Galán, H. y A. Romero (2008). Contaminación de Suelos por metales pesados. *Revista de la sociedad española de mineralogía*, 10, 48-60.
- García, C., J. Moreno, T. Hernández and A. Polo (2002). Metales pesados y sus implicaciones en la calidad del suelo. *Ciencia y medio ambiente, CCMA–CSIC*, 125–138.
- García, N. (2006). Metales pesados en sedimentos en tres lagunas costeras del sur de Tamaulipas y Norte de Veracruz. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Ciencia aplicada y tecnología avanzada. México. pp.131.
- García-Rico, L., L. Tejeda-Valenzuela, M. E. Jara-Marini, A. Gómez-Álvarez y J. García-Hernández. (2014). Determinación de metales pesados en cuerpos de agua: la ostricultura en Sonora, en Pacífico Mexicano. *Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*, A. V. Botello, F. Páez-Osuna, L. Méndez-Rodríguez, M. Betancourt-Lozano, S. Álvarez-Borrego y R. Lara-Lara (eds.). UAC, UNAM, CIAD, CIBNOR, CICESE. México. pp. 379–396.

- García-Rico, L., L. Tejada-Valenzuela, M. E. Jara-Marini, y A. Gómez-Álvarez. (2011). Dissolved and particulate metals in water from Sonora Coast: a pristine zone of Gulf of California. *Environmental Monitoring and Assessment*, 176, 109-123.
- García-Rico, L., S. Soto-Cruz, M. E. Jara-Marini, y A. Gómez-Álvarez. (2004). Fracciones geoquímicas de Cd, Cu y Pb en sedimentos costeros superficiales de zonas ostrícolas del estado de Sonora, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 20 (4), 159-167.
- García, V. (2006). Efectos fisiológicos y compartimentación radicular en plantas de *Zea mays* L. expuestas a la toxicidad por plomo. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. España. pp. 131
- Gharaibeh, A., B. Marschner and S. Heinze (2015). Metal uptake of tomato and alfalfa plants as affected by water source, salinity, and Cd and Zn levels under greenhouse conditions, *Environmental Science Pollution Research*, 22, 18894–18905
- González-Macías, C., I. Schifter, D. B. Lluch-Cota, L. Méndez-Rodríguez y S. Hernández-Vázquez (2006). Distribution, enrichment and accumulation of heavy metals in coastal sediments of Salina Cruz bay, México. *Environmental Monitoring and Assessment*, 118, 211–230.
- González-Mendoza, D., F. Espadas, F. Escoboza-García, J. Santamaria and O. Zapata-Pérez (2013). Copper Stress on Photosynthesis of Black Mangrove (*Avicennia germinans*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85, 351-356.
- González-Mendoza, D., F. Espadas, J. Santamaria and P. Zapata (2007a). Multiple Effects of Cadmium on the Photosynthetic Apparatus of *Avicennia germinans* L. as Probed by OJIP Chlorophyll Fluorescence Measurements. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 62c, 265–272.
- González-Mendoza, D., V. Ceja-Moreno, G. Gold-Bouchot, M. Escobedo-Gracia, M. Del-Río, D. Valdés-Lozano and P. Zapata (2007b). The influence of radical architecture on cadmium bioaccumulation in the black mangrove, *Avicennia germinans* (L.). *Chemosphere*, 67, 330–334.
- González-Mendoza, D. y O. Zapata-Pérez (2008). Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 82, 53-61.
- Gupta, K., J. Corpas y J. M. Palma (2013). Heavy metal stress in plants. Springer. Alemania. pp. 242.

- Guzmán, A., S. Villanueva y V. Botello (2005). Metales en Tres Lagunas Costeras del Estado de Veracruz, en Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (eds.). Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 361-372.
- Guzmán-García, X., V. Botello, L. Martínez-Tabche y H. González-Márquez (2009). Effects of heavy metals on the oyster (*Crassostrea virginica*) at Mandinga Lagoon, Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*, 57, 955-962.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 366, 1-11.
- He, B., R. Li, M. Chai and G. Qiu (2014). Threat of heavy metal contamination in eight mangrove plants from the Futian mangrove forest, China. *Environmental Geochemistry and Health*, 36, 467-476.
- He, Z., X. Yanga and P. Stoffella (2005)- Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19, 125-140.
- Hernández, A. (2012). Determinación de metales pesados (Cd, Pb, Zn, As) en suelos agrícolas del Ejido San Miguel municipio de Matamoros Coahuila. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. pp. 78.
- Huang, G. Y., Y. S. Wang, G. G. Ying and A. C. Dang (2012). Analysis of type 2 metallothionein gene from mangrove species (*Kandelia candel*). *Trees*, 26, 1537–1544.
- Huang, G. Y., Y. S. Wang and G. G. Ying (2011). Cadmium-inducible *BgMT2*, a type 2 metallothionein gene from mangrove species (*Bruguiera gymnorrhiza*), its encoding protein shows metal-binding ability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 405, 128–132.
- Hussain, S., M. Akram, G. Abbas, B. Murtaza, M. Shahid, S. Shah, I. Bibi and K. Niazi (2017). Arsenic tolerance and phytoremediation potential of *Conocarpus erectus* L. and *Populus deltoides* L. *International Journal of Phytoremediation*, 19, 985–991.
- Jara-Marini, M. E., J. N. Tapia-Alcaraz, J. A. Dumer-Gutiérrez, L. García-Rico, J. García-Hernández y F. Páez-Osuna (2013). Distribution and accumulation of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in the surface sediments of El Tobarí Lagoon, central-East Gulf of California: An ecosystem

- associated with agriculture and aquaculture activities. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(14), 1842-1851.
- Lara-Lara, J. R., L. Arreola, A. Calderón, I. Camacho, E. de la Lanza, G. Escofet, C. Espejel, A. Guzmán, B. Ladah, H. López, L. Meling, B. Casasola, B. Reyes, J. Ríos y G. Zertuche (2008). Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales, en *Capital natural de México Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*, F. Arenas, B. Contreras, N. Millán (eds.). Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. México. pp. 109-134.
- Larios, B. (2014). Niveles de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en los suelos de ribera de la cuenca del río Turia. Tesis de Maestría. Universidad de Lleida. Barcelona. pp. 153.
- Leal-Alvarado, D., F. Espadas-Gil, L. Sáenz-Carbonell, C. Talavera-May y J. M. Santamaría (2016). Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyper-accumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. *Aquatic Toxicology*, 171, 37-47.
- Leblebici, Z., A. Aksoy and F. Duman (2011). Influence of salinity on the growth and heavy metal accumulation capacity of *Spirodela polyrrhiza* (Lemnaceae). *Turkish Journal of Biology*, 35, 215–220.
- León, M. y G. Sepúlveda-Jiménez (2012). El daño por oxidación causado por cobre y la respuesta antioxidante de las plantas, *Interciencia*, 37, 805–811.
- Leonard, M., I. Barcarolli, R. Silva, W. Wasielesky, M. Wood and A. Bianchini (2011). The effects of salinity on acute and chronic nickel toxicity and bioaccumulation in two euryhaline crustaceans: *Litopenaeus vannamei* and *Excirolana armata*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 154, 409–419.
- Li, S., Y. Yu, M. Zhu, F. Zhao and S. Luan (2012). Cadmium impairs ion homeostasis by altering K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channel activities in rice root hair cell. *Plant Cell Environment*, 35, 1998–2013.
- Lian, Y., J. Xu, P. Lin, S. Meguro and S. Kawachi (1999). Five heavy metals in propagules of ten mangrove species of China. *Journal of Wood Science*, 45, 343-347.
- Londoño, L. J. (). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad, en *Desarrollo y transversalidad*, L. F. G. Giraldo (ed.). Corporación Universitaria Lasallista. Colombia. pp. 129–162.

- López, J. (2015). Determinación de metales pesados (Pb, Cd, Cr) en agua y sedimentos de la zona estuarina del río Tuxpan, Veracruz Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana, México.
- López-Portillo, J. and E. Ezcurra (2002). Los manglares de México: una revisión. Madera y bosques, número especial, 27 – 51.
- Llugany, M., R. Tolrá, C. Poschnrieder y J. Barceló (2007). Hiperacumulación de metales: ¿una ventaja para la planta y para el hombre? Ecosistemas, 16, 4-9.
- Lugo, A., and E. Medina (2014). Mangrove forests, en Encyclopedia of Natural Resources. Land Taylor and Francis. EE. UU. pp. 343-352.
- Luna-Esquivel, E., D. Ojeda-Barrios, V. Guerrero-Prieto, T. Ruiz-Anchondo y J. Martínez-Téllez (2014). Poliaminas como indicadores de estrés en plantas. Revista Chapingo, Serie horticultura, 20, 283-295.
- MacFarlane, G.R., C.E. Koller and S.P. Blomberg (2007). Accumulation and partitioning of heavy metals in mangroves: A synthesis of field-based studies. Chemosphere, 69, 1454–1464.
- MacFarlane, G. (2003). Chlorophyll *a* Fluorescence as a Potential Biomarker of Zinc Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 70, 90–96.
- MacFarlane, G. and D. Burchett (2002). Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Marine Environmental Research, 54, 65–84.
- MacFarlane, G. and D. Burchett (2001). Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Marine Pollution Bulletin, 42, 233–240.
- MacFarlane, G. and D. Burchett (2000). Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Aquatic Botany, 68, 45–59.
- MacFarlane, G. and D. Burchett (1999). Zinc distribution and excretion in the leaves of the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Environmental and Experimental Botany, 41, 167–175.

- Macías-Hernández, P. (2015). Determinación de metales pesados (Pb, Cd, Cr) en agua y sedimentos de la zona estuarina del río Tuxpan, Veracruz. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana. México. pp. 53.
- Manousaki, E. and N. Kalogerakis (2009). Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): metal uptake in relation to salinity. *Environmental Science Pollution Research*, 16, 844–854.
- Manousaki, E., F. Kokkali and N. Kalogerakis (2009). Influence of salinity on lead and cadmium accumulation by the salt cedar (*Tamarix smyrnensis* Bunge). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 877–883.
- Medina, R., C. Zetina, M. Comas y R. Pat (2004). Concentración de Cd, Cr, Cu y Pb en sedimentos y en tres especies de pepino de mar (clase *holothuroidea*) de las costas del Estado de Yucatán, México. *Ingeniería*, 8, 7-19.
- Mei, X., S. Li, Q. Li, Y. Yang, X. Luo, B. He, H. Li and Z. Xu (2014). Sodium chloride salinity reduces Cd uptake by edible amaranth (*Amaranthus mangostanus* L.) via competition for Ca channels. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 105, 59–64.
- Monnet, F., F. Bordas, V. Deluchat, P. Chatenet, M. Botineau and M. Baudu (2005). Use of the aquatic lichen *Dermatocarpon luridum* as bioindicator of copper pollution: Accumulation and cellular distribution tests. *Environmental Pollution*, 138, 455–461.
- Monnet, F., N. Vaillant, P. Vernay, A. Coudret, H. Sallanon and A. Hitmi (2001). Relationship between PSII activity, CO<sub>2</sub> fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *Journal of plant physiology*, 158, 1137-1144.
- Naidoo, G. (2016). The mangroves of South Africa: An ecophysiological review *South African Journal of Botany*, 107, 101-113.
- Naranjo-Sánchez A. y W. Troncoso-Olivo (2008). Contenidos de cadmio, cobre, zinc y plomo en órganos de *Rhizophora mangle* de la ciénaga grande de Santa Marta, Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 37, 107–129.
- Nguyen, K. M., H. A. Nguyen, O. Richter, M. T. Pham and V. P. Nguyen (2017). Ecophysiological responses of young mangrove species *Rhizophora apiculata* (Blume) to different chromium contaminated environments. *Science of the Total Environment*, 574, 369–380.

- Nirmal-Kumar, J., P. Sajish, R. Nirmal-Kumar, G. Basil and V. Shailendra (2011). An assessment of the accumulation potential of Pb, Zn and Cd by *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. in Vamleshwar mangroves, Gujarat, India. *Notulae Scientia Biologicae*, 1, 36–40.
- Ochoa, J., B. González and J. Carrión (2016). Metales pesados (Cd, Cr, Pb, Hg) en *Rhizophora mangle* en río y bahía de Chetumal. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 2, 263-271.
- Ochoa, S. A., G. E. Halffter y R. Ibarra (1973). Estudio de la contaminación en el Bajo Río Coatzacoalcos. Primeros trabajos. Primer seminario sobre la evaluación de la contaminación ambiental. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. México. pp. 115-162.
- Ong Che, R. G. (1999). Concentration of 7 heavy metals in sediments and mangrove root samples from Mai Po, Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 39, 269-279.
- O-Quezada, G. A., L. Ojeda-Barrios, O. A. Hernández-Rodríguez, E. Sánchez-Chávez y J. Martínez-Tellez (2011). Biomasa, prolina y parámetros nitrogenados en plántulas de nogal bajo estrés hídrico y fertilización nitrogenada. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(1), 13-18.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- Páez-Osuna, F. y C. Osuna-Martínez (2011). Biomonitores de la contaminación costera con referencia a las costas mexicanas: una revisión sobre los organismos utilizados. *Hidrobiológica*, 21, 229-238.
- Páez-Osuna, F. (2005). Fuentes de metales en la zona costera marina, en Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (eds.). Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 329-342.
- Pannier, F. y R. Fraino de Pannier (1989). Manglares de Venezuela. Cuadernos Lagoven, Caracas. pp. 67.
- Pastrana-Corral, M. A., F. T. Wakida, J. Temores-Peña, D. D. Rodríguez-Mendivil, E. García-Flores, T. D. J. Piñón-Colin y A. Quiñonez-Plaza (2017). Heavy metal pollution in the soil surrounding a thermal power plant in Playas de Rosarito, Mexico. *Environmental Earth Science*, 76, 583.

- Paz-Alberto, M., B. Celestino and C. Sigua (2014). Phytoremediation of Pb in the sediment of a mangrove ecosystem. *Journal of Soils and Sediments*, 14, 251-258.
- Peralta-Pérez, M. del R. y T. L. Volke-Sepúlveda (2012). La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11, 75–88.
- Pérez-Cruz, Y., L. Rangel-Ruiz y J. Gamboa-Aguilar (2013). Metales en almejas y sedimentos en la Reserva de la Biósfera "Pantanos de Centla" Tabasco, México. *Hidrobiológica*, 23, 1-8.
- Pérez, L., R. Bugja, J. Lorenschat, M. Brenner, J. Curtis, P. Hoelzmann, G. Islebe, B. Scharf y A. Schwalb (2011). Aquatic ecosystems of the Yucatán Peninsula (Mexico), Belize, and Guatemala. *Hydrobiologia*, 661, 407–433.
- Pérez-Moreno, V., M. A. Ramos-López, C. E. Zavala-Gómez, R. Rico (2016). Heavy metals in seawater along the mexican Pacific coast. *Interciencia*, 41, 419–423.
- Pérez-Zapata, A. (1981). Plomo y mercurio, en Lagunas costeras de Tabasco: un ecosistema en peligro. *Centro de Ecodesarrollo*, 58-61.
- Perkin-Elmer Corporation (1996). *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy*. EE. UU. pp. 300.
- Ponce-Velez, G. y V. Botello (1991). Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la laguna de Términos, Campeche. *Hidrobiológica*, 1, 1-10.
- Qiu, Y. W., K. F. Yu, G. Zhang and W. X. Wang (2011). Accumulation and partitioning of seven trace metals in mangroves and sediment cores from three estuarine wetlands of Hainan Island, China. *Journal of Hazardous Materials*, 190, 631–638.
- Qiu, Y. W. and H. L. Qiu (2017). Comparison of metals levels in two mangrove species (*Rhizophora stylosa* and *Sonneratia hainanensis*) from Hainan Island, South China. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 52, 012050.
- Rahman, M. M., Y. Chongling, R. M. Rahman and K. S. Islam (2012). Effects of copper on growth, accumulation, antioxidant activity and malondialdehyde content in young seedlings of the mangrove species *Kandelia candel* (L.). *Plant Biosystems*, 146, 47–57.

- Reese, M. (2009). Restauración Ecológica de los manglares en la Costa del Ecuador. Tesis de Maestría. Universidad San Francisco de Quito. pp. 26.
- Retama, I., M. P. Jonathan, D. Roy, P. F. Rodríguez-Espinosa, R. Nagarajan, S. K. Sarkar, S. S. Morales-García, N. P. Muñoz-Sevilla (2016). Metal concentrations in sediments from tourist beaches of Huatulco, Oaxaca, Mexico: an evaluation of post-Easter week vacation. *Environmental Earth Science*, 75, 375
- Rodríguez-Zúñiga, M.T., C. Troche-Souza, A. D. Vázquez-Lule, J. D. Márquez-Mendoza, B. Vázquez- Balderas, L. Valderrama-Landeros, S. Velázquez-Salazar, M. I. Cruz-López, R. Ressler, A. Uribe-Martínez, S. Cerdeira-Estrada, J. Acosta-Velázquez, J., Díaz-Gallegos, R. Jiménez-Rosenberg, L. Fueyo-Mac Donald y C. Galindo-Leal (2013). Manglares de México: Extensión, distribución y monitoreo. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. pp. 128.
- Rosales, H., E. Carranza y R. Alvarez (1986a). Sedimentological and chemical studies in sediments from Alvarado lagoon system, Veracruz, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 13, 19-28.
- Rosales, H., E. Carranza y R. Alvarez (1986b). Sedimentological and chemical studies in sediments from Papaloapan River, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 13, 263-272.
- Rosas, P. I., A. Báez y R. Belmont (1983). Oyster (*Crassostrea virginica*) as indicator of heavy metals pollution in some lagoons of the Gulf of Mexico. *Water, Air and Soil Pollution*, 20, 127-135.
- Ruiz-Fernández, A. C., M. Frignani, C. Hillaire-Marcel, B. Ghaleb, M. D. Arvizu, J. R. Raygoza-Viera y F. Páez-Osuna (2009). Trace Metals (Cd, Cu, Hg, and Pb) Accumulation Recorded in the Intertidal Mudflat Sediments of Three Coastal Lagoons in the Gulf of California, Mexico. *Estuaries and coasts*, 32, 551-564.
- Saif, S. and M. S. Khan (2018). Assessment of toxic impact of metals on proline, antioxidant enzymes, and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* inoculated *Cicer arietinum* grown in chromium and nickel-stressed sandy clay loam soils. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190, 290.
- Sánchez, E., J. M. Ruiz y L. Romero (2016). Compuestos nitrogenados indicadores de estrés en

- respuesta a las dosis tóxicas y eficientes de Nitrógeno en frijol ejotero. *Nova Scientia* N° 16, 8, 228–244.
- Sauquillo, A., A. Rigol, A. and G. Rauret (2003). Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(3), 152-159.
- SEDUE (1990). Acuerdo por el que se establecen los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua CE-CCA-001/89. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. Diario Oficial de la Federación. México.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2006). Humedales costeros, en: *La gestión ambiental en México*. pp. 217-228.
- Sierra, A. (2005). Niveles de metales pesados y elementos asociados en suelos de la provincia de Almería: parámetros que los afectan y riesgos de contaminación. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada. España. pp. 402.
- Silva, C., L. Lacerda and C. Rezende (1990). Heavy metal reservoirs in a red mangrove forest. *Biotropica* 22, 339–345.
- Song, H., W. You-Shao, S. Cui-Ci, W. Yu-Tu, P. Ya-Lan y H. Cheng (2012). Effects of pyrene on antioxidant systems and lipid peroxidation level in mangrove plants, *Bruguiera gymnorrhiza*. *Ecotoxicology*, 21, 1625–1632.
- Speelmans M., K. Lock, D.R.J. Vanthuyne, F. Hendrickx, G. Du Laing, F.M.G. Tack, C.R. Janssen (2010). Hydrological regime and salinity alter the bioavailability of Cu and Zn in wetlands. *Environmental Pollution*, 158, 1870-1875.
- Speelmans, M., D. Vanthuyne, K. Lock y F. Hendrickx, G. Laing, F. Tack and C. R. Janssen (2007). Influence of flooding, salinity and inundation time on the bioavailability of metals in wetlands. *Science of the Total Environment*, 380, 144–153.
- Thatoi, H. N., J. K. Patra and S. K. Das (2014). Free radical scavenging and antioxidant potential of mangrove plants: a review. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 561–579.
- Theriappan, P., K. Gupta and P. Dhasarathan (2011). Accumulation of proline under salinity and heavy metal stress in cauliflower seedlings. *Journal of Applied Sciences and Environmental*

Management, 15, 251–255.

Tripathi D., P. Tripathi, S. Dwivedi, A. Kumar, A. Mishra, S. Chauhan, J. Norton and S. Nautiyal (2014). Roles for root iron plaque in sequestration and uptake of heavy metals and metalloids in aquatic and wetland plants. *Metallomics*, 6, 1789-1800.

Tripathi, B. and J. P. Gaur (2004). Relationship between copper - and zinc- induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta Medica*, 219, 397-404.

USDA (1999). Guía para la evaluación de la calidad y salud del Suelo. Instituto de calidad de suelos, CRN-CNI-INTA. Argentina. pp. 82.

Valderrama-Landeros L. H., M. T. Rodríguez-Zúñiga, C. Troche-Souza, S. Velázquez-Salazar, E. Villeda-Chávez, J. A. Alcántara-Maya, B. Vázquez-Balderas, M. I. Cruz-López, R. Ressler (2017). Manglares de México: actualización y exploración de los datos del sistema de monitoreo 1970/1980–2015. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp. 128.

Valencia, J. (1989). Registro sedimentario de metales pesados en la Laguna de las Ilusiones, Villahermosa, Tabasco. Tesis Profesional. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México. pp. 100.

Vázquez-Botello, A., S. Villanueva-Fragoso y L. Rosales-Hoz (2004). Distribución y contaminación de metales en el Golfo de México, en *Diagnostico ambiental del Golfo de México*, M. Caso, I. Pisanty y E. Ezcurra (eds.). Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Instituto de Ecología A.C. y Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies. México. pp. 683-712.

Vázquez, F., C. Aguilera, D. Delgado y A. Márquez (1990). Trace and heavy metals in the oyster *Crassostrea virginica*, San Andrés Lagoon, Tamaulipas, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, 907-914.

Vázquez, F., V. Sharma, V. H. Alexander y C. A. Frausto (2012). Metals in some lagoons of Mexico. *Environmental Health Perspectives*, 103, 33-34.

Vega, E. y E. Peters (2003). Conceptos generales sobre el disturbio y sus efectos en los ecosistemas, en *Conservación de ecosistemas templados de montaña en México*, Ó. Sánchez, E. Vega, E. Peters y O. Monroy-Vilchis (eds.). Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 137-150.

- Villamil, E. (2010). Evaluación de ecosistemas de manglar con diferente cobertura en cuanto a los procesos de retención, absorción y acumulación de metales pesados (Cr, Cd, Pb, Zn y Cu). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. pp. 77.
- Villanueva, F. (1987). Evaluación de metales pesados en sedimentos y organismos del río Coatzacoalcos y áreas adyacentes, Veracruz, México. Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 82.
- Villanueva, F. y A. V. Botello (2005). Vigilancia y presencia de metales tóxicos en la laguna el Yucateco, Tabasco, México, en Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (eds.). Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 407-430.
- Villanueva, F. y F. Paéz-Osuna (1996). Niveles de metales en el Golfo de México: agua, sedimentos y organismos. EPOMEX, Serie Científica, 5, 309-347.
- Villanueva, F. y V. Botello (1992). Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe mexicano: una revisión. Revista Internacional Contaminación Ambiental, 8, 47-61.
- Vinocur, B. and A. Altman (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Plant biotechnology, 16, 123–132.
- Walsh, E, A. Ainsworth and R. Rigby (1979). Resistance of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings to Lead, Cadmium, and Mercury. Biotropica, 11, 22-27.
- Wang, Y., H. Zhu and N. F. Y. Tam (2014). Polyphenols, tannins and antioxidant activities of eight true mangrove plant species in South China. Plant Soil, 374, 549–563.
- Wang, Y., Q. Qiu, G. Xin, Z. Yang, J. Zheng, Z. Ye and S. Li (2013). Heavy metal contamination in a vulnerable mangrove swamp in South China. Environmental Monitoring Assessment, 185, 5775–5787.
- Wang, W., Z. Yan, S. You, Y. Zhang, L. Chen and G. Lin (2011). Mangroves: obligate or facultative halophytes? A review. Trees, 25, 953–963.
- Xie, Q., Z. Li, L. Yang, J. Lv, T. O. Jobe y Q. Wang (2015). A newly identified passive hyperaccumulator *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* under manganese stress. Plos ONE, 10,

22.

- Xie, X., J. Weiss, B. Weng, J. Liu, H. Lu y C. Yan (2013). The short-term effect of cadmium on low molecular weight organic acid and amino acid exudation from mangrove (*Kandelia obovata* (S. L.) Yong) roots. *Environmental Science Pollution Research*, 20, 997–1008.
- Yan, Z. and N. F. Y. Tam (2013). Differences in lead tolerance between *Kandelia obovata* and *Acanthus ilicifolius* seedlings under varying treatment times. *Aquatic Toxicology*, 126, 154–162.
- Yan, Z. Z., L. Ke, N. F. Y. Tam (2010). Lead stress in seedlings of *Avicennia marina*, a common mangrove species in South China, with and without cotyledons. *Aquatic Botany*, 92, 112–118.
- Yang, S., S. Liang, L. Yi. Langbo, B. Xu, J. Cao, Y. Guo y Y. Zhou (2014). Heavy metal accumulation and phytostabilization potential of dominant plant species growing on manganese mine tailings. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 8, 394–404.
- Yáñez-Arancibia, A. y A. L. Lara-Domínguez (1999). Ecosistemas de Manglar en América Tropical. Instituto de Ecología, A.C., México; UICN/ORMA, Costa Rica; NOAA/NMFS, EE. UU. pp. 380.
- Yonamine I., K. Yoshida, K. Kido, A. Nakagawa, H. Nakayama y A. Shinmyo (2004). Overexpression of NtHAL3 genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells. *Journal of Experimental Botany*, 55, 387–395.
- Zaldívar-Jiménez, M. A., J. A. Herrera-Silveira, C. Teutli-Hernández, F. A. Comín, J. L. Andrade, C. C. Molina and R. P. Ceballos (2010). Conceptual framework for mangrove restoration in the Yucatán Peninsula. *Ecological Restoration*, 28, 333-342.
- Zaragoza-Araujo, U., J. L. Zavala-Aguirre, A. Zavaleta-Carmona, F. J. Barragán-Vázquez y J. de Anda-Sánchez (2014). La contaminación y distribución de metales pesados en la laguna costera de Barra de Navidad (Jalisco) en el Pacífico Mexicano, en *Pacífico Mexicano. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*, A. V. Botello, F. Páez-Osuna, L. Mendez-Rodríguez, M. Betancourt-Lozano, S. Álvarez-Borrego, y R. Lara-Lara (eds.). UAC, UNAM-ICMYL, CIAD-MAZATLÁN, CIBNOR, CICESE. México. pp. 930.
- Zhang, F. Q., Y. S. Wang, C. C. Sun, Z. P. Lou and J. D. Dong (2012). A novel metallothionein gene

from a mangrove plant *Kandelia candel*. *Ecotoxicology*, 21, 1633–1641.

Zhang, F. Q., Y. S. Wang, Z. P. Lou and J. D. Dong (2007). Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere*, 67, 44–50.