

Cuantificación de proteínas y clorofila como indicadores de polución en *Rhizophora harrisonii* en el Puerto de Guayaquil

Quantification of proteins and chlorophyll as indicators of pollution in *Rhizophora harrisonii* in the port of Guayaquil

Quevedo O.

Universidad de Guayaquil (Ecuador)
Doctorando de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Perú)
olga.quevedop@ug.edu.ec

Sierra W.

Universidad de Guayaquil
Egresado de Ingeniería Química
(Ecuador)

Manzano P.

Escuela Superior Politécnica del Litoral
Jefa del Dpto. de laboratorio de bioproductos CIBE
(Ecuador)

Barragán A.

Universidad Técnica de Machala, Machala
(Ecuador)

Revista Cumbres Vol.4 N°2

Versión impresa ISSN 1390-9541

Versión electrónica ISSN 1390-3365

<http://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/Cumbres>

RESUMEN

La polución atmosférica generada por la actividad industrial naviera, termoelectricas, cementeras y producción de acero, son elementos que no se han analizado respecto a cómo inciden en la calidad de vida de los manglares en la principal zona naviera del Puerto de Guayaquil, por lo que se referencian por primera vez las concentraciones de proteínas solubles y clorofilas para *Rhizophora harrisonii* en un área poluida vs. un área conservada. Se colectaron 180 hojas “de sol” durante la marea alta, en cuatro transectos durante agosto de 2016 (época seca). Las muestras colectadas se analizaron con métodos químicos como el de Bradford para determinar proteínas solubles y la extracción de pigmentos fotosintéticos con acetona al 80%. Los resultados obtenidos fueron procesados estadísticamente con ANOVA simple de una vía, con el programa Statgraphic 5.1 portable, se encontró que las medias de las concentraciones de clorofila “a” (3,47 ug/ml) y “b” (3,30 ug/ml), al igual que las proteínas son significativamente altas con un valor medio de 9.85 ug/ml, que las encontradas en los transectos 1, 2 y 3, lo que permite deducir que *Rhizophora harrisonii* es resiliente frente a las condiciones de polución en la zona de estudio del Puerto de Guayaquil.

Palabras clave: proteínas solubles, *Rhizophora harrisonii*, clorofila, estuarios.

ABSTRACT

The atmospheric pollution to proceed by ship activities in port of Guayaquil, in addition to thermal power, industry cement and steel production, they have not been analyzed, like around over mangroves health life, this study, at the main shipping area of the Port of Guayaquil, it is referenced for first time the proteins and pigment photosynthetic from *Rhizophora harrisonii*, from two sites, one contaminated and other preserved, this latter denomination for the study “control”. In total they were collected 180 samples, from leaves “sun”, during the high tide, into four transects, in august (dry season). The sampling collected it was analyzing from chemical methods like Bradfor, for determination the protein and chlorophyll with 80% acetone. It was used the statistic program STATGRAPHIC 5.1 portable, for obtain results with ANOVA simple one way. It was found that average from protein and Chlorophil (3.47 ug/ml) y b y (3.30 ug/ml). The proteins are significantly high with a value average of 9.85 ug / ml than those found in transects 1, 2 and 3, which makes it possible to deduce that *Rhizophora harrisonii* is resilient against the pollution conditions in the study area; The low values presented in the control zone can be used as benchmarks for future studies. It is recommended that research with other variables such as soil, pH, leaf minerals, be correlated to confirm that the highest values recorded in the polluted zones are a response to *Rhizophora harrisonii* adaptation or resilience at Guayaquil Sail Port.

Keywords: proteins, *Rhizophora harrisonii*, chlorophyll, estuary.

INTRODUCCIÓN

La reserva de producción faunística El Salado, conserva una superficie aproximada de 9748 ha compuestas por manglar, salitrales, y esteros (Acuerdo Ministerial No. 158, 2010). Es parte del estuario interior del Golfo de Guayaquil, donde la marea incide hasta 230 km hacia la zona continental, por lo que es considerada una de las entradas más sobresalientes del Pacífico Sur, accidente geográfico que influye en la costa central del Ecuador.

La distribución ecológica de los manglares en la reserva de producción faunística manglares El Salado, fue caracterizada por el Ministerio del Ambiente (MAE, 2012) como: *Avicennia germinans* (mangle negro), *Conocarpus erectus* (mangle botón), *Laguncularia racemosa* (mangle blanco), *Rhizophora harrisonii* (mangle rojo), *Rhizophora mangle* (mangle rojo) y *Rhizophora racemosa* (mangle rojo). Esta distribución de las especies también está vinculada con el tipo de sedimentación y las concentraciones de sal (Schaeffer-Novelli & et.al; 1990). Las mareas del golfo presentan dos pleamares y dos bajamares en un tiempo de 24,8 h.

El rango de la marea cambia entre 1,5 m de cuadratura a 2,3 m en sicigia y en el estuario interior, cerca de la ciudad de Guayaquil, el rango está entre 2,9 m en cuadratura y 4,0 m en sicigia. La onda de marea recorre aproximadamente entre 130 y 70 km a lo largo del río Guayas y el Estero Salado, los rangos de salinidad en la época lluviosa están entre 0,0 y 10,0 ppt en el reflujó, y en época seca en el flujo varía entre 10 ppt y 33,0 ppt (Proyecto VUB, INOCAR & ESPOL, 1997).

Los manglares del Puerto de Guayaquil soportan un tránsito naviero semanal de 10 a 12 barcos (DRI - CEPAL - ONU, 2011) y representan al 34% de los 4801 barcos que entraron y salieron en el 2013 de los puertos del país. Se registraron 802 naves que ingresaron y cerca de 754 salieron con cargas de 300 a 700 contenedores (de 20 a 40 pies) del Puerto de Guayaquil (INEC, 2013).

La actividad naviera del Puerto de Guayaquil influye en la calidad de los manglares, afectando las hojas con el cubrimiento de hollín que se adhiere a las mismas producto de la combustión de combustibles fósiles, situación que afecta a los manglares, como por ejemplo a lo largo de los parques lineales del estero salado que soportan tráfico vehicular a diario.

De acuerdo a lo identificado por el Ministerio del Ambiente (2012), los manglares del Golfo de Guayaquil están en franco proceso de deterioro, por las actividades antrópicas como el desfogue de aguas servidas, el cierre de esteros, los rellenos, infraestructuras navieras, industriales, entre otros.

La afectación por el tránsito naviero, sus efluentes líquidos y gaseosos, generados por el manejo de las actividades de embarque y desembarque y de los productos que se receiptan, no han sido reportados ni relacionados como grados de afectación a la salud de los manglares.

Las concentraciones de SO₂ provocan afectaciones a la vegetación, lo cual está relacionado con la diversidad de climas que existen a nivel mun-

dial, lo que disminuye la probabilidad de las predicciones (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2010), y debe ser considerado en la implementación de políticas nacionales de la estrategia nacional de conservación de áreas naturales (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2007), así como las políticas internacionales de la Organización Marítima Internacional (OMI), y las Políticas del Mar (MARPOL) de las cuales el Ecuador es signatario (Wilson, 1995).

De acuerdo a Cerón et.al. (2009, 2010) las plantas tienen capacidad de metabolizar este compuesto. Las hojas de manglar que fueron expuestas a pH más bajos de lluvia ácida reflejaron daños visibles severos en forma de clorosis y necrosis, incluso los valores de nutrientes demostraron cambios después de las exposiciones experimentales de SO₂ atomizado, a las que fueron sometidas las especies de mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), mangle rojo (*Rhizophora harrisonii*), y mangle botoncillo (*Conocarpus erectus*). De esta exposición resultó que a mayor concentración de SO₂ mayor pérdida de clorofila, junto al incremento de los niveles de proteínas solubles, explican que las plantas tienen capacidad de metabolizar este compuesto.

El presente estudio determinó la concentración de proteínas solubles y clorofila en *Rhizophora harrisonii*, mediante espectrofotometría UV-Vis como indicadores de la polución atmosférica en manglares de la especie *Rhizophora harrisonii* en las inmediaciones del Puerto de Guayaquil.

La cuantificación de proteínas solubles se realizó mediante la metodología de Bradford (1976) utilizando suero bovino como estándar. Los pigmentos fotosintéticos como clorofila "a", "b" y carotenoides se extrajeron a través del método de la acetona al 80% y sus concentraciones se determinaron a través de la ecuación de Lichtenthaler, (1987).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio.

El Puerto de Guayaquil se encuentra dentro del Golfo del mismo nombre, en la provincia del Guayas, representa al 34% de todos los puertos concesionados a nivel nacional (INEC, 2013), está rodeado de manglar por el oeste y por el sur-este de la ciudad de Guayaquil, con una superficie de 11223,33 ha de manglar sólo para el Puerto de Guayaquil (MAE, 2012). Además, está rodeado de las industrias del acero, las termoeléctricas, y la cementera (Figura 1). Se escogió como control o blanco (transecto 4) a la Isla Chupador Chico en la comunidad Cerrito de Los Morreños, del humedal estuario interior del Golfo de Guayaquil "Don Goyo", para referenciar por primera vez los valores de proteínas y clorofilas en el manglar de la provincia del Guayas, ya que se considera que es uno de los sitios mejor conservados y aislados de focos de contaminación.

Un total de 180 muestras compuestas por hojas de *Rhizophora harrisonii* se colectaron desde la Isla Trinitaria y Chupador chico, colectadas de manera aleatoria (Tabla 1). Los transectos se definieron por su proximidad con los puertos navieros, la termoeléctrica y la base naval. El transecto (1) se



Figura 1. Sitios de muestreo en el Puerto de Guayaquil

encuentra hacia el interior de la isla entrando por el estero la Capitanía, el transecto (2) está frente al Puerto de CONTECON y el transecto (3) está al interior de la isla ingresando por un estero sin nombre, en su afluente principal transitan los barcos que se dirigen al Trini-Puerto. El transecto (4) en la Isla Chupador Chico (control o blanco) se encuentra aproximadamente a 23 km de la zona de estudio.

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los sitios muestreados durante la época seca

TRANSECTOS	COORDENADAS (Y)	COORDENADAS (X)
I	620420	9749793
II	620676	9750213
III	619754	9748910
IV	620802	9724302

Los tres transectos están ubicados en la zona de actividad naviera (Fig.1) y el control o blanco en la isla Chupador Chico en el Humedal “Estuario interior del Golfo de Guayaquil - Don Goyo”, (Carvajal et.al., 2012). Los transectos miden 100 x 0,50 m de superficie y la colecta de las hojas se realizó en marea alta y en el mes de agosto, durante la época seca. Se usó una embarcación de madera “canao” desde la cual se recogieron las hojas del dosel o de techo expuestas directamente al sol.

Las muestras tomadas en cada uno de los transectos fueron etiquetadas y guardadas en fundas ziploc e inmediatamente conservadas en un termo con refrigerante a 18 °C. En el laboratorio cada una de las hojas fueron divididas en dos partes simétricas (A y B, figura 2) para la determinación

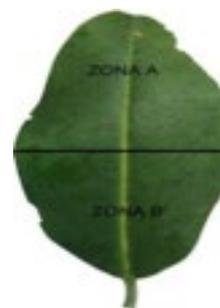


Figura 2. Segmentación en A y B de la hoja de *Rhizophora harrisonii* para el análisis.

de clorofila y proteínas solubles respectivamente, se extrajó 100 mg de cada una. Para la obtención de los datos de pigmentos fotosintéticos y de proteínas solubles, se utilizó el peso fresco de ambas partes.

Determinación de proteínas solubles

Preparación del estándar. La preparación del estándar se realizó mediante el patrón de suero bovino, se trabajó desde una solución madre de 1 mg / ml. Los estándares para la curva de calibración en el espectrofotómetro fueron 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µl/ml, 80 µg/ml y 100 µg/ml.

En el análisis de las proteínas solubles se usaron muestras de la parte "B" de la hoja, utilizando el método de Bradford (Kruger, 2002). Para la extracción de las proteínas se procedió a mezclar 100 mg de las muestras en fresco con 3 ml de la solución Buffer fosfato de potasio, en mortero con volumen de 100 ml. En un tubo micro-centrífuga eppendorf, se agregó 1 ml de la muestra ya mezclada con el Buffer y se le añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 10 %, dejando reposar toda la noche en refrigeración a 18 °C. Al siguiente día, las muestras fueron centrifugadas (Jouan SA A-12) durante 10 min a 10000 rpm, desechando el sobrenadante y dejando el sedimento con 1 ml de Na OH 1 N durante dos horas (Cerna et.al., 2010 y Mas, 2014). En una placa de 96 pocillos se agregaron 200 µl de reactivo de Bradford-agua destilada (1:5 v/v) con 10 µl de la muestra para su lectura en el espectrofotómetro BIO TEK SYNERGY HT a 595 nm.

Determinación de Clorofila a, b y carotenoides

Método de la acetona al 80%. Los 100 mg de muestra fueron pesadas en la Balanza analítica (Mettler Toledo AB204-S) previamente cortadas (parte A), se colocaron en una cápsula de porcelana y se les agrega 1 ml de acetona al 80% para ser maceradas hasta obtener una mezcla uniforme. Posteriormente, se coloca 1 ml de la mezcla en un tubo eppendorf y se centrifugó en una Microcentrífuga (Jouan SA A-12) a 1500 rpm durante 1 min. Finalmente, se toman 200 µl del sobrenadante y se leen en el espectrofotómetro UV-VIS (BioTek Synergy HT) a las siguientes longitudes de onda: 663, 646, 470, 430 y 665 nm. Finalmente, clorofila "a", "b" y carotenoides fueron cuantificadas por unidad de masa usando las ecuaciones de Lichtenthaler (1987).

$$\text{Chl}_a \text{ (} \mu\text{g / ml)} = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{646}$$

$$\text{Chl}_b \text{ (} \mu\text{g / ml)} = 21,50 \times A_{646} - 5,10 \times A_{663}$$

$$\text{Chl}_{a+b} = 7,15 \times A_{663} + 18,71 \times A_{646}$$

$$\text{C}_{x+c} \text{ (Carotenoides) (} \mu\text{g / ml)} = \frac{1000 \times A_{470} - 1,82 \text{ Chl}_a - 85,02 \text{ Chl}_b}{198}$$

$$x + c = \text{xantofilas} + \text{carotenos}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis estadístico: La comparación de las medias fueron calculadas usando Anova simple de una vía con el programa Statgraphics Plus 5.1, para encon-

trar las diferencias significativas entre los transectos y el control. Todas las determinaciones para clorofila “a” y “b” (Figura 3), carotenoides y proteínas (Figura 4) demostraron diferencias significativas en relación al control.

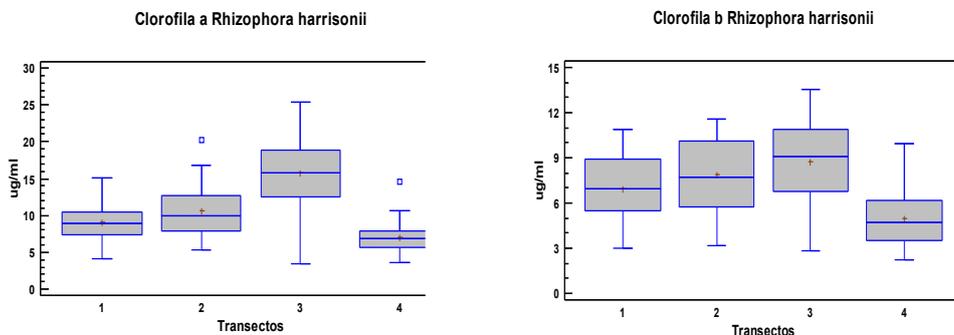


Figura 3. Concentración de Clorofila a y b en *Rhizophora harrisonii* durante la época seca.

Pigmentos fotosintéticos: se concluye que hay diferencias estadísticamente significativas 3,57 ug/ml de clorofila a y b (Tabla 2) entre el control (t4) y el transecto (t3), el control (t4) presenta valores más bajos tanto para clorofila a y b, en comparación al resto, esto es por el estrés al que están sometidos los arboles de *Rhizophora harrisonii* en zonas con procesos de contaminación atmosférica generada por actividades antrópicas, además de la presencia de larvas de la familia *Geometridae* que fueron observadas en campo ramoneando hojas de manglar.

Las concentraciones de clorofila “a” y “b” son proporcionalmente semejantes en los transectos 1 y 2, pero varían significativamente respecto al transecto 3 y los tres transectos varían respecto al transecto 4 que se encuentra en un área natural protegida.

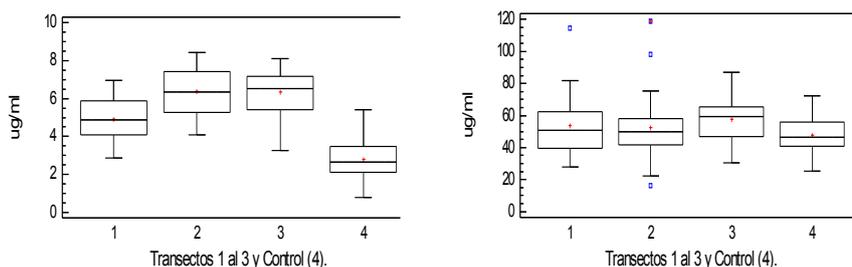


Figura 4. Concentraciones de carotenoides (a) y proteínas (b) durante la época seca en *Rhizophora harrisonii*.

Proteínas: La diferencia significativa de 9,95 ug/ml en el transecto 4, varía respecto a los valores de las proteínas en hojas de *Rhizophora harrisonii* para los tres transectos, las proteínas presentaron valores más bajos en el control que en la zona influenciada por la actividad antrópica (Tabla 2, Figura 4). En la presente investigación se concluye que la especie *Rhizophora harrisonii*

Tabla 2. Medias significativas de Clorofila "a", "b", Carotenoides y Proteínas solubles en hojas de *Rhizophora harrisonii*.

Transectos	Proteínas solubles ug/ml	Clorofila "a" ug/ml	Clorofila "b" ug/ml	Carotenoides ug/ml
1-4	5.71			2.13
2-4	4.61	3.43	2.59	3.57
3-4	9.85	3.47	3.30	3.55

presenta concentraciones de clorofila "a" y "b", que varían significativamente entre ellas, lo cual está relacionado con las proteínas frente a los valores bajos de carotenoides (Tabla 2), de acuerdo a lo expresado por Siefertman (1990) en Cerón et.al. (2010), quién sustentó que la función de protección del complejo proteína pigmento y de los cloroplastos frente a la oxidación es desempeñada ante los carotenoides en general.

La comparación con otros estudios se dificultan en razón de que investigaciones aplicadas sobre concentraciones de clorofila y proteína en *Rhizophora harrisonii* es la primera vez que se realiza para el Ecuador. Además de que el incremento de las proteínas responde a la asimilación del SO₂ por parte de las plantas, el cual es generado por las actividades navieras, termoeléctricas entre otras en las inmediaciones del área de estudio.

Estudios realizados en Campeche - México por Cerón et.al (2010,2016) expusieron en medios controlados a *Rhizophora mangle*, atomizando SO₂ a 50 ppb, 110 ppb y 250 ppb reflejándose daños severos en las plantas donde la presencia de clorofilas antes y después de la atomización varió en rangos máximos y mínimos, los cuales tuvieron respuestas favorables para las plantas, en concentraciones de 50 ppb, momento en el cual las plantas utilizaron el SO₂ en el proceso de asimilación, los valores más altos reflejaron daños severos como clorosis, necrosis y muerte celular.

En la zona de estudio, se presentan factores externos relevantes físicos y biológicos, como la época seca, la dirección del viento sur oeste con velocidades no mayores a 2 m/s, la heliofanía que incide entre las 11h00 hasta 15h00, y las larvas de la familia Geometridae que se alimentan de las hojas del manglar, añadido a esto la polución generada por la actividad naviera, y la industria adyacente; son elementos que afectan la calidad de vida del manglar que se presenta como resiliente.

Estudios posteriores sobre las concentraciones de SO₂ se están preparando para ser relacionadas con las características morfológicas de *Rhizophora harrisonii*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuerdo Ministerial (2010). Límites de la Reserva de Producción faunística manglares del Salado, Quito- Ecuador. No. 158. Bradford (1976) en: Laboratorio de bioquímica I. Practica 6 Cuantificación proteica por el método

- de Bradford. http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/jaislocr/BIOQUIMICA_I/PRACTICA_6.pdf
- Cerón, J., R. Cerón, J. Guerra, J. López y E. Endañu, (2009). Efectos de contaminantes atmosféricos sobre especies de vegetación representativa de la zona costera del Estado de Campeche, Universidad Autónoma del Carmen, México. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, Vol 126, WIT Press [www.Witpress.com](http://www.witpress.com), ISSN 174-3541 (on-line) doi: 10.2495/CP090231.
- Cerón-Bretón, J. G; Cerón- Bretón, R. M; Guerra - Santos, J. J; Córdova - Quiroz, A. V.; Vargas Cáliz, C; Aguilar- Becomo, L. G; Rodríguez - Heredia, K; Bedolla-Zavala, E. y Pérez- Alonso, J., (2010). Efectos de la Simulación de Ozono troposférico en proteínas solubles y niveles de pigmentos fotosintéticos en cuatro especies de maderas Típicas del húmedo trópico mexicano. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Autónoma del Carmen (UNACAR). Campeche - México.
- Cerón J., R. Cerón, C. Aguilar, C. Montalvo, a. García, M. Muriel, E. Ramírez, A. Córdova & C. Carballo, (2016). *Mapping temporal and Spatial and spatial variation of sulfur and nitrogen deposition to a complex ecosystem en Campeche, Mexico. Enviromental Impact III, WIT Transactions on Ecology and The Environment*, Vol. 203, www.witpress.comISSN-1743-3451 (on line) doi 102495/EID160111.
- Cerna, E., Y. Ochoa, R. Mendoza, MH. Badii, G. Gallegos, y J. Landeros. (2010). Evaluación de métodos de cuantificación para su uso potencial en la detección de resistencia a plaguicidas *ϕYTON* ISSN 0031 9457, (2010) 79: 147 -152
- Carvajal, R., J. Salas, G. Zambrano, F. Viteri & C. Bohórquez, (2012). *Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR) - Versión 2009-2012*. Jefatura de Control de Biodiversidad y Áreas Naturales Protegidas; Jefatura de Control de Cuencas Hidrográficas Dirección de Ambiente Gobierno Provincial del Guayas Illingworth 108 y Malecón Simón Bolívar, Guayaquil. Teléfono (593-4) 2511677 Extensión 701, 242, 239.
- DRNI - CEPAL - Naciones Unidas, (2011). Unidad de Servicios de Infraestructura,- *Source: Infrastructure Services Unit - NRID - ECLAC - United Nations*.
- INEC, (2013). *Anuario de Estadísticas de Transporte*. Dirección responsable de lainformación estadística, y contenido: Dirección de Estadísticas Económicas.
- Kruger, J. Nicholas (2002). The Bradford Method for Protein Quantification. Chapter 4, [15-20] *The Protein Protocols Hand Book*, Second Edition, editado por Jhon M. Walker. Humana Press Inc. Tolowa, NJ. ISBN: 978-0-89603-940-7 (Impresión) 978-1-59259-169-5 (en línea).
- Lichtenthaler, HK., (1987). Chlorophyll and carotenoids: Pigments of Photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE), (2012). Caracterización biológica del Estero Salado en ramales con diferentes tipos de desarrollo Urbano CDC-SGMC-GE-004-2012. Preparado por ECOBIOTEC, noviembre de 2012.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE), (2012). *Informe técnico de evalua-*

- ción de las reforestaciones del ecosistema de manglar otorgadas a usuarios ancestrales del Golfo de Guayaquil*. Programa de Manejo de Recursos Costeros. Ministerio del Ambiente (2007). Políticas y Plan Estratégico del Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador 2007 - 2016. Proyecto GEF. Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Quito, Ecuador.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador (2010). Plan Nacional de la Calidad del Aire. Con el auspicio de: Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación COSUDE, Quito - Ecuador.
- Proyecto VUB, INOCAR & ESPOL, (1997). Construction of an interdisciplinary geographic information system (G.I.S.) OF THE Guayaquil area in order to the monitoring and modelling of the Guayas estuary and the Estero Salado. Vrije Universiteit Brussel. Research projects (70 -8 of 7401).
- Schaeffer-Novelli Y.; G. Cintrón-Molero; R. Rothleder Adaime; & T. Camargo, (1990). Variability of Mangrove Ecosystems along the Brazilian Coast *Estuaries*, Vol. 13, No. 2. (Jun., 1990), pp. 204-218. Stable URL.
- Siefermann- Harms, D. (1990). Protective function of the apoprotein of the light- harvesting chlorophyll -a/b- protein complex in pigment photo - oxidation. *J. Photochem. Photobiol B: Biol*, 4, pp. 283-295.
- Wilson, S.A., (1995). Are Mediterranean Plant likely to have a distinctive response to SO₂ pollution? *Revista: Agriculture, Ecosystems and Environment* 55- (1995) 71-93, y Elsevier. Review.