



## MEDICIÓN DE LA ENZIMA LIPASA EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS: DESARROLLO DE UN MÉTODO EN MICROPLACAS

Yobana Raquel Cruz Acosta<sup>1</sup>, Ivett Caraveo Martínez<sup>1</sup>, Alicia Pastrana Pacho<sup>1</sup>, Ildefonso J. Díaz-Ramírez<sup>2</sup>.

Instituto Tecnológico Superior de Centla<sup>1</sup>. Departamento Química y Ambiental  
Calle Ejido s/n. Col. Siglo XXI. Frontera, Centla, Tabasco. C.P. 86751.  
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco<sup>2</sup>. División de Ciencias Biológicas.  
Villahermosa, Tabasco, México C.P. 86039. e\_mail: yobiz\_ra20@hotmail.com

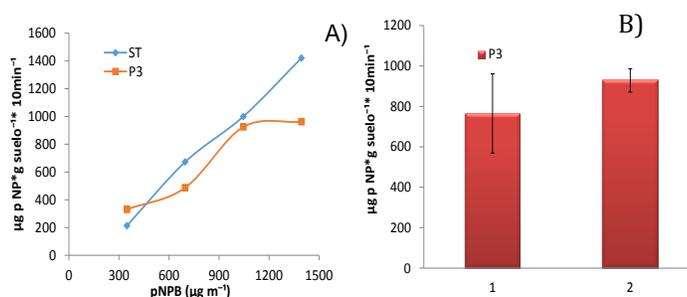
*Palabras clave: contaminación, hidrocarburos, indicadores biológicos.*

**Introducción.** Una de las principales fuentes de la contaminación en los suelos tropicales del sureste de México son los derrames de hidrocarburos del petróleo. La biorremediación ofrece diversas alternativas de tratamiento como es la determinación de la actividad microbiana a través de diversos parámetros: a) actividad respiratoria, b) actividades enzimáticas, c) contenido de biomasa, entre otros (1). Existe escaso desarrollo de métodos a microescala de las actividades enzimáticas como: oxigenasas, lipasas, ureasas. Los métodos convencionales, consumen largos tiempos y gran volumen de material, propiciando múltiples etapas y costos elevados. Los métodos en microplacas en conjunto con técnicas espectrofotométricas, son altamente reproducibles y de rápida lectura (2, 3). En el presente trabajo se desarrolló un método de cuantificación a microescala de la enzima lipasa aplicable a muestras de suelos contaminados con hidrocarburos, permitiendo el análisis de un mayor número de muestras por lote, reducción de costos y tiempo de análisis.

**Metodología.** Se diseñó un experimento con la finalidad de estandarizar: a) la proporción suelo-buffer (0.1g:2.5 ml; fosfatos 100 mM, pH 7.25), b) concentración de sustrato ( $340\text{-}1400\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ), c) tiempo de reacción (10, 15, 20 min). Se determinó la cinética de producción de p-nitro-fenol (pNP) liberado usando un lector de microplacas ( $\lambda=400\text{nm}$ , 1 lectura  $\text{min}^{-1}$ , Multiskan, Thermos Scientific). La concentración de pNP se determinó por el método de curva estándar calculándose la actividad lipasa en el suelo contaminado y no contaminado ( $\sim 11,000\ \text{mg Kg}^{-1}$ ) (4).

**Resultados.** Se registraron niveles de actividad lipasa crecientes en el intervalo de concentraciones del sustrato probado ( $340, 697, 1046, 1400\ \mu\text{g ml}^{-1}$  y de las diferentes alícuotas de la mezcla (suelo:buffer). Esto correspondió a una correlación lineal entre la actividad lipasa y el sustrato para el suelo contaminado y no contaminado, con un coeficiente de correlación de 0.890 y 0.974 respectivamente (Fig. 1A). Se encontró la actividad lipasa máxima alrededor de los  $1046\ \mu\text{g ml}^{-1}$  de pNPB ( $15\ \mu\text{l}$  de sustrato). Se comparó el método convencional con el método adaptado (microplacas) obteniendo resultados

similares para el P3 utilizando un volumen 10 veces menor de sustrato, al método convencional (fig. 1B).



**Fig. 1.** Actividad lipasa en suelo contaminado y no contaminado. A) en presencia de diferentes niveles de sustrato y B) análisis comparativo del método convencional (1) y en microplacas (2). Los resultados corresponden a 10 min de reacción.

**Conclusiones.** La adaptación del método de cuantificación de lipasa en suelo permitió obtener resultados confiables y reproducibles además de ser comparables a los obtenidos con el método convencional. Esto permitió minimizar las cantidades de soluciones y tiempo de trabajo. Este método puede ser aplicable para el monitoreo de actividades biológicas en respuesta a la presencia de hidrocarburos en suelos altamente contaminados.

### Agradecimiento.

Proyecto financiado por CONACYT (Proy. No. 181371).

### Bibliografía.

- (1) Riveroll, L. J. 2014. Actividad microbiana en suelos tropicales con diferente historia de contaminación por hidrocarburos. Villahermosa, Tabasco. Marzo de 2014.
- (2) Margesin R, Feller G., Hammerle M., Stegner U. y Schinner F. (2002). A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. *Biotechnol. Lett.* 24, 27-33.
- (3) Jaeger, K. E. y Reetz, M. T. 1998. Microbial lipase from versatile tools for biotechnology. *TIBTECH*, 16:396-403
- (4) Margesin, R. 2005. Determination of enzyme activities in contaminated soil. En: Margesin, R., Schinner, F. *Manual for soil analysis monitoring and assessing soil bioremediation*. Vol. 5. Springer Publishing Company.