

Memoria de Licenciatura en Ecología Urbana

Diciembre de 2012

Desarrollo y puesta a prueba de un nuevo método para utilizar líquenes como bioindicadores de contaminación



Autora: Analía Bardelás

Director: Dr. Fernando R. Momo

Tabla de contenidos

OBJETIVO Y PREGUNTAS ORIENTADORAS.....	4
CAPÍTULO I.....	5
CONTAMINACIÓN DEL AIRE, SU MEDICIÓN Y CONTROL.....	5
CAPÍTULO II.....	11
LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES.....	11
MÉTODOS ACTUALES DE DETERMINACIÓN DE CONTAMINACIÓN MEDIANTE EL USO DE LÍQUENES.....	14
DIFICULTADES DE LOS MÉTODOS ACTUALES.....	16
LOS PIGMENTOS.....	17
EL ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	18
CAPÍTULO III.....	20
SITIOS DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA.....	20
METODOLOGÍA.....	21
Selección del área de muestreo.....	21
Medición de NO ₂	23
Medición de la densidad de tránsito vehicular.....	26
Registro de líquenes.....	27
Extracción de pigmentos.....	28
Registro fotográfico.....	29
Análisis de imágenes.....	29

Análisis estadístico.....	32
CAPÍTULO IV.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
MEDICIÓN DE NO ₂	33
REGISTRO DE LÍQUENES.....	35
PIGMENTOS.....	39
REGISTRO FOTOGRÁFICO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	39
ANÁLISIS DE REGRESIÓN.....	44
CAPÍTULO V.....	51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	51
AGRADECIMIENTOS.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

OBJETIVO Y PREGUNTAS ORIENTADORAS

El objetivo de este trabajo es desarrollar y poner a prueba un método para utilizar los líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica sobre la base de su diversidad de pigmentos y mediante el análisis de la diversidad de color en imágenes a fin de que el estudio pueda ser realizado por personas no expertas en taxonomía líquénica. Para evitar sesgos derivados de la subjetividad del observador proponemos determinar la diversidad de los colores presentes en el parche a través del análisis digital de fotografías.

A los fines de alcanzar el objetivo propuesto, la pregunta que guía el presente trabajo es:

¿La diversidad de pigmentos y la diversidad de colores visibles de una comunidad de líquenes se correlacionan con la contaminación atmosférica del mismo modo en que se sabe que lo hace la diversidad específica?

CAPÍTULO I

CONTAMINACIÓN DEL AIRE, SU MEDICIÓN Y CONTROL

La contaminación atmosférica puede definirse como “impurificación de la atmósfera por emisión de materias gaseosas, líquidas o sólidas o radiaciones ajenas a su composición natural o en proporción superior a aquella” (Orozco Barrenetxea et al, 2003). De acuerdo con su origen, las fuentes de contaminación pueden ser clasificadas en naturales o antropogénicas. Estas últimas son particularmente importantes en áreas urbanas y periurbanas, dada la multiplicidad de actividades que se desarrollan allí.

La contaminación del aire generada por los procesos de combustión ha cobrado singular importancia desde la Revolución Industrial. A partir de ese momento la quema de diferentes combustibles fósiles como forma de obtención de energía para la industria y posteriormente para la propulsión de vehículos se ha ido incrementando en todos los centros urbanos. Diferentes contaminantes, primarios y secundarios¹, se acumulan en el aire de las ciudades e incluso son transportados a grandes distancias aumentando el alcance de los efectos producidos por las actividades humanas. Algunos de los contaminantes del aire más comunes son:

El monóxido de carbono: se forma principalmente por combustión incompleta de compuestos que contienen carbono. Las fuentes más destacadas en el ámbito urbano son los escapes vehiculares, la quema de residuos, los procesos industriales que incluyen combustión. Se han observado efectos adversos en organismos con sistemas respiratorios en los que la hemoglobina actúa como transportador de oxígeno, como en el ser humano.

¹ Los contaminantes primarios son aquellas sustancias contaminantes que se aportan directamente a la atmósfera. Estos incluyen aerosoles, compuestos derivados del azufre, compuestos orgánicos volátiles, hidrocarburos, material particulado, óxidos de nitrógeno, óxidos de carbono, compuestos halogenados, metales pesados.

Los contaminantes secundarios se producen como consecuencia de las transformaciones y reacciones químicas y fotoquímicas que sufren los contaminantes primarios. Pueden nombrarse los ácidos sulfúrico y nítrico formadores de la lluvia ácida y diversos compuestos que en su conjunto conforman el smog fotoquímico.

Los óxidos de nitrógeno: se engloba con esa denominación a aquellos compuestos de nitrógeno que son detectables en la atmósfera por su estabilidad, estos son N_2O , NO y NO_2 . El primero se origina principalmente de manera natural por la actividad de bacterias presentes en el suelo, no es tóxico pero está relacionado con el proceso de efecto invernadero. El segundo se forma en combustiones que ocurren en presencia de aire y a altas temperaturas como en los motores vehiculares o las centrales termoeléctricas, es tóxico y además interviene en reacciones que generan otros contaminantes secundarios. El tercero es uno de esos contaminantes secundarios y se forma por la lenta oxidación del anterior en la atmósfera, es tóxico e interviene en la reacción química que da lugar al ozono. En el ambiente exterior suelen encontrarse en concentraciones que no provocan efectos nocivos en el ser humano, pero contribuyen a la formación del llamado *smog* fotoquímico (un conjunto de compuestos de alto poder oxidante que produce irritación de las vías respiratorias y mucosas y daños en materiales poliméricos) y de la deposición ácida². La deposición ácida, a su vez, cambia las características del medio de forma tal que puede movilizar otros elementos como por ejemplo metales pesados.

El dióxido de azufre: se origina principalmente en la quema de combustibles que contienen azufre como los utilizados por vehículos de tipo diesel. Provoca irritación en el sistema respiratorio y causa daños en los tejidos vegetales. El SO_2 se oxida a SO_3 en la atmósfera y luego reacciona con vapor de agua y otras moléculas para formar ácido sulfúrico (componente de la lluvia ácida). La acidificación del agua produce la muerte de especies no tolerantes, mientras que en los suelos induce procesos químicos que conducen a la pérdida de nutrientes y a la liberación de metales tóxicos para plantas y animales. En cuanto a los efectos sobre materiales, acelera la corrosión de los metales y provoca la desintegración de rocas de tipo calcáreo.

El ozono: a nivel troposférico es un contaminante secundario pues se forma a partir de las reacciones químicas de otros contaminantes como los óxidos de nitrógeno e hidrocarburos en presencia de la radiación ultravioleta del sol. Es un poderoso oxidante y por lo tanto resulta tóxico para los seres vivos.

² Se denomina de esta forma a la deposición, seca o húmeda, de especies de carácter ácido. La lluvia ácida es una de las formas posibles de deposición.

El material particulado: puede ser líquido o sólido y su peligrosidad se caracteriza de acuerdo con el tamaño de partícula y su composición. Las fuentes antropogénicas principales en las zonas urbanas son los procesos de combustión, algunos procesos industriales y el rozamiento de los neumáticos contra el pavimento. Los efectos de este tipo de contaminación incluyen el recubrimiento de superficies fotosintéticas de las plantas y la obstrucción de los estomas (poros por los cuales se produce el intercambio gaseoso en los vegetales), generación de alergias y afecciones en las vías respiratorias y disminución de la visibilidad por efectos de absorción y refracción de la luz.

La acumulación de todas estas sustancias en la atmósfera trae aparejada consecuencias negativas sobre la salud de las personas y los ecosistemas y genera también pérdidas económicas por el deterioro de estructuras urbanas.

Es por ello que se han realizado numerosos estudios para intentar cuantificar las concentraciones de los contaminantes más comunes encontrados en el aire urbano, ya sea con un objetivo meramente diagnóstico (Loppi et al., 2002) y/o comparativo en tiempos diferentes (Fernández-Salegui et al., 2006), o con la intención de diseñar programas de control y disminución de la contaminación y hacer un seguimiento de los mismos. En Argentina estos controles son muy recientes y escasos y se circunscriben solo a unas pocas ciudades (Carreras y Pignata, 2002).

Dada la imposibilidad de medir la enorme cantidad de sustancias presentes en el aire urbano, ya sea aquellas emitidas directamente o aquellas resultantes de reacciones químicas posteriores, por convención se controlan de manera sistemática solo algunas. En general son sometidos a control los compuestos que conforman la mayor parte de la carga contaminante atmosférica presente en las ciudades como los mencionados más arriba.

Los controles de contaminación pueden realizarse de manera directa mediante mediciones físicas y químicas, o en forma indirecta mediante la observación de organismos pertenecientes a especies llamadas bioindicadores que son particularmente sensibles a los contaminantes.

Entre los organismos más utilizados para monitorear la calidad del aire están los líquenes. Las características morfológicas que poseen, así como su amplia distribución

geográfica difundieron su uso desde 1866, año en que Nyalander publicó el primer estudio sobre el tema.

No obstante las ventajas de los líquenes como bioindicadores de contaminación, existe una dificultad que limita su uso generalizado. Los métodos actuales se basan en la determinación visual de la cobertura y de la diversidad de líquenes, lo cual requiere el conocimiento taxonómico de las diferentes especies o bien el análisis químico o genético de las células del líquen. Es por ello que el diagnóstico de la contaminación por medio de este método sólo puede ser realizado con el asesoramiento de personas expertas en taxonomía del grupo o en los análisis químicos o genéticos.

Sin embargo, es posible cuantificar algunas magnitudes que se relacionan directamente con la diversidad específica, por ejemplo la diversidad de coloración de un parche de líquenes. En todas las comunidades vegetales existe una correlación positiva entre la variedad de colores (y la diversidad de pigmentos) y la diversidad de especies (Margalef, 1991). Aprovechando la facilidad tecnológica actual para el análisis de fotografías digitales se podría caracterizar la diversidad de colores en forma sencilla y automatizable.

La contaminación del aire y su relación con la salud de la población es un tema que aparece en la agenda pública nacional, en primera instancia a través de la Agenda 21³ local. En el capítulo 6 dedicado a la Protección y fomento de la salud humana el documento incluye los programas de acción titulados **Solución del problema de la salubridad urbana y Reducción de los riesgos para la salud derivados de la contaminación y los peligros ambientales**. Dichos programas tienen entre otros objetivos “lograr un mejoramiento de los indicadores ambientales” y “mantener el medio ambiente en un nivel tal que no se afecten ni se pongan en peligro la salud y la seguridad humanas” (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable).

En relación al contaminante particular objeto de este trabajo, el NO₂, se han establecido niveles guía de concentración permitida dada su toxicidad para el ser humano y su

³ Documento generado en la Conferencia Mundial sobre el Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible organizada por Naciones Unidas en Río de Janeiro en 1992. Se trata de un plan de acción mediante el cual los 172 países que suscriben, entre ellos Argentina, se comprometen a aplicar políticas ambientales, económicas y sociales tendientes a lograr un desarrollo sostenible. En la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo Sostenible, Río+20, realizada en junio de 2012, los países firmantes reafirmaron su compromiso en cuanto a la aplicación de la Agenda 21.

relación con la presencia de otros contaminantes aéreos. De acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud, dichos niveles son de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de media anual y $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de media en 1 hora (OMS, 2005). La legislación argentina, en sus diferentes niveles, también fija estándares permitidos. Así, la Ley Nacional N° 20.284 “Plan de prevención de situaciones críticas de contaminación atmosférica” determina un nivel de $0,45 \text{ ppm}^4$ de NO_x en 1 hora. Cabe aclarar que el valor permitido por esta normativa es mayor al establecido por la OMS ya que equivale a $450 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Por su parte, la Resolución N° 638/2001 del Ministerio de Salud aprueba el “Programa de Calidad de Aire y Salud. Prevención de riesgos por exposición a contaminación atmosférica”, entre cuyas metas se incluye “estimular el desarrollo de sistemas de medición de emisiones, la aplicación de modelos de dispersión de contaminantes en la atmósfera, la evaluación de la calidad del aire intra domiciliario y la vigilancia del aire urbano exterior”. En la esfera provincial, el Decreto N° 3395/96 (Reglamento de la Ley N° 5965 de Protección a las Fuentes de Provisión y a los Cursos y Cuerpos Receptores de Agua y a la Atmósfera) establece como norma de calidad de aire ambiente valores de $0,2 \text{ ppm}$ ($200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en 1 hora y $0,053 \text{ ppm}$ ($53 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en 1 año.

En adición, el progresivo despertar de conciencia acerca de las consecuencias que las acciones humanas tienen sobre la calidad del ambiente ha incrementado la presión de los ciudadanos hacia los diferentes niveles de gobierno. Ante esta situación, los gobiernos deben estar preparados para dar respuesta a los reclamos de las personas y comenzar a trabajar en el ordenamiento de las actividades urbanas a fin de minimizar sus impactos negativos sobre la salud de la población. Para ello es fundamental desarrollar sistemas de gestión basados en un diagnóstico de la calidad ambiental urbana que además permitan un seguimiento en el tiempo. Sin embargo, la realización de estos diagnósticos requiere a veces de costosos instrumentos de medición de parámetros físicos y químicos y/o de personal especializado, recursos con los que los estados locales no suelen contar.

La búsqueda de alternativas de diagnóstico y seguimiento de la calidad del aire, más asequibles pero igualmente eficaces, nos ha llevado a desarrollar y poner a prueba una nueva metodología basada en el análisis de imágenes. La misma podría ser fácilmente

⁴ ppm o partes por millón es una medida de concentración. 1 ppm es equivalente a $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

aplicada en los sistemas de gestión locales por personal técnico entrenado pero sin la necesidad de recurrir a especialistas en líquenes.

CAPÍTULO II

LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES

La cuantificación de la contaminación atmosférica mediante el uso de instrumentos de medición permite obtener resultados en forma rápida, sin embargo las bajas concentraciones en que se encuentran ciertos elementos denominados traza, así como las posibles fluctuaciones de emisión en el tiempo dificultan la tarea. Además, si el objetivo es inferir los efectos que los contaminantes tienen sobre los organismos vivos, se plantea otro problema: se sabe que la relación dosis-respuesta es habitualmente no lineal y este hecho se tiene en cuenta en evaluaciones ecotoxicológicas en las cuales se utilizan métodos estadísticos que dan cuenta de esa no linealidad (Castillo Morales, 2004); sin embargo esto no siempre es así en el uso de indicadores a nivel comunitario (Conti y Cecchetti, 2001) lo que puede conducir a evaluaciones equivocadas del nivel de contaminantes.

Los bioindicadores son organismos usados para la determinación cualitativa de contaminantes ambientales generados por los humanos. Esto es así porque pueden acumular los contaminantes en sus tejidos, lo cual genera un estrés que puede ser detectado a través de cambios en las características morfológicas o fisiológicas de los organismos o en sus parámetros demográficos.

Los líquenes son organismos muy sensibles a los contaminantes del aire debido a su particular biología; se trata de asociaciones simbióticas compuestas por un alga (fitobionte) y un hongo (micobionte). Se caracterizan por tener un talo (cuerpo vegetativo) perenne sin cutícula que permite el paso de líquidos y gases durante toda su vida. No disponen de aparato excretor ni de mecanismos de regulación de su contenido de agua, por lo cual son capaces de concentrar y acumular distintos compuestos presentes en el aire, incluyendo contaminantes como el NO₂.

Estos contaminantes no sólo son acumulados en los tejidos liquénicos sino que también se ha encontrado evidencia de que su alta concentración en el aire tiene una correlación negativa con la presencia de líquenes (Bates et al., 2001; Cepeda Fuentes and García Rowe, 1998; Giordani et al., 2002; Purvis et al., 2003). El fitobionte, es decir la parte

algal del líquen, es el primero en sufrir daños, y en tanto no disminuya la exposición a los contaminantes finalmente se produce la muerte del talo (Fernández-Salegui et al., 2006). Otro efecto que pueden producir los contaminantes atmosféricos es una alteración en el número de estructuras reproductivas sexuales de los líquenes (apotecios) que pueden llegar a desaparecer si la concentración de contaminantes es muy alta. Los apotecios son estructuras perennes en forma de disco o taza, de color diferente al del talo, donde se alojan las esporas del micobionte y a partir de las cuales se liberan (Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos, 2002).

Dentro del grupo de líquenes, que comprende unas 17.000 especies, existe una amplia gradación en cuanto a los requerimientos y a la sensibilidad frente a las condiciones ambientales. Por ello, pueden encontrarse comunidades de distinta composición de acuerdo con el nivel de contaminación ambiental.

Además, su longevidad (para ciertas especies de las zonas ártico-alpinas se ha estimado una edad de entre 1.000 y 4.500 años) (Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos, 2002) permite hacer un seguimiento en el tiempo de la presencia de contaminantes, ya que el crecimiento de los líquenes se detiene al aumentar la concentración de ciertas sustancias. Los talos jóvenes son aún más sensibles y dejan de crecer en entornos altamente contaminados, de manera que es posible inferir si la presencia de contaminantes es reciente o no.

Las características particulares antes mencionadas de este grupo de organismos permiten inferir el grado de contaminación aérea de manera rápida y a bajo costo. Es por ello que en muchos países ya se utiliza de manera rutinaria el mapeo de líquenes. (Loppi et al., 2002). Este mapeo es especialmente útil en zonas urbanas donde la gran variedad de contaminantes dificulta la medición con instrumentos de detección convencionales (Loppi et al., 2002). Una muestra concreta de la utilidad de este método es el estudio realizado en Italia, en la región de Veneto, donde Cislighi y Nimis (1997) encontraron una correlación entre la baja diversidad de líquenes y los casos de muerte por cáncer de pulmón.

Los métodos de biomonitorio con líquenes se basan en la observación de dos parámetros. Por un lado, se mide la abundancia, es decir, la cobertura por unidad de superficie. A mayor concentración de contaminantes en el aire se corresponde una

menor cobertura (Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos, 2002). El segundo parámetro es la diversidad de especies encontradas, puntualizando cuántas especies diferentes hay y cuáles son, ya que algunas son más sensibles que otras y son afectadas más tempranamente.

Si bien se ha demostrado que son sensibles a varios compuestos, muchos estudios se han centrado en la particular correlación positiva entre el contenido de azufre de los líquenes y la concentración de SO₂ en el aire (LeBlanc 1973; Silberstein et al., 1996), ya que este compuesto produce daños en la membrana celular del organismo interfiriendo con su crecimiento (Fields and StClair, 1984). Sin embargo, existe una excepción a esta generalidad y es que la especie *Lecanora conizaeoides* aparentemente se ha adaptado a los ambientes poluidos presentando cierta resistencia a metales y gases presentes en el aire (van Dobben et al., 2001). Su resistencia particular al SO₂ ha sido probada experimentalmente por Bates et al. en 1996. De acuerdo con algunos estudios se observó una notable expansión de esta especie en Europa y el Norte de América durante los últimos cien años (Wirth, 1993) y posteriormente una reversión de esta tendencia a causa de las medidas de control de emisiones gaseosas implementadas en estas áreas (van Dobben et al., 2001).

Con respecto a los óxidos de nitrógeno, se ha observado que pueden estimular el crecimiento de los líquenes debido a que el nitrógeno es un nutriente necesario para el crecimiento de los organismos fotosintetizadores (Von Arb et al., 1990). Sin embargo, esto es verdad si el compuesto se presenta en bajas concentraciones, pues en altos niveles resulta tóxico (Larsen et al., 2007). Otros estudios indican que la deposición de óxidos de nitrógeno en superficies contiguas a autopistas y rutas genera cambios en la comunidad de líquenes, favoreciendo el crecimiento de especies nitrófilas, es decir, aquellas que tienen mecanismos que les permiten asimilar rápidamente el nitrógeno en exceso (DEFRA, 2002), en detrimento de otras especies (Gombert et al., 2003).

Los estudios con bioindicadores tienen un rol importante en la aplicación y seguimiento de políticas de mejoramiento de la calidad del aire. Ejemplos de este tipo de acciones pueden encontrarse en varias ciudades de Italia en las que se observó la recolonización de especies que habían desaparecido. La reaparición de los líquenes se relacionó con la disminución de emisiones de SO₂ debido al cierre de centrales de generación de energía

eléctrica por combustión de carbón y al reemplazo de calentadores domésticos alimentados con carbón por los de gas metano (Palmieri et al., 1997). Aunque en la mayoría de los casos los estudios se llevan a cabo con la finalidad de diagnosticar situaciones de contaminación probadas, pueden también aplicarse a planes de prevención y de remediación.

MÉTODOS ACTUALES DE DETERMINACIÓN DE CONTAMINACIÓN MEDIANTE EL USO DE LÍQUENES

Los métodos utilizados para la determinación de contaminación aérea con líquenes son de dos tipos. Por un lado los físico-químicos que consisten en tomar muestras de un individuo y determinar mediante algún procedimiento físico o químico la concentración de determinado compuesto en las células del organismo. Por otro lado, los que involucran la medición de la cobertura y diversidad de especies encontradas en una superficie dada.

Por medio del primer método es posible cuantificar la acumulación de elementos traza en las células del líquen más allá de los requerimientos fisiológicos de la especie. Esta acumulación está directamente relacionada con la concentración de dichos elementos en la atmósfera pues, a partir de ella, se depositan en el cuerpo del organismo, sea en forma seca o húmeda.

Para el segundo método se realiza un mapeo de las especies encontradas, su distribución y su asociación. Luego, asignando valores numéricos a estas especies y mediante la aplicación de una fórmula matemática se determina el Índice de Pureza Atmosférica (IPA). Este índice se calcula como la suma de las frecuencias de aparición de cada especie pero de manera ponderada, es decir multiplicando el valor de la frecuencia por un número que indica el grado de sensibilidad de la especie a la contaminación. De esta forma, ante la presencia de especies más sensibles el IPA toma un valor mayor. Lo esperable es que cuanto mayor sea la pureza del aire mayor sea el valor del IPA.

La repetición del estudio en la misma área en tiempos diferentes permite hacer un seguimiento de la calidad del aire. Como ejemplo puede mencionarse el estudio actualmente realizado en los bosques eslovenos donde se está llevando a cabo un programa de monitoreo sistemático de líquenes con el fin de determinar las causas de la

declinación de dichos bosques. En este caso, se realiza un mapeo de las especies presentes con intervalos de cinco años (Jeran et al., 2007).

Esta metodología fue desarrollada por De Sloover and Le Blanc en 1968 y desde entonces ha sido modificada por otros autores y ampliamente utilizada en varios estudios (Jeran et al., 2002). Existen actualmente unas veinte fórmulas diferentes para calcular el IPA y todas ellas permiten predecir con diferentes grados de aproximación la concentración de ciertos contaminantes comunes (Conti y Cecchetti, 2001). En algunos casos se usa una versión simplificada de cálculo en la que sólo se registra el tipo de talo⁵ sin llegar a hacer una determinación al nivel de especie. Esta versión si bien presenta la facilidad de poder ser usada por gente no experta en taxonomía líquénica, no permite realizar una caracterización más pormenorizada de la situación de contaminación ya que aun dentro de cada categoría de talo hay diferencias en cuanto la sensibilidad de las especies.

Puede agregarse un tercer método de carácter cualitativo que consiste en recoger muestras de líquenes y observar los daños (si los hubiere) y/o alteraciones de su estructura. Esta metodología se considera cualitativa ya que sólo permite establecer la presencia o ausencia de determinadas especies químicas pero sin llegar a mensurar la concentración en que se encuentran. Como ejemplo puede citarse el cambio de conductividad eléctrica que ocurre como resultado de alteraciones de la membrana celular al someter al organismo a experimentos de fumigación (Hart et al., 1988).

DIFICULTADES DE LOS MÉTODOS ACTUALES

Cada uno de los métodos mencionados posee ventajas y desventajas con respecto a los otros. Por ejemplo el Índice de Pureza Atmosférica da una idea de cuál es el estado general del aire en cuanto a contaminación pero no informa acerca de cuáles son las fuentes de dicha contaminación. Sin embargo, cuenta con la ventaja de no requerir el uso de instrumentos de medición especiales ni reactivos químicos, así como tampoco de trabajo posterior en laboratorio. Las tareas se limitan a la observación y registro de las

⁵ De acuerdo con la morfología del talo los líquenes se clasifican en rudimentario (con aspecto de capa pulverulenta), filamentoso, gelatinoso, crustáceo (semejante a una costra), folioso (en forma de hoja), fruticoso (ramificado como un pequeño arbusto) y dimórfico (combina dos caracteres) (Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos, 2002).

especies encontradas en una superficie dada (como la corteza de determinadas especies de árboles o rocas o algún material de construcción) y a la construcción del IPA mediante el uso de una fórmula conocida. No obstante la sencillez procedimental, la dificultad radica en la necesidad de un cierto nivel de conocimiento taxonómico y de entrenamiento para reconocer las especies. Además, para una mejor comprensión del estado de polución actual del área en consideración es necesario contar con información previa de la comunidad natural o no alterada de dicha área. Como ventaja puede mencionarse el hecho de que el uso de líquenes como bioindicadores permite observar los efectos que la contaminación tiene sobre los organismos (y no sólo medir el nivel de contaminantes) y además permite integrar esta información en el espacio y el tiempo.

El método que aplica el análisis químico de los elementos presentes en el talo brinda mayor información de las posibles causas de la alteración de la comunidad liquénica, pues permite conocer cuáles son los elementos que se encuentran en exceso y sabiendo cuáles son las fuentes potenciales de dichos elementos, pueden establecerse relaciones entre los cambios detectados y las actividades antrópicas. En este caso también es importante conocer algunos datos de base como la geología del territorio ya que muchos elementos se encuentran de manera natural en altas concentraciones en determinados tipos de suelos y rocas. El desconocimiento de esta información conduciría a resultados y conclusiones erróneas.

Existen tres formas de llevar a cabo estos ensayos. Por un lado, tomando muestras de los individuos en el sitio de estudio para analizar el contenido de elementos en sus células. Por otro lado, pueden tomarse muestras de líquenes de sitios no contaminados (o poco contaminados) e implantarlos en el sitio de estudio para observarlos y analizarlos tiempo después. Una tercera forma consiste en cultivar líquenes en el laboratorio controlando las condiciones ambientales durante su crecimiento a fin de simular distintos escenarios de contaminación posibles. Los tres casos mencionados requieren el acceso a un laboratorio de análisis químico y conocimiento de las técnicas analíticas adecuadas para cada caso (espectrofotometría, métodos colorimétricos, absorción atómica, etc.), o bien asumir los costos de enviar las muestras para su análisis a un laboratorio externo; esto puede ser poco viable en caso de que se quieran utilizar estas metodologías para monitoreo y tomas de decisión en municipios.

LOS PIGMENTOS

Los líquenes producen metabolitos secundarios (o sustancias liquénicas) que son compuestos orgánicos, principalmente aromáticos, entre cuyas funciones se encuentran la actividad antibiótica, alelopática y fago-inhibidora y la fotoprotección frente a la radiación solar. Estos compuestos se encuentran en el espacio extracelular presentándose bajo formas amorfas o cristalinas, coloradas o incoloras. Algunos son exclusivos de algunos géneros y especies por lo que tienen importancia taxonómica. (Cedano Maldonado y Villaseñor Ibarra, 2006). Por ejemplo, el ácido vulpinico caracteriza al género *Letharia* y la parietina es característica de la familia *Teloschistaceae*. (Nash, 2008).

Existen tres grupos mayores de sustancias liquénicas. Por un lado, los dépsidos, depsidonas y dibenzofuranos. La mayoría de los dépsidos y depsidonas son compuestos incoloros que se acumulan en la médula del líquen. Sin embargo, el ácido úsnico que pertenece a este grupo es de color amarillo y se encuentra en la capa exterior o corteza. También las antraquinonas, cromonas y xantonas son compuestos coloreados que se ubican en la zona cortical.

El segundo grupo de compuestos, la mayoría de ellos pigmentados y localizados en la zona cortical, son los derivados del ácido pulvínico y las quinonas.

El tercer grupo es el de los terpenos y esteroides (Karunaratne et al, 2005).

Dentro del grupo de las sustancias liquénicas son de interés para este trabajo los compuestos coloreados, o pigmentos, que son los responsables del color que tienen los tejidos.

Además de las sustancias liquénicas, están presentes los pigmentos de las algas que son principalmente Clorofilas (verde), Carotenoides (amarillo y rojo) y Ficobilinas de coloración azul y roja presentes en las cianofitas.

Bajo condiciones de estrés ambiental los líquenes pueden sintetizar mayor cantidad de sustancias. Por ejemplo, la especie *Xanthoria parietina* varía el contenido de parietina (pigmento de color anaranjado) en la corteza superior de manera estacional, de acuerdo con la cantidad de radiación solar que recibe. Se sabe que este pigmento absorbe la

radiación ultravioleta en el rango de 400 a 500 nm, protegiendo al líquen de sus efectos dañinos (Gauslaa and McEvoy, 2005).

Las especies nitrófilas han desarrollado mecanismos para asimilar el exceso de nitrógeno y evitar su toxicidad. Estos líquenes aumentan la concentración de clorofila y su capacidad fotosintética (Gaio-Oliveira et al., 2005; Hauck et al., 2010).

Tanto los metabolitos secundarios como los pigmentos de las algas son solubles en solventes orgánicos como por ejemplo el alcohol etílico y la acetona.

EL ANÁLISIS DE IMÁGENES

El uso de imágenes fotográficas con el fin de estudiar diferentes ecosistemas se ha extendido a partir de la aparición de la fotografía digital. Los desarrollos más importantes ocurrieron en el terreno de los sensores remotos, es decir, la fotografía aérea y satelital. Puede mencionarse como ejemplo un estudio de los cambios en la vegetación en una zona industrial de la tundra rusa (Virtanen et al., 2002). También se ha utilizado para caracterizar el estado de plantaciones forestales y agrarias.

En relación a los líquenes, esta tecnología también ha sido utilizada, aunque con propósitos diferentes a los presentados en este trabajo. Por ejemplo se han construido imágenes a partir del espectro reflejado por la cubierta de líquenes en zonas subantárticas y en áreas desérticas con el fin de determinar los cambios producidos en dichas comunidades (Chen et al., 2005) o con el fin de determinar la interferencia que produce la cubierta líquénica en la prospección de los minerales subyacentes (Bechtel et al., 2002). También se han utilizado análisis fotográficos para cuantificar el crecimiento de líquenes (Bowker et al., 2008 y Purvis et al., 2002).

CAPÍTULO III

SITIOS DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo en tres localidades de la provincia de Buenos Aires, Haedo, Los Polvorines y Open Door (ver Figura 1).

Haedo, perteneciente al Partido de Morón, cuenta con 41.509 habitantes (Dirección de Estadística del Municipio de Morón) y una densidad poblacional de 6.695 hab/Km². Perteneció al primer cordón del conurbano bonaerense (según clasificación del INDEC) y se encuentra totalmente urbanizado. En las cercanías de los sitios de muestreo se han identificado industrias de primera y segunda categoría correspondientes a los rubros de fabricación de máquinas herramientas, correas y poleas, envases de cartón, motores eléctricos, pintura en polvo, muebles de madera, calzado, imprenta.

Los Polvorines con 53.354 habitantes y una densidad poblacional de 4.200 hab/Km², pertenece al segundo cordón del conurbano, también completamente urbanizado. En la zona del estudio no hay industrias establecidas.

Open Door con una densidad poblacional de 136 hab/Km², está ubicado por fuera de los cordones del conurbano bonaerense. En las cercanías de la zona del estudio no hay industrias, solamente silos para almacenamiento de granos.

Con respecto al clima, la región se caracteriza por presentar una temperatura media anual de 17°C. La época calurosa se extiende entre los meses de noviembre y marzo, mientras que la estación de frío lo hace entre los meses de mayo y agosto. El régimen de lluvias presenta una cierta homogeneidad, con un promedio total de 1.000 mm anuales y sin estación seca. Las precipitaciones coinciden con el avance del aire frío y húmedo proveniente del Sureste y Sur. La mayor frecuencia de lluvias ocurre en el período estival y a comienzos de otoño, mientras que las menores lluvias corresponden a los meses de invierno. Los vientos predominantes son del sector Noreste y Norte (cálidos y húmedos), seguidos por el Este, Sur y Sureste (EIA CEAMSE Norte III. 2005 UNGS).



Figura 1. Ubicación de las áreas de estudio dentro del conurbano bonaerense. En la imagen puede observarse la diferente densidad urbana de las áreas seleccionadas.

METODOLOGÍA

Selección del área de muestreo

Se seleccionaron tres áreas con diferente densidad de urbanización y de tránsito vehicular en las cuales, dadas las características, se preveía una diferencia en el grado de contaminación aérea con NOx.

Estudios posteriores corroboraron dichas diferencias. A su vez, en cada área se seleccionaron dos sitios de muestreo y en cada sitio, tres puntos de muestreo, es decir, tres árboles, en adelante forófitos.

Los sitios de muestreo se eligieron en base a la observación directa, seleccionando aquellos en los que se encontraba una mayor cantidad de forófitos cercanos entre sí con presencia de líquenes. Los sitios elegidos fueron:

Área de estudio 1: *Los Polvorines, barrio La Pradera.*

- Sitio de muestreo 1, en la intersección de las calles Eva Perón y J. L. Suárez.
- Sitio de muestreo 2, en la intersección de las calles Amenábar y J. A. Miralla.

En la Figura 2 se muestra la ubicación de los sitios de muestreo.



Figura 2. Área de estudio 1 - Los Polvorines

Área de estudio 2: Haedo, barrio Haedo Sur.

- Sitio de muestreo 1, en la intersección de las calles El Ceibo y Suipacha.
- Sitio de muestreo 2, en la intersección de las calles Del Valle Iberlucea y Gob. E. Castro.

En la Figura 3 se muestra la ubicación de los sitios de muestreo.



Figura 3. Área de estudio 2 – Haedo

Área de estudio 3: Open Door

- Sitio de muestreo 1, calle Buenos Aires.
- Sitio de muestreo 2, avenida Dr. Domingo Cabred.

En la Figura 4 se muestra la ubicación de los sitios de muestreo.



Figura 4. Sitio de muestreo 3 – Open Door

Medición de NO₂

En cada sitio de muestreo se colocó un muestreador pasivo de NO₂, siguiendo la metodología propuesta por Fagundez et al. (2001). El dispositivo, de construcción casera, consta de un tubo plástico de 6,5 cm de largo por 2,8 cm de diámetro con tapa a presión en uno de los extremos. Dentro de la tapa se colocó un círculo de papel absorbente de manera tal que quedara sujetado entre la tapa y el tubo. El papel fue embebido con 40 µl de una solución al 20% v/v de trietanolamina. El otro extremo del tubo fue cubierto con un trozo de media de nylon para evitar el ingreso de insectos y partículas grandes al interior del tubo (ver Figura 5). Cuatro tubos fueron dispuestos dentro de una campana construida con media botella plástica para protegerlos de la lluvia y el viento directo.

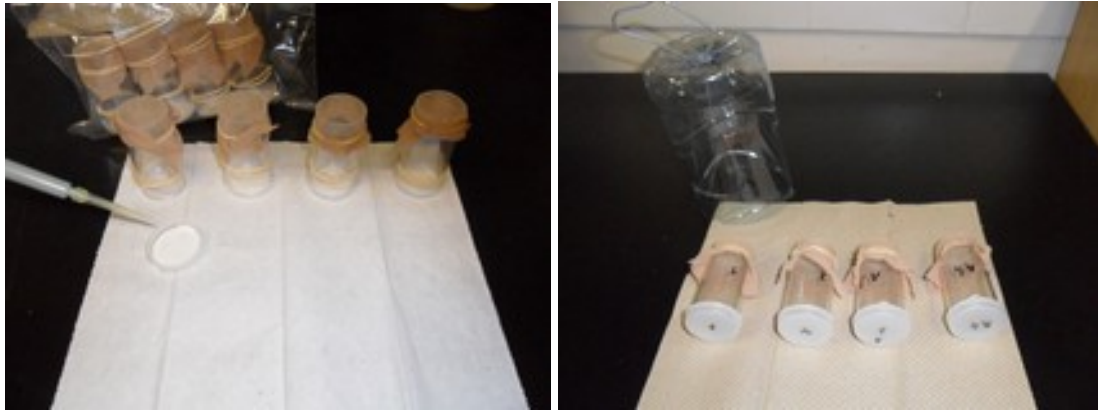


Figura 5. Armado de los tubos pasivos para medición de NO₂ atmosférico.

Esta campana, con los cuatro tubos dentro de ella, fue colocada en cada uno de los sitios de muestreo durante el tiempo de exposición que para cada sitio se consigna en la Tabla 1.



Figura 6. Dispositivo de medición de NO₂ colocado en el sitio de muestreo 2 en Los Polvorines.

También se prepararon cuatro tubos a modo de blanco que fueron guardados en una bolsa con cierre hermético y mantenidos en freezer durante el tiempo de exposición.

La Tabla 1 resume la información relativa a los dispositivos de medición de NO₂ en cada área de muestreo. Se incluyen las condiciones del tiempo meteorológico ocurridas durante el período de exposición (<http://www.tutiempo.net/clima/Argentina/AR.html>).

Área de muestreo	Sitio de muestreo	Nº de tubo	Ubicación geográfica	Soporte	Tiempo de exposición	Comentarios	
1 LOS POLVORINES	Blanco	9,10,11,12					
	1	1,2,3,4	Intersección de calles Eva Perón (1100) y J. L. Suarez	Poste de alambrado, sobre vereda	15 días	Calle de tierra, esquina avenida	T media: 13 °C H media: 70 % PP: - Vel. media viento: 8,80 Km/h
	2	5,6,7,8	Intersección de calles Amenabar y J.A.Miralia	Árbol sobre vereda	15 días	Calle de tierra, calle interna	
2 HAE-DO	Blanco	21,22,23,24					
	1	13,14,15,16	Calle Iberlucea 948	Árbol sobre vereda	21 días	Calle asfaltada. Perdido	T media: 11 °C H media: 79 % PP: 28,96 mm Vel. media viento: 8,56 Km/h
	2	17,18,19,20	Calle El Ceibo 692	Árbol sobre vereda	21 días	Calle asfaltada	
3 OPEN DOOR	Blanco	25,26,27,28					
	1	29,30,31,32	Calle Buenos Aires	Árbol sobre vereda	28 días	Calle paralela y contigua a las vías del ferrocarril	T media: 9 °C H media: 63 % PP: - Vel. media viento: 8,89 Km/h
	2	33,34,35,36	Av. Dr. Domingo Cabred	Árbol sobre vereda	28 días	Calle principal del pueblo	

Tabla 1. Información relativa a los dispositivos de medición de NO₂.

Tanto el momento de medición como el tiempo de exposición para cada área fueron diferentes en función de la disponibilidad del laboratorio donde se realizaron los análisis posteriores. No obstante los resultados de concentración de NO₂ están relativizados a la unidad de tiempo (segundo) para hacerlos comparables.

Al finalizar el período de exposición los tubos fueron retirados y llevados al laboratorio donde se procedió a medir la concentración de NO₂ absorbido mediante método espectrofotométrico.

El mismo consiste en sumergir el papel de filtro en agua destilada para obtener una solución de nitritos a partir del N absorbido en él. Mediante el agregado de una solución formadora de color se tiñe la solución y se mide la absorbancia de la misma a 540 nm (longitud de onda de mayor absorbancia para el nitrito). Luego, en base a una curva de calibrado previamente construida se calcula la concentración de NO₂ absorbida en cada tubo pasivo durante el tiempo de exposición.

Para poder comparar los resultados, la concentración de NO₂ obtenida es relativizada a segundos despejando el valor C (mol/cm³) de la ecuación:

$$Q = \frac{-D(C - C_0) \pi r^2 t}{z} \text{ mol}$$

Donde Q es la concentración de nitrógeno en el papel de filtro (moles), D es el coeficiente de difusión del nitrógeno a través del aire (0,154 cm²/seg), πr^2 es el área de la sección del tubo (cm²), z es el largo del tubo (cm) y t es el tiempo de exposición en segundos (Shooter, 1993).

Medición de la densidad de tránsito vehicular

En cada uno de los sitios de muestreo se estimó la densidad de tránsito mediante un conteo de vehículos discriminados en automóviles, camiones, colectivos y motos. El mismo se realizó en tres días laborales de una semana, contando los vehículos durante diez minutos, en tres momentos del día, entre las 8 y las 9 de la mañana, entre las 16 y las 17 y entre las 19 y las 21 horas (Boffi Lissin, 2003); con esos datos se calculó un flujo horario promedio de vehículos y un rango por sitio.

Registro de líquenes

En cada sitio de muestreo se seleccionaron tres forófitos en los que se tomaron muestras de los líquenes encontrados. Para ello se trabajó con una grilla de muestreo de 50 x 30 cm, dividida en 10 cuadrantes de 12 x 8 cm (Figura 7). La misma se sujetó al tronco del árbol sobre un sector con presencia de líquenes, realizando en cada uno de los cuadrantes las siguientes actividades:

- toma de fotografía con escala de color de referencia
- registro de la cobertura de líquenes
- registro de la presencia o ausencia de apotecios mediante la escala de Braun-Blanquet (Margalef, 1981)

Luego se extrajeron todos los líquenes presentes en uno de los cuadrantes, eligiendo aquel en el que se observaba la mayor cantidad de especies diferentes. Estas muestras fueron guardadas en bolsas y llevadas al laboratorio para su posterior procesamiento.



Figura 7. Gradilla de muestreo.

Extracción de pigmentos

La extracción de pigmentos se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Aminot et al. (1983). En laboratorio los líquenes colectados fueron separados de restos de corteza y fueron machacados en mortero con 17 ml de acetona al 90%. El extracto coloreado obtenido fue colocado junto con los restos de líquenes machacados en tubos de ensayo previamente rotulados y cubiertos con papel aluminio con el fin de evitar la descomposición de pigmentos fotosensibles. Los tubos fueron guardados en freezer durante 48 hs para lograr una mayor extracción. Al cabo de ese tiempo, los extractos se centrifugaron durante 5 minutos en tubos tipo Falcon y con centrífuga Rolco, modelo 2036. A continuación se tomó una alícuota del extracto centrifugado y se realizó el análisis espectrofotométrico en espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 y utilizando cubetas de cuarzo de 10 mm de paso óptico. La lectura se efectuó en el rango de 280 a 780 nm, con un intervalo de 5 nm (ver Figura 8 como ejemplo).

El método de extracción con acetona es efectivo para pigmentos fotosintéticos y para ácidos liquénicos. Si bien no extrae todos los pigmentos que pueden estar presentes en un líquen, es el método más utilizado por su baja peligrosidad para el operador (Aminot, 1983).

Se obtuvieron 17 espectros correspondientes a diecisiete de los dieciocho forófitos muestreados. Uno de los datos fue perdido a causa de un corte de luz en el laboratorio.

Se calculó el índice de diversidad de Shannon-Wiener para los pigmentos de cada uno de los 17 forófitos a partir de las tablas de datos correspondientes a los espectros de absorbancia. Las tablas completas se presentan en el DVD anexo.



Figura 8. Ejemplo de espectro de absorbancias. Corresponde a los líquenes recolectados en el árbol 2 del sitio de muestreo 2 en Los Polvorines.

Registro fotográfico

En cada forófito se tomaron fotografías del tronco, grilla completa y cuadrantes individuales. Las fotografías fueron tomadas con cámara digital Olympus SP-800UZ en modo automático que compensa la luminosidad, sin flash. Se colocó en cada foto una escala de color de referencia de Kodak®.

Análisis de imágenes

Para analizar la diversidad de colores en las imágenes se utilizó el software libre ImageJ (Rasband, 1997-2012).

En cada fotografía se seleccionó un área de 2900 x 1800 píxeles tomando como criterio que el área tuviera la mayor densidad de líquenes posible y se construyó el histograma de color de la selección. Esto es, el número de píxeles de cada color (rojo, verde, azul) correspondiente a cada nivel de brillo (de 0 a 255). Luego se dividió dicho histograma en rangos de 25 niveles de brillo y se calculó el índice de Shannon-Wiener de diversidad de colores.

Además se seleccionaron las distintas especies de líquenes que pueden observarse a simple vista en la fotografía y se procedió de igual manera con cada una de ellas, es

decir, se obtuvo el histograma de color y el índice de diversidad de colores de cada especie.

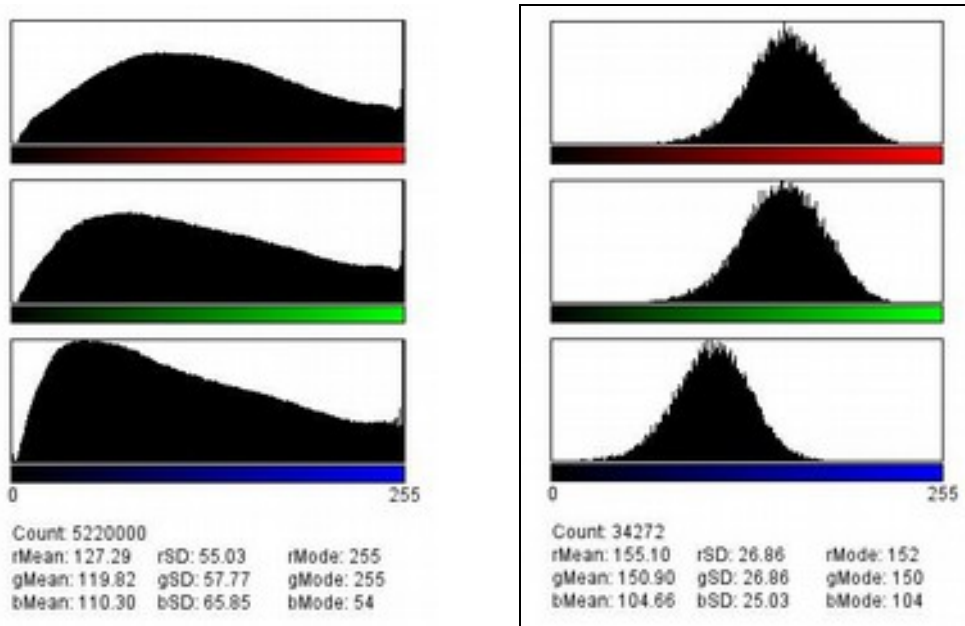
Se analizaron un total de 170 imágenes, 60 correspondientes al área de estudio 1, Los Polvorines, 50 al área de estudio 2, Haedo y 60 al área de estudio 3, Open Door. A partir de las selecciones realizadas en cada fotografía se calcularon un total de 662 valores del índice de diversidad de colores.

Todas las imágenes, con sus respectivas selecciones, así como las tablas con los valores de los histogramas de color se incluyen en el DVD anexo.

Las Figuras 9 y 10 muestran ejemplos del procedimiento descrito.



Figura 9. Fotografía que muestra las selecciones analizadas en un cuadrante del árbol 5 del sitio 2 en Open Door.



(a)

(b)

Figura 10. Gráficos que muestran los histogramas de color correspondientes a la imagen completa (a) y a una de las selecciones (b) de un cuadrante.

También se calculó el porcentaje de cobertura de líquenes en cada cuadrante mediante el uso de los programas Photoshop® e ImageJ (Figura 11).

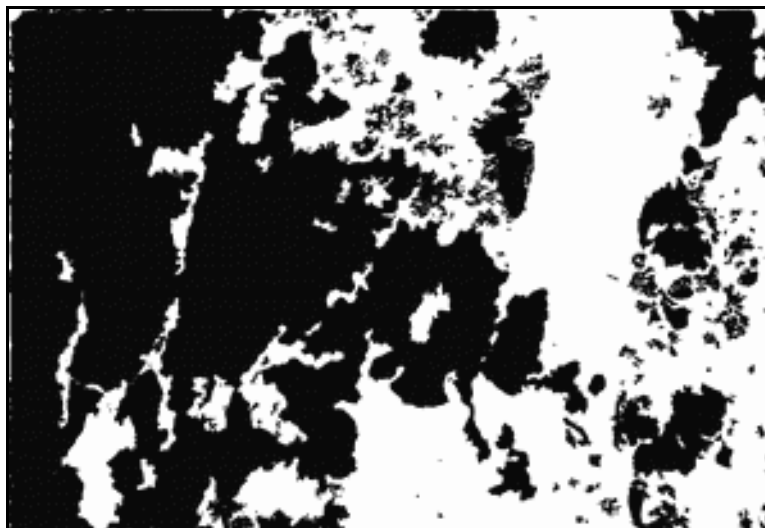


Figura 11. Imagen procesada con el fin de medir la cobertura de líquenes en el cuadrante.

Análisis estadístico

Los valores de los índices de Shannon de pigmentos, fotografías completas y selecciones se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) considerando como variable categórica la localidad. Del mismo modo se analizaron las mediciones de NO₂ y los porcentajes de cobertura de líquenes. Todos los análisis estadísticos se realizaron con Excel 2007[®]. Las diferencias entre tratamientos se consideraron significativas para valores de $p < 0,05$.

Para estudiar la relación de los valores de diversidad de pigmentos, diversidad de colores y cobertura con la concentración de NO₂ en cada sitio se procedió de la siguiente forma: el valor de concentración de NO₂ en cada sitio se tomó como el promedio de los cuatro tubos de muestreo, ya que dichos tubos no son réplicas sino que sólo miden la variabilidad intrínseca del método químico. A cada uno de estos valores de NO₂ le corresponden varios valores de diversidad o cobertura dependiendo del número de áreas o subáreas tomadas para cada medición según se explicó más arriba. Como la concentración de NO₂ no es fija por punto sino una variable aleatoria medida, los resultados se ajustaron con regresiones lineales modelo II (considerando la variabilidad en X) (Zar, 1996). Dado que no existe a priori seguridad de que el ajuste lineal sea el mejor, en todos los casos se realizaron también dos ajustes polinomiales, de orden 2 y de orden 3. Los tres modelos (el lineal, el cuadrático y el cúbico) se compararon entre sí con el criterio de información máxima de Akaike (AIC) y el mismo corregido para muestras pequeñas (AICc) (Bozdogan, 2000; Pan, 2001); este criterio permite ponderar por un lado el grado de ajuste, medido a través del coeficiente de correlación de Pearson, pero por otro penaliza el modelo por el número de parámetros a estimar. De esta forma se selecciona el modelo con relación ajuste/parámetros más favorable.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MEDICIÓN DE NO₂

La Tabla 2 muestra las concentraciones de NO₂ medidas en cada uno de los sitios de muestreo.

SITIO		CONCENTRACIÓN DE NO ₂ (ppb)
ÁREA DE ESTUDIO 1 LOS POLVORINES	SITIO 1	0,690 ± 0,015
	SITIO 2	0,559 ± 0,039
ÁREA DE ESTUDIO 2 HAEDO	SITIO 2	0,044 ± 0,004
ÁREA DE ESTUDIO 3 OPEN DOOR	SITIO 1	0,115 ± 0,031
	SITIO 2	0,130 ± 0,028

Tabla 2. Concentración media de NO₂ expresada en ppb medida en cada sitio de muestreo. Los resultados se acompañan con sus respectivos valores de desvío estándar.

Los resultados obtenidos son bajos y las absorbancias medidas se encuentran en el límite inferior de la curva de calibrado.

Al realizar ANOVA se comprobó que existen diferencias significativas entre las tres áreas de estudio ($p < 0,05$), presentándose en orden decreciente Los Polvorines, Open Door y Haedo. Asimismo, se observa una diferencia significativa entre los dos sitios de Los Polvorines (Figura 12).

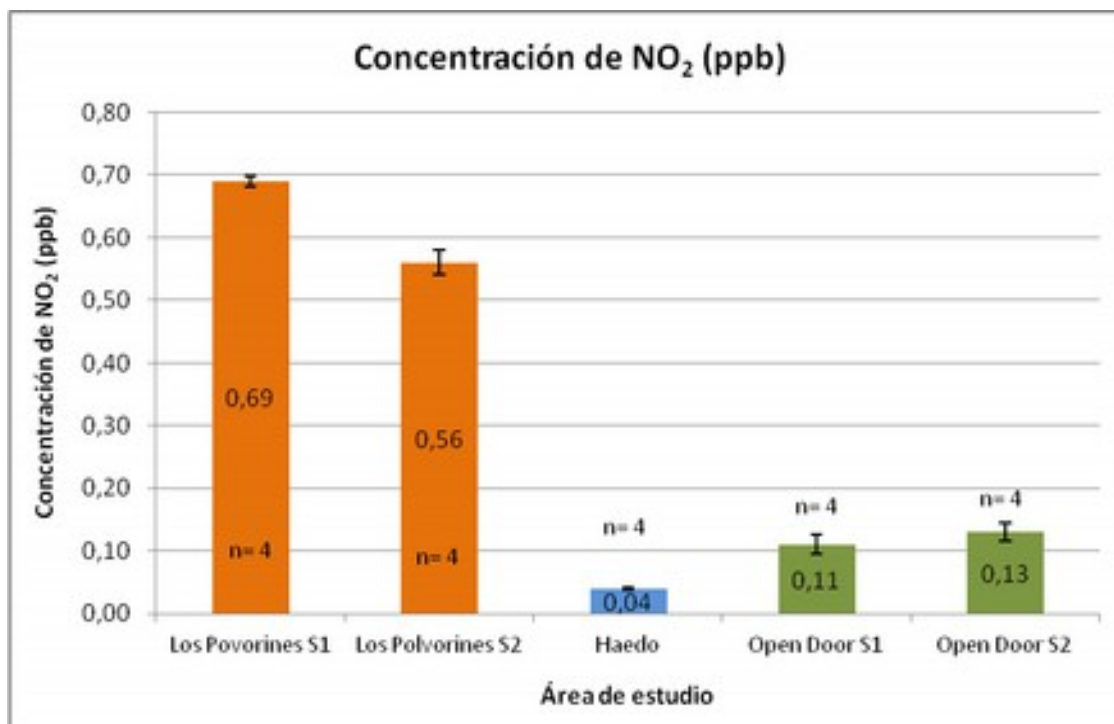


Figura 12. Concentración de NO₂ medida en cada área de estudio. El valor promedio y el tamaño muestral (n) se muestran en cada barra. Las barras de error corresponden al error estadístico medio.

Cabe aclarar que el orden en que se disponen las localidades estudiadas en función de la concentración de NO₂ medida no es la esperada de acuerdo con el grado de densidad urbana. Así, Haedo que se ubica en el primer cordón del conurbano bonaerense presenta el menor valor, seguido por Open Door que es el de menor densidad poblacional y luego por Los Polvorines, con una densidad intermedia.

Con respecto al tránsito vehicular se observan diferencias de flujo entre los sitios. Así por ejemplo, en Los Polvorines el sitio 1 de muestreo se ubica sobre uno de los corredores más importantes en dirección NE – SO, la calle José León Suarez, por la que circulan tres líneas de colectivos (Plan de Ordenamiento y Desarrollo Urbano del Municipio de Malvinas Argentinas). En el caso de Open Door, el sitio 2 se encuentra sobre el Boulevard Dr. Cabred que es la calle principal del pueblo, por la que circulan dos líneas de colectivos y transportes de carga. El sitio 1 se emplaza a una cuadra del mencionado boulevard, sobre una calle paralela al ferrocarril diesel de la línea San Martín, el cual cuenta con una frecuencia diaria. En ambos casos el flujo vehicular es

muy bajo comparado con las otras localidades. El sitio elegido en Haedo corresponde a un área residencial por donde circula una línea de colectivos.

En la Tabla 3 se resumen la información del flujo vehicular. El sitio 1 de Los Polvorines es el que presenta el mayor flujo horario para las cuatro categorías de vehículos.

Teniendo en cuenta estos resultados puede inferirse que el nivel de NO₂ en el aire es debido principalmente al flujo vehicular de las calles en las que se colocaron los muestreadores. Sin embargo, el sitio 2 de Haedo parece no concordar con esta inferencia ya que aun contando con un alto tráfico (es el segundo en importancia) posee la menor concentración de NO₂. Por su parte, el sitio 2 de Los Polvorines si bien posee la menor densidad de tráfico detenta un alto nivel del contaminante.

	LOS POLVORINES								HAEDO				OPEN DOOR							
	SITIO 1				SITIO 2				SITIO 2				SITIO 1				SITIO 2			
	AU	CA	CO	MO	AU	CA	CO	MO	AU	CA	CO	MO	AU	CA	CO	MO	AU	CA	CO	MO
Máximo	117	1	1	5	1	0	0	0	25	1	3	2	4	1	0	1	4	2	2	5
Mínimo	184	10	8	12	4	0	0	0	17	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	142	3	4	8	3	0	0	0	21	1	1	1	1	0	0	0	2	1	1	2
Flujo hora	853	21	23	46	16	0	0	0	123	6	7	6	8	2	0	2	10	7	7	13

Tabla 3. Rango, promedio y flujo vehicular. AU: auto, CA: camión, CO: colectivo, MO: moto. Los valores se redondearon al número entero más próximo.

REGISTRO DE LÍQUENES

En las Tablas 3 y 4 se resume la información relativa a los forófitos y el registro de líquenes in situ y la posterior determinación de especies en laboratorio. El Sitio 1 de Haedo fue desestimado debido a la pérdida de los tubos pasivos. No se recolectaron datos allí.

Como puede verse los forófitos muestreados no pertenecen a la misma especie, situación que sería recomendable dado que las diferencias de las características morfológicas (rugosidad) y químicas (pH) de la corteza influyen sobre el establecimiento de los líquenes cortícolas. La escasa ocurrencia de líquenes en las áreas estudiadas, particularmente en Haedo, hizo necesario llevar a cabo el relevamiento sin tener en cuenta la especie de árbol. La importancia de esto se discute más adelante a la luz de los resultados.

Área de estudio	Sitio	Nº de Arbol	Especie de árbol	DAP (m)	Apotecios (escala de Broun-Blanquet)	Porcentaje de cobertura									
						Cuadrante									
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Los Polvori- nes	1	1	Plátano	1.05	2	2	2	22	4	34	39	24	62	3	7
		2	Fresno	2.20	4	2	7	10	4	13	4	11	1	11	<1
		3	Fresno	1.60	3	8	10	7	16	7	8	8	10	9	-
	2	1	Paraíso	2.05	0	6	11	4	10	6	7	4	1	2	3
		2	Paraíso	1.61	2	6	1	11	7	14	1	3	1	4	1
		3	Paraíso	1.95	1	37	2	46	6	18	10	6	4	8	5
Haedo	2	1	Liquidambar	1.04	0	2	3	4	1	5	2	6	3	8	4
		2	Roble	1.30	0	7	3	1	1	1	1	4	2	2	2
		3	Ligustro	0.94	0	1	2	3	<1	5	2	5	2	1	2
		4	Ceibo	1.04	1	5	8	4	5	2	4	4	5	1	2
		5	Tilo	1.10	0	1	<1	1	3	2	2	1	2	1	2
Open Door	1	1	Paraíso	1.57	0	32	20	19	18	32	18	14	16	10	21
		2	Paraíso	1.25	1	38	44	50	70	67	42	47	34	31	41
		3	Paraíso	1.44	4	55	45	35	23	36	68	39	50	54	65
	2	1	Paraíso	1.47	1	22	40	47	65	33	80	73	46	51	47
		2	Paraíso	1.38	0	31	52	80	85	89	24	49	55	53	63
		3	Paraíso	2.38	4	43	45	50	55	76	44	72	62	65	60

Tabla 3. Forófitos y registro de líquenes in situ.

ÁREA	SITIO	GÉNERO o ESPECIE
1 Los Polvorines	1	<i>Candelaria concolor</i> <i>Hyperphyscia syncolla</i> <i>Lepraria sp</i> <i>Parmotrema pilosum</i> <i>Parmotrema praesorediosum</i>
	2	<i>Candelaria concolor</i> <i>Dirinaria applanata</i> <i>Physcia undulata</i>
2 Haedo	2	<i>Candelaria concolor Pertusaria sp</i> <i>Physcia rolffi</i>
3 Open Door	1	<i>Candelaria concolor</i> <i>Ramalina celastri</i> <i>Buellia sp</i> <i>Lecanora sp</i> <i>Parmotrema sp</i> <i>Phaeophyscia sp</i> <i>Physcia undulata</i>
	2	<i>Candelaria concolor</i> <i>Lepraria sp</i> <i>Normandina pulchella</i> <i>Parmotrema pilosum</i> <i>Parmotrema sp</i> <i>Physcia undulata</i> <i>Punctelia sp</i>

Tabla 4. Géneros y especies de líquenes que pudieron ser identificados en las tres áreas de estudio.

Además se encontraron líquenes crustosos no identificados, así como también algas y hongos.

Open Door presentó la mayor riqueza de especies, entre ellas se encontraron varias del tipo crustoso. Son representantes de este grupo los géneros *Buellia*, *Lecanora* y *Lepraria*. También allí se encontró *Ramalina celastri*, una especie identificada por Estrabou et al. (2004) como sensible a la contaminación ya que según un estudio realizado en la Ciudad de Córdoba se observó una reducción del número de apotecios y de la cobertura en relación al aumento de concentración de contaminantes atmosféricos. Esta especie no puede crecer en sitios con alto nivel de polución; esto es coherente con la baja densidad de tránsito vehicular medida en esta localidad.

En Los Polvorines, que presentó una riqueza de especies intermedia, pudieron identificarse cuatro especies nitrófilas (*Candelaria concolor*, *Hyperphyscia syncolla*, *Dirinaria applanata* y *Physcia undulata*). Asimismo se encontró la especie *Parmotrema pilosum* que de acuerdo con Sáenz et al. (2007) es tolerante a la contaminación; esto también es coherente por tratarse del área con mayor flujo vehicular en uno de los sitios y, aunque el sitio 2 tiene poco tránsito, está ubicado a menos de 300 m de la calle J.L. Suárez donde se midió el flujo vehicular más alto de todos y las mayores concentraciones de NO₂.

En el sitio de Haedo sólo se encontraron tres especies (riqueza más baja), una de las cuales es nitrófila (*C. concolor*) y otra crustosa (*Pertusaria sp.*). Es llamativo el hecho de que en Haedo se hayan registrado las concentraciones más bajas de NO₂ y, sin embargo, tanto la riqueza de líquenes como su cobertura sean las más bajas. Habría que considerar el hecho de que los líquenes, como la mayoría de los bioindicadores, otorgan una visión histórica y acumulada mientras que las mediciones químicas de contaminantes representan aquí una ventana de tiempo estrecha. Para una profundización y mejor comprensión de las respuestas observadas se podrían comparar los valores biológicos observados con registros de contaminantes tomados sobre un período más largo, por ejemplo, anual. También cabría la posibilidad de que existan en la zona otros contaminantes de origen diferente. Ya se mencionó que los líquenes son también sensibles a otros contaminantes (ozono, material particulado, aerosoles, metales pesados, dióxido de azufre, etc).

En resumen, la incidencia de especies nitrófilas en las tres áreas de estudio aumenta con la concentración de NO₂ medida. Este resultado concuerda con estudios llevados a cabo

Francia donde se observaron cambios en las comunidades de líquenes con tendencia a un predominio de nitrófilos en zonas cercanas a autopistas (Gombert, 2003). Por otro lado, sólo en Open Door se identificó una especie sensible.

PIGMENTOS

Los valores de diversidad de pigmentos para las tres áreas de estudio no fueron significativamente diferentes (Figura 13).

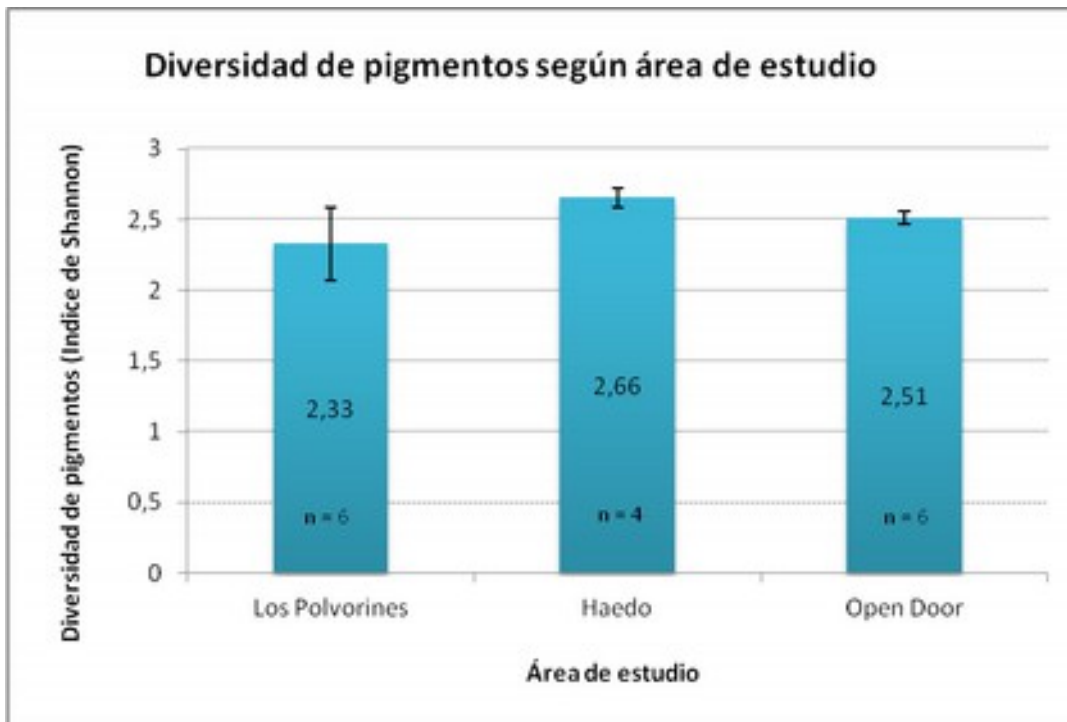


Figura 13. Diversidad de pigmentos medida en cada área de estudio. El valor promedio y el tamaño muestral (n) se muestran en cada barra. Las barras de error corresponden al error estadístico medio.

REGISTRO FOTOGRÁFICO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

A modo ilustrativo se muestran algunas de las fotografías tomadas en las tres áreas de estudio. La totalidad de las imágenes obtenidas en campo se adjuntan en el DVD anexo.

Los Polvorines



Haedo



Open Door





Para la diversidad de colores de las fotografías completas, también calculadas con el índice de Shannon-Wiener, Haedo y Open Door presentan valores significativamente mayores que Los Polvorines ($p < 0,05$), pero no se diferencian entre sí (Figura 14).

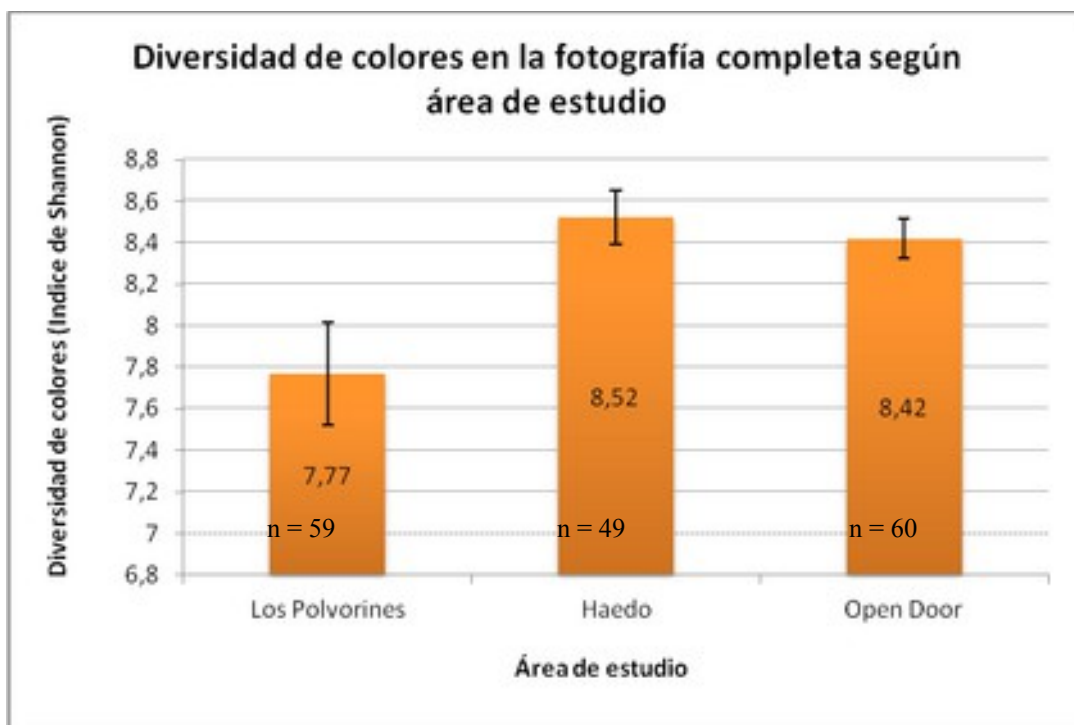


Figura 14. Diversidad de colores en las imágenes completas correspondientes a cada área de estudio. El valor promedio y el tamaño muestral (n) se muestran en cada barra. Las barras de error corresponden al error estadístico medio.

En cambio, como puede verse en la Figura 15, para la diversidad de colores de las áreas seleccionadas en las fotografías no se encontraron diferencias significativas entre Los Polvorines y Haedo, pero sí entre estos sitios y Open Door ($p < 0,05$), que posee el mayor valor de la serie.

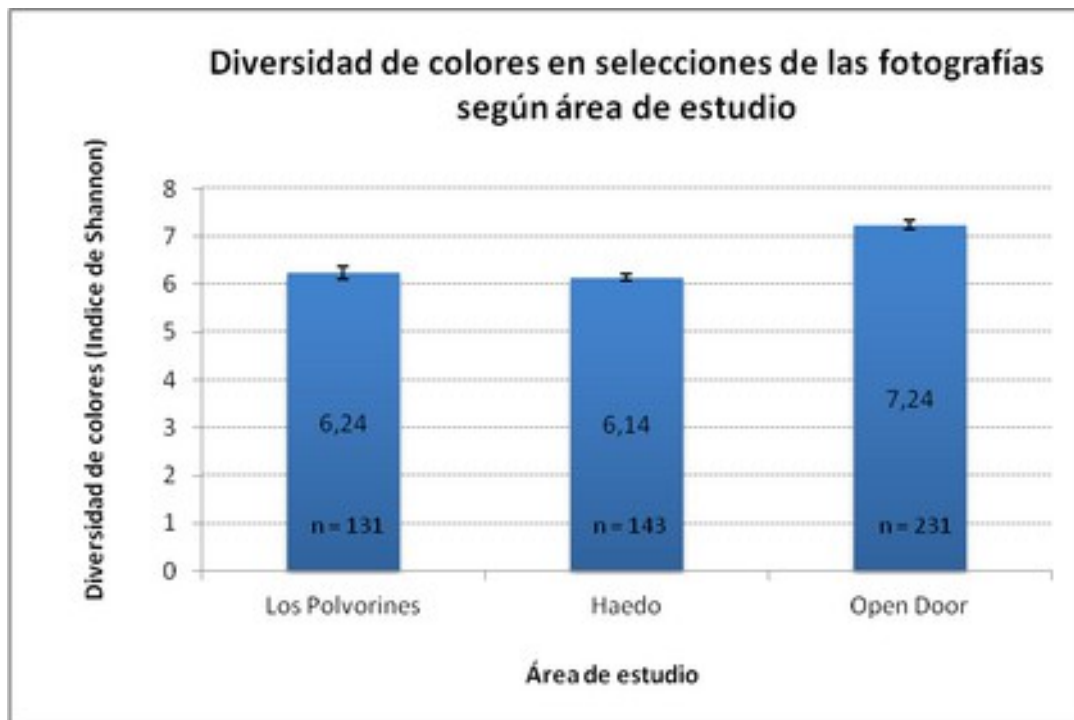


Figura 15. Diversidad de colores de las selecciones realizadas sobre las fotografías para cada área de estudio. El valor promedio y el tamaño muestral (n) se muestran en cada barra. Las barras de error corresponden al error estadístico medio.

Finalmente, con respecto a la cobertura media de líquenes en los forófitos muestreados el análisis de varianza arroja diferencias significativas entre las tres áreas de estudio ($p < 0,05$). Se ordenan decrecientemente: Open Door – Los polvorines – Haedo (Figura 16).

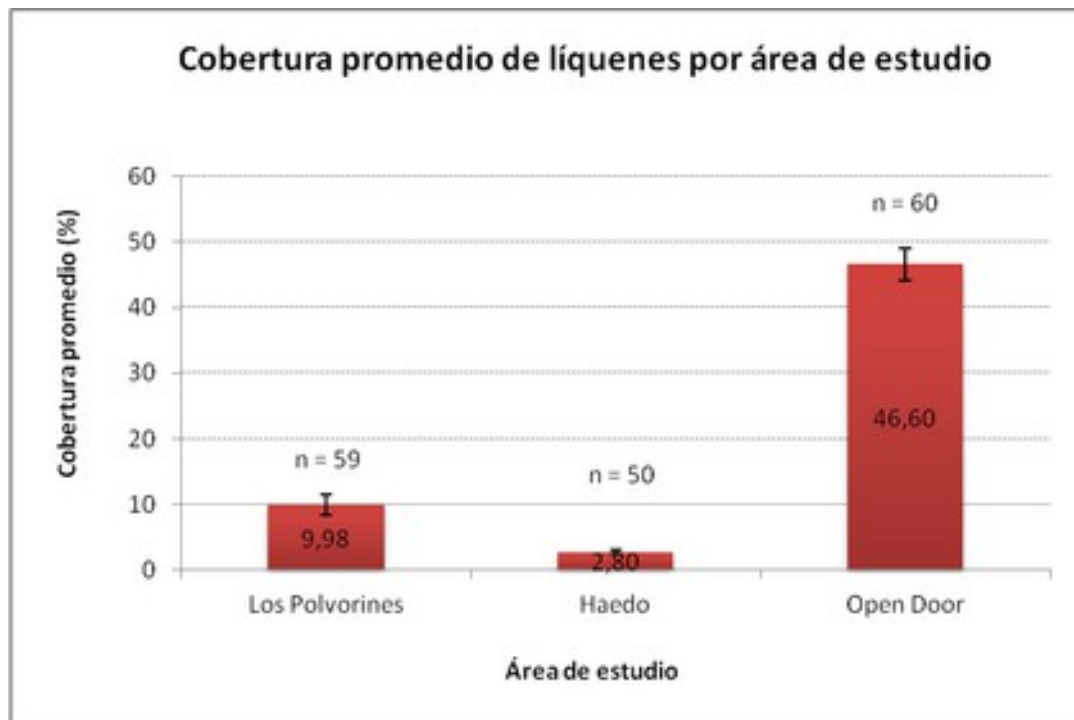


Figura 16. Porcentaje promedio de cobertura de líquenes en los forófitos muestreados en cada área de estudio. El valor promedio y el tamaño muestral (n) se muestran en cada barra. Las barras de error corresponden al error estadístico medio.

Resumiendo la información que se desprende de estas comparaciones es evidente que la diversidad de pigmentos depende más de la constitución de los propios líquenes que del lugar de muestreo y el nivel de contaminación. Lo que estaría diciendo esto es que, más allá de cuáles sean las especies presentes, su diversidad de pigmentos es aproximadamente la misma. Esta métrica no podría usarse con fines de monitoreo y, de alguna manera, no coincide con la correlación de diversidades a varios niveles propuesta por Margalef (1991) que se menciona en la introducción.

Si se consideran las diversidades de colores en las fotografías, al analizar la imagen completa, Los Polvorines se diferencia de las otras dos localidades, indicando que esta medición tiene potencial para separar sitios con contaminación debida a tránsito (Los Polvorines tiene el mayor flujo de vehículos y los mayores valores de NO_2). Por otra parte, cuando se compara la diversidad de colores de las selecciones de las imágenes que contienen sólo líquenes (no corteza), se separa del resto la localidad de Open Door, con menos tránsito y aparentemente menos contaminada (recordemos la presencia de una especie altamente sensible).

La cobertura separa los tres lugares pero no los ordena según la concentración medida de NO₂ ni según el flujo de vehículos. Como se comentó antes, esto podría deberse a que Haedo presente otro tipo de contaminación no considerada en este estudio y a la proyección temporal del valor indicador de los líquenes que pueden acumular contaminantes y responder en forma histórica y no instantánea.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN

El análisis de regresión entre diversidad de pigmentos y NO₂ muestra que ésta disminuye al aumentar la concentración del contaminante (Figura 17).

En la Tabla 5 se muestra la comparación de ajuste entre tres tipos de modelos, lineal, cuadrático y cúbico, mediante AIC y AICc. Según los criterios utilizados la regresión se ajusta mejor al modelo cúbico.

Modelo	r ²	AIC	AICc
Lineal	0,1043	10,5209678	11,4440448
Cuadrático	0,106	10,4886324	12,4886324
Cúbico	0,1147	12,3308705	15,9672341

Tabla 5. Comparación de ajuste entre tres modelos para la regresión entre diversidad de pigmentos y NO₂.

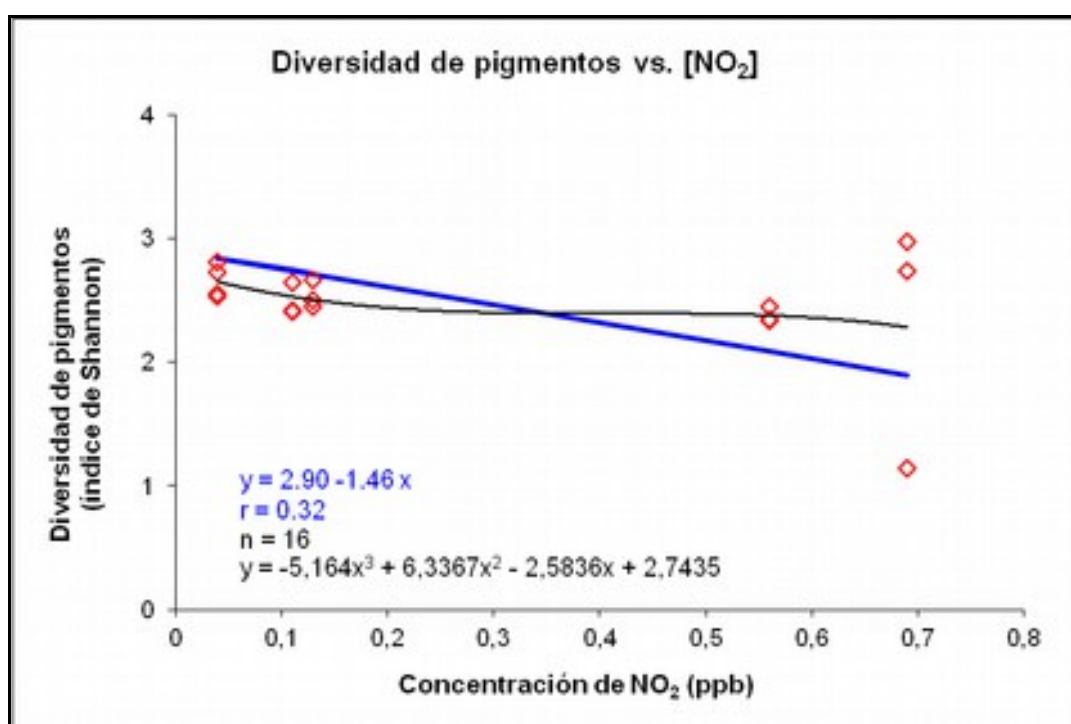


Figura 17. Análisis de regresión entre diversidad de pigmentos y concentración de NO₂. Se graficaron las regresiones cúbica y lineal. En el gráfico se muestran las ecuaciones para ambos modelos, el tamaño muestral (n) y el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r).

Este resultado es coherente con el hecho de que bajo condiciones de estrés aumentan ciertas sustancias liquénicas, lo cual incide en la diversidad de sustancias presentes en el talo, muchas de las cuales son pigmentadas. En un trabajo realizado por Karunaratne et al. (2005), los autores concluyeron que el ácido pulvínico, un pigmento que protege al líquen de la herbivoría, se encuentra en mayor concentración en líquenes con alto contenido de nitrógeno, elemento que los hace apetecibles para los herbívoros. Este sería el caso de los líquenes nitrófilos que cuentan con adaptaciones que les permiten asimilar el nitrógeno en forma de especies no tóxicas (Dahlman et al., 2004).

Por otro lado, se ha sugerido que las especies identificadas como nitrófilas podrían utilizar el nitrógeno en exceso para desarrollar apotecios (Gaio-Oliveira et al., 2005). Estrabou et al. (2004) hallaron un incremento en el número de apotecios de la especie nitrófila *P. undulata* en zonas urbanas de Córdoba. En nuestro caso de estudio, si bien no hay diferencias significativas entre las tres áreas en cuanto a la ocurrencia de apotecios, sí se observó una tendencia creciente en la presencia de estas estructuras congruente con el aumento de concentración del NO₂ (Tabla 3).

También se ha observado que bajo condiciones de estrés ciertas especies presentan diferencias en el espesor de la corteza y el número de algas en el cuerpo del líquen (Estrabou, 2004). Esto también tendría incidencia sobre la cantidad y distribución de los pigmentos aunque sería necesario realizar más estudios para poder aclarar si existe correlación con los niveles de NO₂ pues las alteraciones del fitobionte suelen vincularse más con la presencia de SO₂.

En cuanto a la diversidad de colores en las imágenes completas, también ésta disminuye conforme aumenta la concentración de NO₂ (Figura 18).

La Tabla 6 muestra la comparación de ajuste entre los tres modelos. Según los criterios utilizados la regresión se ajusta mejor al modelo cúbico.

Modelo	r ²	AIC	AICc
Lineal	0,07764967	11,1110959	11,1838232

Cuadrático	0,1078	10,4549552	10,6012967
Cúbico	0,1207	12,2288943	12,4742931

Tabla 6. Comparación de ajuste entre tres modelos para la regresión entre diversidad de colores en las imágenes completas y NO₂.

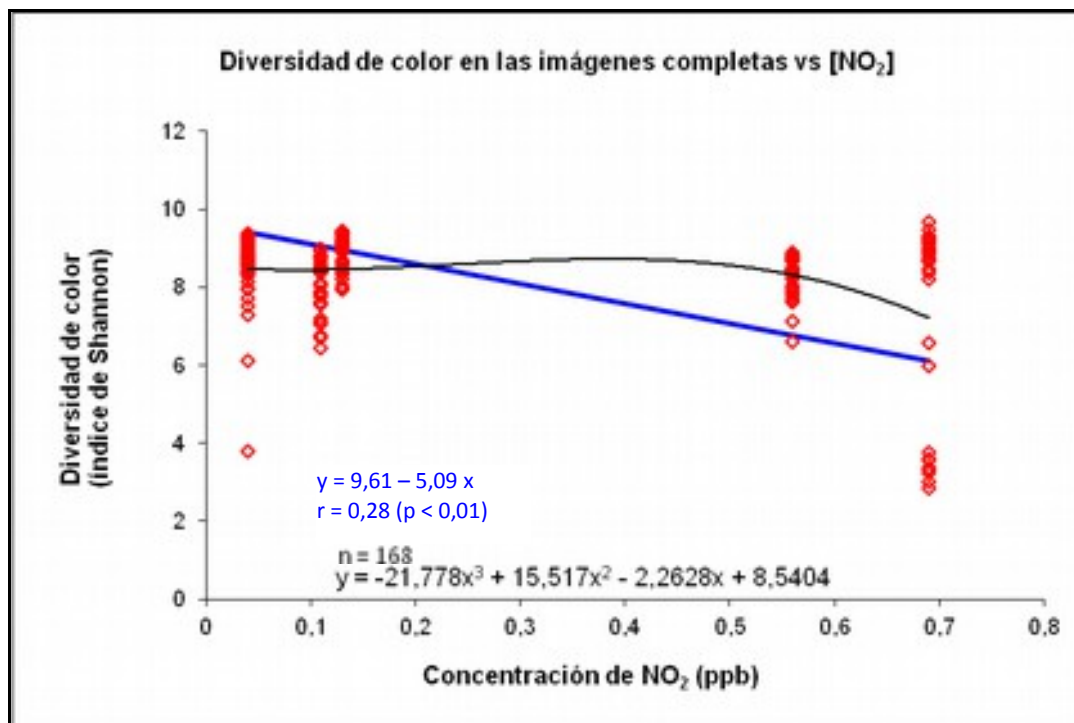


Figura 18. Análisis de regresión entre diversidad de color de las imágenes completas y concentración de NO₂. Se graficaron las regresiones cúbica y lineal. En el gráfico se muestran las ecuaciones para ambos modelos, el tamaño muestral (n) y el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r).

Cuando se relaciona la diversidad de colores en las áreas seleccionadas de las fotos con la concentración de NO₂, y luego de hacer la comparación entre los tres modelos (Tabla 7), se observa que el mejor ajuste es el lineal (Figura 19).

Modelo	r ²	AIC	AICc
Lineal	0,01724613	14,1203354	14,1442398
Cuadrático	0,0586	11,6740412	11,7219454
Cúbico	0,1291	12,094336	12,174336

Tabla 7. Comparación de ajuste entre tres modelos para la regresión entre diversidad de colores en las áreas seleccionadas y NO₂.

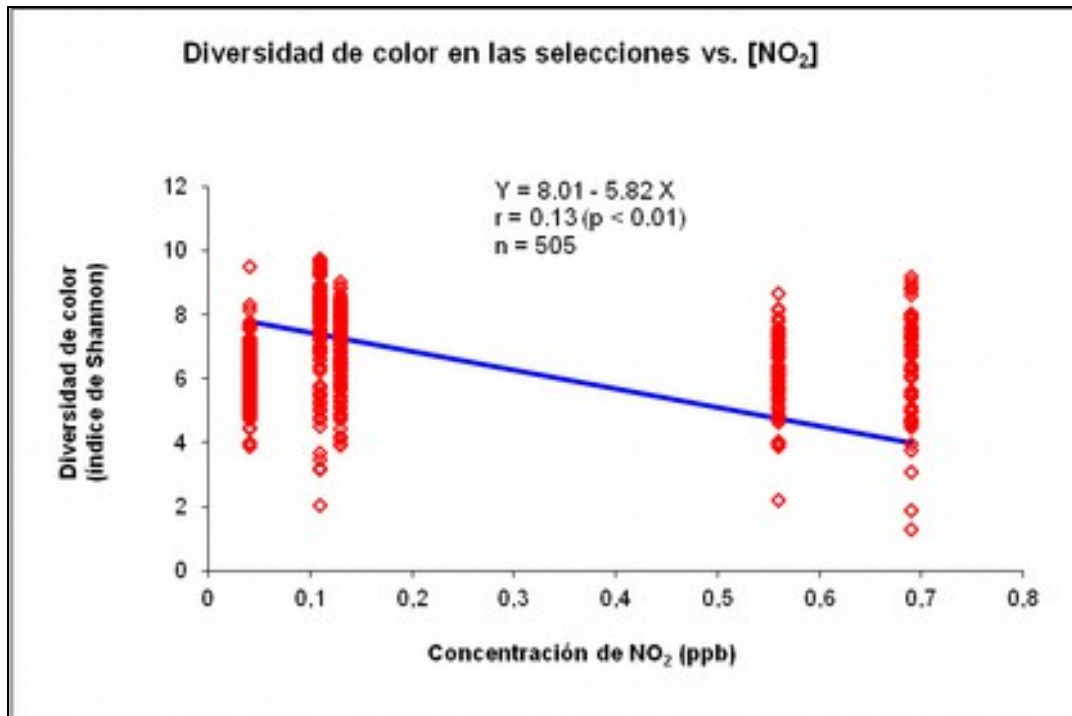


Figura 19. Análisis de regresión entre diversidad de color de las áreas seleccionadas de las fotografías y concentración de NO₂. En el gráfico se muestran la ecuación, el valor del tamaño muestral (n) y del coeficiente de correlación lineal de Pearson (r).

Al relacionar cobertura media con concentración de NO₂ también se obtiene que el mejor ajuste está dado por el modelo lineal (Tabla 8). Sin embargo, son llamativos los bajos valores de cobertura obtenidos en Haedo, a pesar de que en esta localidad se midieron los valores mínimos de NO₂ (ver Figura 20).

Esto podría deberse a varias razones; el aumento del nitrógeno tiene un efecto fertilizante, pero hasta determinado valor a partir del cual se vuelve tóxico para la mayoría de las especies de líquenes; por otra parte, como ya se comentó, en este lugar podría haber presencia de otros contaminantes o un efecto acumulativo de los mismos.

Modelo	r ²	AIC	AICc
Lineal	0,053	9,87492673	9,94721589
cuadrático	0,27	8,61866664	8,76412119
cúbico	0,71	8,68498062	8,92888306

Tabla 8. Comparación de ajuste entre tres modelos para la regresión entre cobertura media y NO₂.

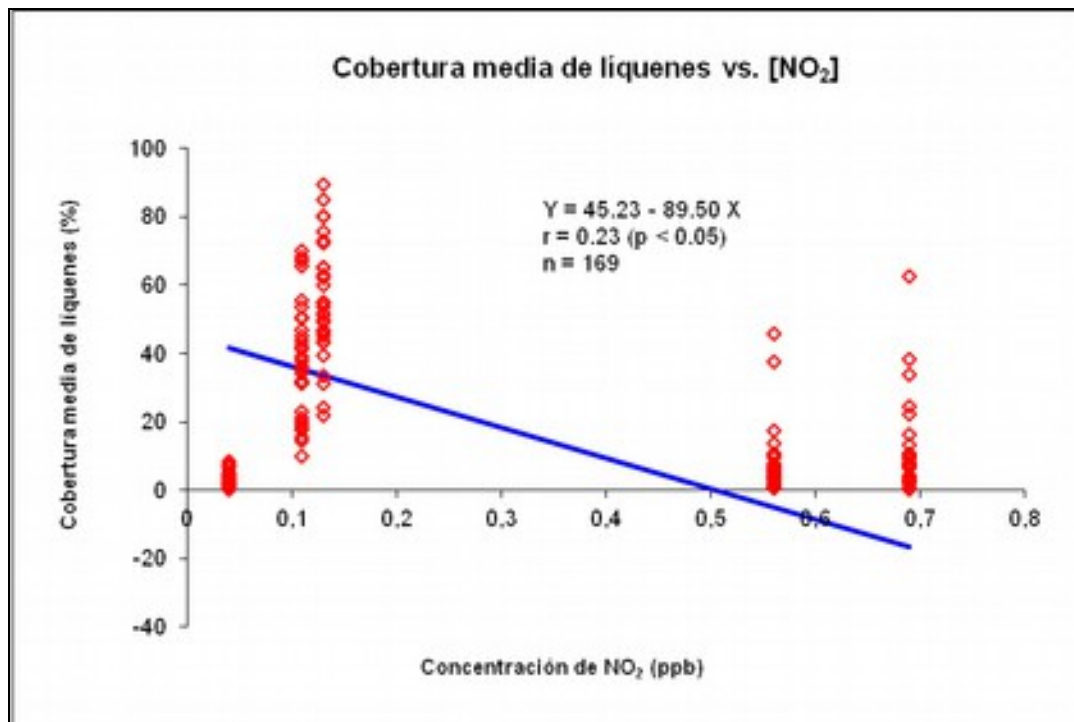


Figura 20. Análisis de regresión entre cobertura media de líquenes y concentración de NO₂. En el gráfico se muestran los valores del tamaño muestral (n) y del coeficiente de correlación lineal de Pearson (r).

Estudios realizados en la ciudad de Córdoba muestran que el pH de la corteza del arbolado urbano varía entre 6 y 7, lo que descartaría ese factor como variable (Estrabou, com. pers.). En cuanto a la rugosidad de la corteza, todos los forófitos muestreados presentan a simple vista características similares. Teniendo en cuenta que se tiene como objetivo desarrollar un método que pueda ser utilizado en áreas urbanas donde muy probablemente sea difícil encontrar un sustrato homogéneo, lo que podría entenderse como una debilidad de la metodología es, en realidad, un aspecto positivo. Los efectos de las diferentes especies de forófitos en la variabilidad de los datos no parecen ser relevantes si se observan los gráficos de regresión donde sitios con varias especies de árboles (Haedo y Polvorines sitio 1) no tienen variabilidades comparables. Se deduce que hay otras fuentes de variabilidad más importantes. De todas maneras, el método de ANOVA en sí mismo considera este problema ya que, en el caso de existir variabilidad producida por los diferentes sustratos, esto se arrastraría a la varianza residual y bajaría los niveles de significación resultantes. En síntesis, el consejo metodológico sería tomar las muestras sobre las mismas especies de árboles si fuera posible, pero si no lo fuera, estaríamos seguros de no obtener diferencias significativas espúreas (errores tipo I); por

otra parte, los modelos de regresión no serían severamente afectados por esa fuente de error.

Teniendo en cuenta esto, también podría recomendarse el uso de la aproximación lineal en todos los casos de regresión analizados ya que las diferencias de calidad entre los modelos son pequeñas (según el AIC) y la falta de linealidad podría atribuirse en parte al “efecto sustrato”.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los ajustes razonables encontrados entre las métricas biológicas y la concentración de NO_2 indica que es posible utilizar el análisis de fotografías digitales de líquenes sobre cortezas de árboles para estimar la contaminación atmosférica por dióxido de nitrógeno. La diversidad de pigmentos no presentó una respuesta tan interesante ya que, si bien el ajuste de la regresión es bueno, la dispersión de los puntos aumenta hacia la zona con mayor concentración del contaminante y la pendiente es muy baja. Además, no se hallaron diferencias significativas entre localidades al comparar esta variable.

La diversidad de colores de la foto completa separa razonablemente bien en el análisis de varianza al sitio con mayor tránsito y concentración de NO_2 del resto (permitiría detectar los sitios más poluídos por este compuesto), mientras que el mismo análisis utilizando secciones de las fotos sin corteza separa al sitio de menor contaminación del resto, por lo cual sería un método más “sensible” para una primera alarma. En ambos casos, el modelo estadístico de regresión es de similar calidad.

A fin de mejorar los métodos de monitoreo aquí presentados y lograr una herramienta más fina, sería necesario analizar más puntos de muestreo. Para ello se podrían utilizar las ecuaciones de regresión como modelos predictivos y validarlos con nuevos datos de campo.

También sería recomendable utilizar más variedad de forófitos para poder estimar la variabilidad introducida en el método por los colores y la rugosidad de las cortezas.

No se recomienda usar el método en otras regiones donde se encuentren especies de líquenes y forófitos marcadamente diferentes a las de Buenos Aires sin realizar pruebas previas.

Asimismo, con respecto a la metodología utilizada para la toma de fotografías se sugiere estandarizar aspectos como la iluminación (hora del día, incidencia del sol), la distancia de la cámara al objetivo, el uso de trípodes y la calidad de la imagen para poder obtener resultados más comparables.

También se recomienda tomar las fotografías en época de lluvias, ya que la hidratación de los tejidos confiere a los líquenes colores más brillantes y aumenta su contraste con las cortezas que se oscurecen con el agua.

En caso de ser probado como eficaz, el método fotográfico podría automatizarse y transferirse con un protocolo sencillo que permitiría su uso en municipios y otros niveles de gobierno sin la necesidad de intervención de personal entrenado en taxonomía o en complejas metodologías químicas.

AGRADECIMIENTOS

Al mágico Momo por aceptarme para realizar esta tesina bajo su dirección.

A mi familia por inculcarme la perseverancia y el placer por el aprendizaje.

A mis amigos y gente querida que compartió mis logros y alegrías pero también me aguantó en los momentos de tensión.

A los compañeros con los que compartí distintos momentos de la carrera, de quienes también aprendí mucho.

A los docentes que participaron no sólo en mi formación académica sino también ética.

A los Dres. Cecilia Estrabou, Juan Manuel Rodríguez, Martha Cañas y Lidia Ferraro por su imprescindible aporte para la identificación de las especies de líquenes y su buena predisposición a responder mis consultas.

Al equipo de investigadores docentes y becarios del área de química de la Universidad Nacional de General Sarmiento, especialmente a Anita Zalts, por facilitarme el laboratorio y por la ayuda brindada con la metodología de medición de NOx. También a Claudio Alfonso y a Andrea Lara por su asistencia en el laboratorio.

A mis amigas Karina, Mónica, Pamela, Laura, Luciana y Ana que hicieron más amenas las horas de laboratorio.

A las personas que aportaron de diferentes maneras a la realización de este trabajo: Mariela Miño, Francisco Suarez, Rubén Lombardo, Mariano Di Rienzo, Luis Delvenne.

A Ana C. Herrero, Rubén Lombardo y Gabriel Zunino por las valiosas apreciaciones y sugerencias que permitieron mejorar el manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aminot, A. 1983. Dosage de la chlorophylle et des phéopigments par spectrophotométrie. In: Aminot A and Chausspiéd N (eds), *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*. (pp. 177–189). Centre National pour l'exploitation des Océans, Québec.
- Bates, J.W., Mcnee, P.J., Mcleod, A.R. 1996. Effects of sulphur dioxide and ozone on lichen colonization of conifers in the Liphook forest fumigation project. *New Phytologist*, 132, 653-660.
- Bates, J.W., Bell, J.N.B., Massara, A.C. 2001. Loss of *Lecanora conizaeoides* and other fluctuations of epiphytes on oak in S.E. England over 21 years with declining SO₂ concentrations. *Atmospheric Environment* 35, 2557-2568.
- Bechtel, R., Rivard, B., Sánchez-Azofeifa, A. 2002. Spectral properties of foliose and crustose lichens based on laboratory experiments. *Remote Sensing of Environment* 82: 389–396.
- Boffi Lissin, L., Zellner, M., Theinhardt, N. 2003. Análisis de índices de contaminación del aire en la Ciudad de Buenos Aires. Documento de Trabajo N° 104, Universidad de Belgrano. Disponible en:
http://www.ub.edu.ar/investigaciones/dt_nuevos/104_boffi.pdf.
- Bowker, M.A., Johnson, N.C., Belnap, J., Koch, G.W. 2008. Short-term monitoring of aridland lichen cover and biomass using photography and fatty acids. *Journal of Arid Environments*, 72, 869–878.
- Bozdogan, H. 2000. Akaike's information criterion and recent developments in information complexity. *Journal of Mathematical Psychology*, 44, 62-91.
- Carreras, H.A., Pignata, M.L., 2002. Biomonitoring of heavy metals and air quality in Cordoba City, Argentina, using transplanted lichens. *Environmental Pollution*, 117, 77–87.

- Castillo Morales, G. (ed.), 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IMTA, México, 189 pp.
- Cedano Maldonado, M. y Villaseñor Ibarra, L. (2006). Colorantes orgánicos de hongos y líquenes. *Scientia-CUCBA* 8(2):141—161. (El artículo corresponde a la traducción del capítulo: Cedano Maldonado, M. and L. Villaseñor Ibarra, 2005. Organic Dyes from Fungi and Lichens. Chapter 16. pp 375–406. In: Deshmukh, S.K and M. K. Rai (Editors). *Biodiversity of Fungi: Their Role in Human Life*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi)
- Cepeda Fuentes, J.M., García Rowe, J. The effect of air pollution from nitrogen dioxide (NO₂) on epiphytic lichens in Seville, Spain (Conference Paper).
- Cislighi and Nimis. 1997. Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature*, 387, 463-464.
- Conti, M.E., Cecchetti, G., 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment—a review. *Environmental Pollution*, 114, 471–492.
- Chaparro de Valencia, M y Aguirre Ceballos, J. 2002. *Hongos Liquenizados*. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. 220 pp.
- Chen, J., Yuan Zhang, M., Wang, L., Shimazaki, H., Tamura, M. 2005. A new index for mapping lichen-dominated biological soil crusts in desert areas. *Remote Sensing of Environment*, 96: 165 – 175.
- Dahlman, L., Persson, J., Näsholm, T., Palmqvist, K. 2004. Carbon and nitrogen distribution in the green algal lichens *Hypogymnia physodes* and *Platismatia glauca* in relation to nutrient supply. *Planta*, 219: 459–467.
- Decreto N° 3395/96. Boletín Oficial del 27 de Septiembre de 1996. La Plata, 6 de Septiembre de 1996.
- DEFRA 2002. Effects of NO_x and NH₃ on lichen communities and urban ecosystem. A Pilot Study. In: *Air pollution research in London (A.P.R.I.L.) Network*. Imperial College London & The Natural History Museum, London.
- EIA CEAMSE Norte III. 2005. Universidad Nacional de General Sarmiento.

- Estrabou, C., Stiefkens, L., Hadid, M. et al. 2004. Efectos de contaminación del aire sobre la morfología y reproducción en cuatro especies de líquenes. *Ecología en Bolivia*, vol.39, no.2, p.33-45. ISSN 1605-2528.
- Fagundez, L.A., Fernández, V.L., Marino, T.H., Martín, I., Persano, D.A., Rivarola y Benítez, M., Sadañowski, I.V., Codnia, J. and Zalts, A. 2001. Preliminary air pollution monitoring in San Miguel, Buenos Aires, *Environmental Monitoring and Assessment*, 71, pp. 61–70.
- Fernández-Salegui, A.B., Terrón Alfonso, A., Barreno, E. 2006. Bioindicadores de la calidad del aire en La Robla (León, noroeste de España) diez años después. *Lazaroa* 27, 29-41.
- Fields, R.D., St. Clair L.L. 1984. The effects of SO₂ on photosynthesis and carbohydrate transfer in the two lichens: *Collema polycarpon* and *Parmelia chlorochroa*. *American Journal of Botany*, 71 (7), 986-998.
- Gaio-Oliveira, G., Dahlman, L., Palmqvist, K., Martins-Louc, M.A., Máguas, C. 2005. Nitrogen uptake in relation to excess supply and its effects on the lichens *Evernia prunastri* (L.) Ach and *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. *Planta*, 220: 794–803.
- Gauslaa, Y., McEvoy, M. 2005. Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen *Xanthoria parietina*. *Basic and Applied Ecology*, 6, 75—82.
- Giordani, P., Brunialti, G., Alleteo, D. 2002. Effects of atmospheric pollution on lichen biodiversity (LB) in a Mediterranean region (Liguria, northwest Italy). *Environmental Pollution*, 118, 53–64.
- Gombert, S; Asta J.; Seaward, M.R.D. 2003. Correlation between the nitrogen concentration of two epiphytic lichens and the traffic density in an urban area. *Environmental Pollution*, 123, 281–290.
- Hart, R., Webb, P.G, Hilton Biggs, R., Portier, K.M. 1988. The use of lichen fumigation studies to evaluate the effects of new emission sources on class I areas, *JAPCA*, 38:2, 144-147.

- Hauck, M. y Wirth, V. 2010. Preference of lichens for shady habitats is correlated with intolerance to high nitrogen levels. *The Lichenologist*, 42(4): 475–484.
- Jeran, Z., Jaćimović, R., Batič, F., Mavsar, R., 2002. Lichens as integrating air pollution monitors. *Environmental Pollution*, 120, 107-113.
- Jeran, Z., Mrak, T., Jaćimović, R., Batič, F., Kastelec, D., Mavsar, R., Simončič, P., 2007. Epiphytic lichens as biomonitors of atmospheric pollution in Slovenian forests. *Environmental Pollution*, 146 (2), 324-331.
- Karunaratne V., Bombuwela, K., Kathirgamanathar, S., Thadhani, V.M. 2005. Review Lichens, a chemically important biota. *J. National Science Foundation Sri Lanka*, 33(3): 169-186.
- Larsen, R.S., Bell, J.N.B, James, P.W., Chimonides, P.J., Rumsey, F., Tremper, A, Purvis, O.W., 2007. Lichen and bryophyte distribution on oak in London in relation to air pollution and bark acidity. *Environmental Pollution*, 146 (2), 332-340.
- LeBlanc, F., Rao, D.N. 1973. Effects of sulphur dioxide on lichen and moss transplants. *Ecology*, 54 (3), 612-617.
- Ley N° 20.284. Plan de prevención de situaciones críticas de contaminación atmosféricas. Boletín Oficial del 3 de Mayo de 1973. Buenos Aires, 16 de abril de 1973.
- Loppi, S., Ivanov, D., Boccardi, R., 2002. Biodiversity of epiphytic lichens and air pollution in the town of Siena (Central Italy). *Environmental Pollution*, 116, 123–128.
- Margalef, R. 1981. Ecología. Barcelona: Omega. 951 pp.
- Margalef, R. 1991. Teoría de los sistemas ecológicos. Barcelona: Omega. 290 pp.
- Nash T.H. 2008. Lichen Biology. Cambridge University Press. 496 pp.
- Organización Mundial de la Salud. Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. Actualización mundial 2005. <http://www.who.int> (consultada el 20 de julio de 2012)

- Orozco Barrenetxea C., Pérez Serrano, A., González Delgado, M.N., Rodríguez Vidal, F. y Alfayate Blanco, J. M. 2003. Contaminación ambiental. Una visión desde la química. Madrid: Paraninfo. 682 pp.
- Palmieri, F., Neri, R., Benco, C., Serracca, L. 1997. Lichens and moss as bioindicators and bioaccumulators in air pollution monitoring. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 16(2-3), 175-90.
- Pan, W. 2001. Akaike's information criterion in generalized estimating equations. *Biometrics*, 57, 120-125.
- Plan de Ordenamiento y Desarrollo Urbano del Municipio de Malvinas Argentinas (PODUMA). <http://www.malvinasargentinas.gov.ar> (consultada el 20 de julio de 2012)
- Purvis, O.W., Erotokitou, L., Wolseley, P.A., Williamson, B., Read, H. 2002. A photographic quadrat recording method employing image analysis of lichens as an indicator of environmental change. In: Nimis, P.L., Scheidegger, C., Wolseley, P.A. (Eds.), *Monitoring with Lichens—Monitoring Lichens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 337–342.
- Purvis, O.W., Chimonides, J., Din, V., Erotokitou, L., Jeffries, T., Jones, G.C., Louwhoff, S., Read, H., Spir, B. 2003. Which factors are responsible for the changing lichen floras of London? *The Science of the Total Environment*, 310, 179–189.
- Rasband, W.S. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/, 1997—2012.
Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. and Ram, S.J. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7): 36—42.
Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W. “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”. *Nature Methods*, pp. 671, 2012. doi: [doi:10.1038/nmeth.2089](https://doi.org/10.1038/nmeth.2089).
- Resolución N° 638/2001 del Ministerio de Salud. Programa de calidad de aire y salud. Prevención de riesgos por exposición a contaminación atmosférica. Boletín Oficial del 7 de Junio de 2001. Buenos Aires, 4 de Junio de 2001.

- Sáenz, A.E., Flores, F., Madrigal, L., & Di Stefano, J.F. 2007. Estimación del grado de contaminación del aire por medio de la cobertura de líquenes sobre troncos de árboles en la ciudad de San José, Costa Rica. *Brenesia*, 68, 29–35.
- Secretaría de ambiente y Desarrollo Sustentable. www.medioambiente.gov.ar (consultada el 20 de julio de 2012)
- Silberstein, L., Siegel, B.Z., Siegel, S.M., Mukhtar, A., Galun, M. 1996. Comparative studies on *Xanthoria parietina*, a pollution-resistant lichen, and *Ramalina duriaei*, a sensitive species. II. Evaluation of possible air pollution-protection mechanisms. *Lichenologist* 28(4): 367–383.
- Shooter, D. 1993. Nitrogen dioxide and its determination in the atmosphere: A simple method for surveying ambient pollution concentrations. *Journal of Chemical Education*, 70 (5), p A133.
- van Dobben, H.F., Wolterbeek, H.Th., Wamelink, G.W.W., Ter Braak, C.J.F. 2001. Relationship between epiphytic lichens, trace elements and gaseous atmospheric pollutants. *Environmental Pollution*, 112, 163-169.
- Virtanen, T., Mikkola, K., Patova, E., Nikula, A. 2002. Satellite image analysis of human caused changes in the tundra vegetation around the city of Vorkuta, north-European Russia. *Environmental Pollution*, 120, 647–658.
- Von Arb, C., Mueller, C., Amman, K., Brunold, C., 1990. Lichen physiology and air pollution II. Statistical analysis of the correlation between SO₂, NO₂, NO and O₃ and chlorophyll content, net photosynthesis, sulphate uptake and protein synthesis of *Parmelia sulcata* Taylor. *New Phytologist*, 115, 431-437.
- Wirth, V., 1993. Trendwende bei der Ausbreitung der anthropogen geförterten Flechte *Lecanora conizaeoides*. *Phytocoenologia*, 23, 625-636.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3^{trh} ed. Prentice Hall. 662 pp.