

INTRODUCCIÓN

El aumento continuo en el uso global de agroquímicos, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el Clorpirifos (CP), genera preocupaciones sobre su impacto ambiental y en la salud humana, destacando la necesidad de explorar enfoques innovadores. El género *Phlebia* sp., con enzimas como la lacasa, emergen como posibles agentes para la remediación de contaminantes. Las lacasas (EC 1.10.3.2), catalizan la oxidación con iones de cobre en su sitio activo. Su versatilidad radica en baja especificidad de sustrato, abarcando compuestos ambientalmente importantes como los plaguicidas.

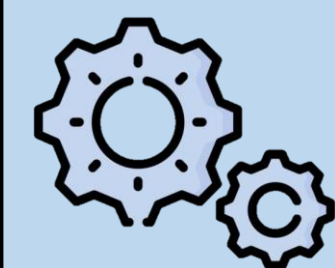
OBJETIVO

El propósito de este estudio es investigar la respuesta de *P. brevispora* BAFC 633 (Pb) y su enzima lacasa frente a 2,4-D y CP, evaluando cambios en la actividad y estabilidad, con el fin de comprender su impacto en la función y comportamiento enzimático.

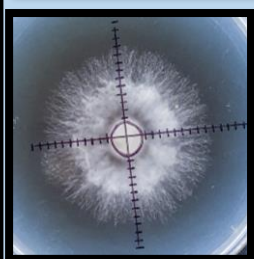
RESULTADOS

El hongo creció en todas las concentraciones de CP, mientras que con 2,4-D el crecimiento se limitó a 100 mgL⁻¹. Detectamos actividad lacasa en medio sólido en todos los ensayos de crecimiento, siendo menos intensa con altas concentraciones de plaguicidas. Se observaron cambios morfológicos macroscópicos, incluyendo un micelio más compacto y menos desarrollo de hifas en presencia de plaguicidas. A nivel ultraestructural, las hifas expuestas a plaguicidas tuvieron diámetros menores y mayor desorganización. También se observaron diferencias respecto al diámetro de las esporas entre el control y el medio con ambos plaguicidas, siendo más evidente en el tratamiento con CP.

METODOLOGÍA



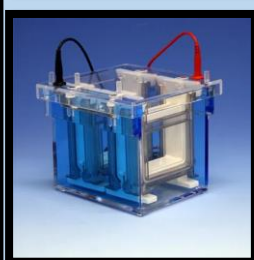
Cajas de Petri con medio MEA suplementado con diferentes concentraciones de Clorpirifos (0,1, 1, 10, 100 mgL⁻¹) y 2,4D (1, 10, 100, 1000 mgL⁻¹).



Se inocularon fragmentos jóvenes de micelio en el centro y se midió diariamente el crecimiento radial. La micología predictiva determinó los grados de tolerancia e inhibición.



Evaluación de cambios morfológicos mediante observación macroscópica y microscopía electrónica de barrido (SEM).



Determinación de actividad lacasa mediante la adición de 5 mmol L⁻¹ de DMP y perfil enzimático analizado mediante SDS-PAGE.



El hongo se cultivó en medio líquido con CuSO₄. Se añadió 10 mgL⁻¹ de plaguicidas a los sobrenadantes. Se analizó su efecto sobre la actividad y estabilidad enzimática, considerando pH y temperatura.



La actividad enzimática se evaluó y cuantificó utilizando DMP como sustrato mediante espectrofotometría a 469 nm.

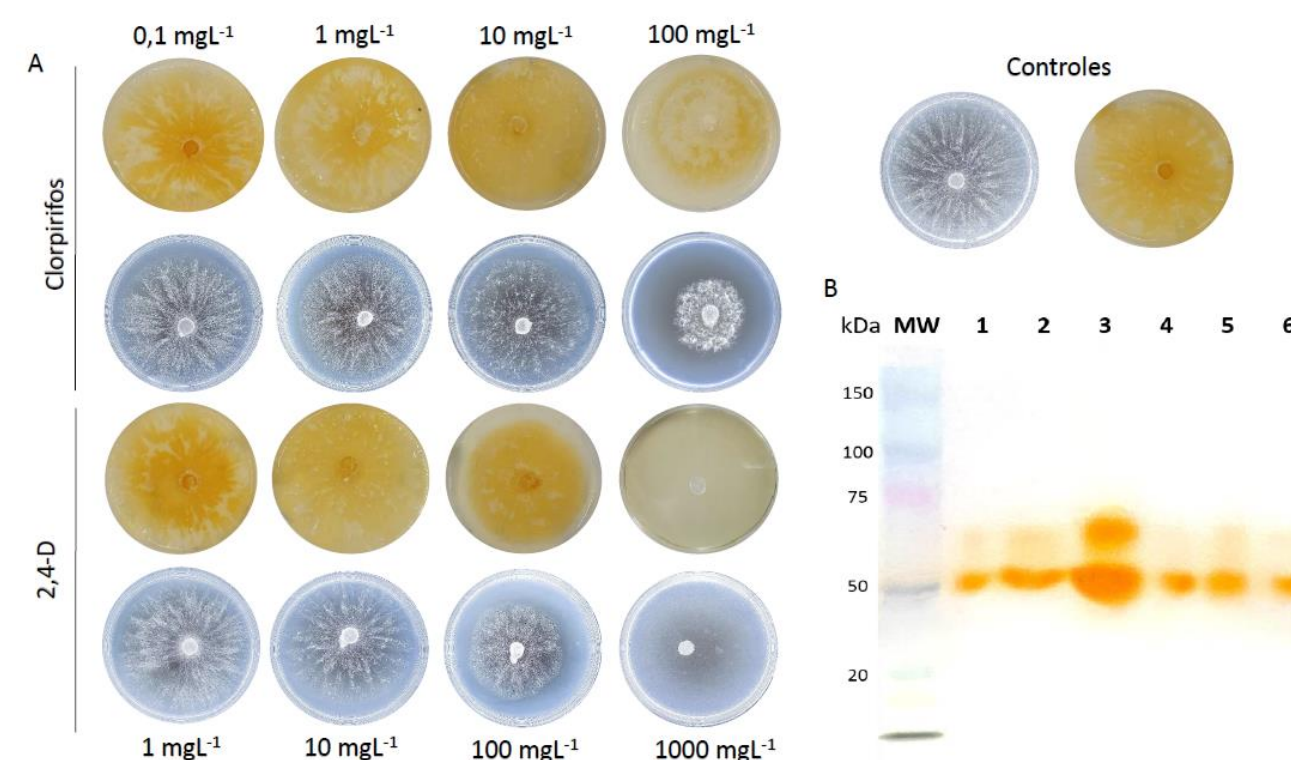


Figura 1. Patrón de crecimiento de *P. brevispora* BAFC 633 (Pb) y detección de actividad lacasa en medios sólidos suplementados con diferentes concentraciones de 2,4-D y Clorpirifos (CP). (A). Vista macroscópica de la apariencia del micelio en medio sólido que contiene 12,7 gL⁻¹ de extracto de malta y 20 gL⁻¹ de agar (MEA) (arriba) y secreción de lacasa en MEA con 2,6-dimetoxifenol (DMP) (abajo), en la ausencia de pesticidas con 2,4D y CP. (B) Perfil enzimático obtenido por SDS-PAGE e incubado con DMP para Pb. (1) 2,4-D [1 mg L⁻¹]. (2) PB [0.1 mg L⁻¹]. (3) Pb sin pesticidas. (4) 2,4-D [1000 mg L⁻¹]. (PM) Peso molecular.

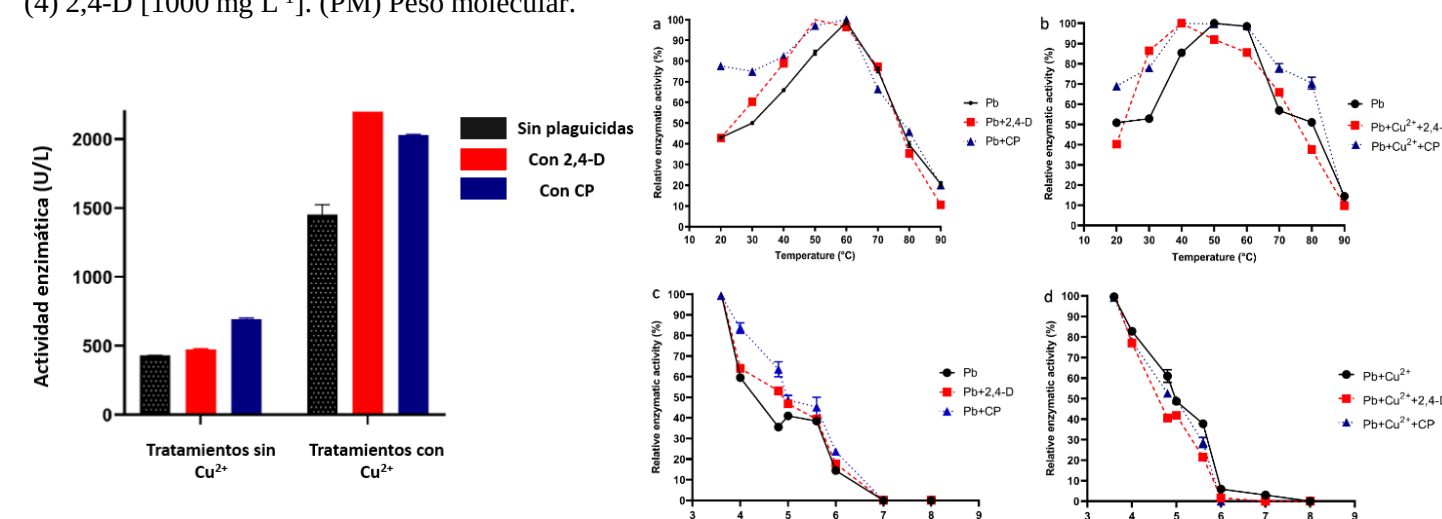


Figura 3. Efecto de los pesticidas sobre la actividad de las lacasas. (a-d) Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad lacasa presente en el sobrenadante de un cultivo de fermentación sumergido de 10 días de *P. brevispora* BAFC 633 (Pb) en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de Cu²⁺ [1 mM] (●), y su efecto en presencia de 2,4-D (■) y Clorpirifos (CP) (▲) (e) Efecto de los pesticidas sobre la actividad lacasa lograda en condiciones óptimas de pH y T°.

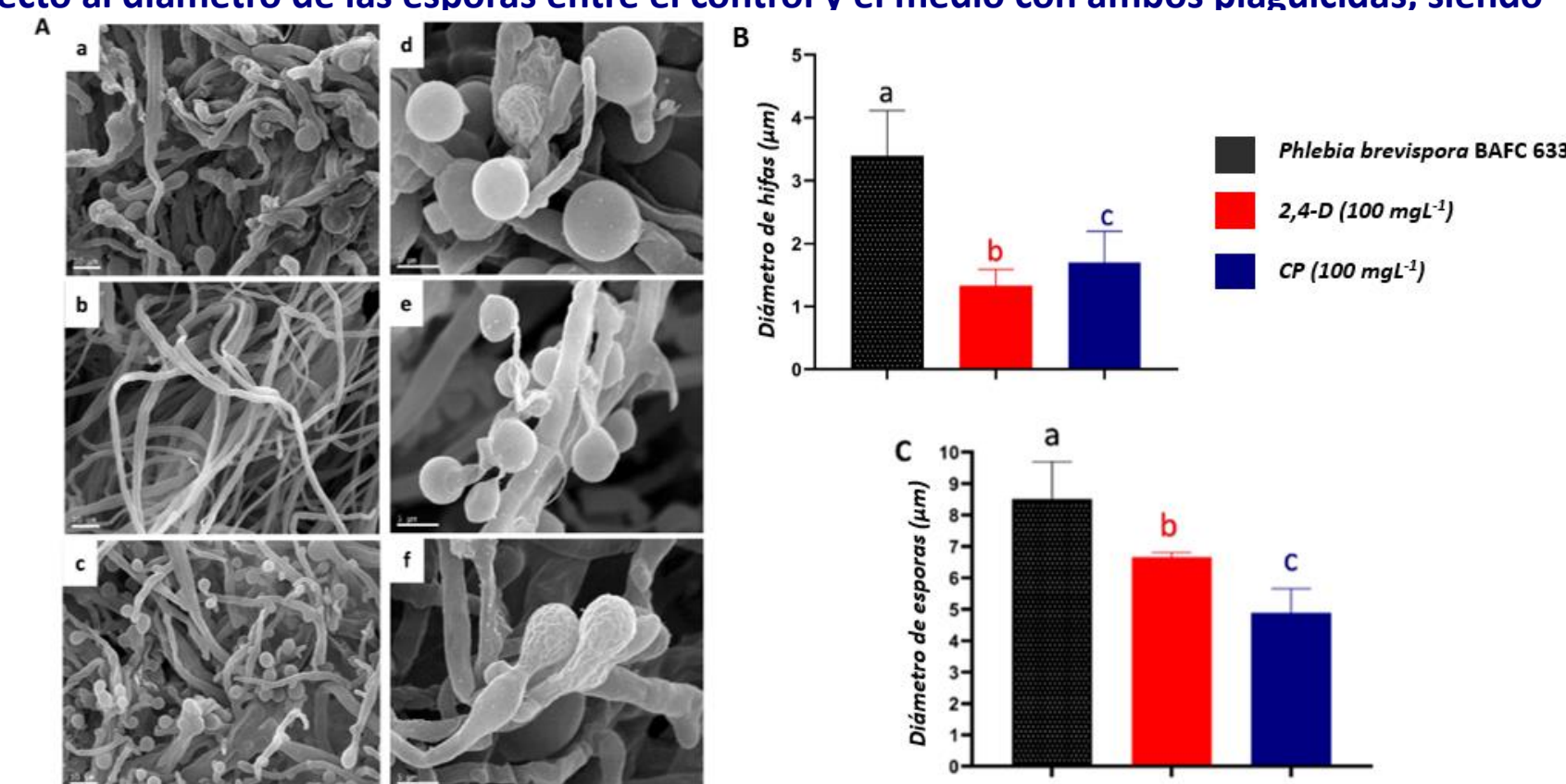


Figura 2. Análisis ultraestructural de *P. brevispora* BAFC 633 (Pb) en presencia de pesticidas. (A) Micrografía electrónica de barrido de Pb cultivado en medio MEA (a-d) sin pesticidas (b-e) con 2,4-D [1000 mg L⁻¹] (c-f) CP [10 mg L⁻¹]. (B) Comparación de diámetros medios de hifas y esporas (C) de Pb con 12 días de incubación en medio con 2,4-D, CP y su control (sin pesticidas). Medias con letras diferentes indican una diferencia significativa (p < 0,05). Para cada imagen obtenida por SEM se realizaron 50 mediciones mediante el programa ImageJ y el análisis estadístico se realizó con Statgraphics Centurion XVII.

La temperatura óptima para la actividad lacasa fue de 50 °C con 2,4-D y 60 °C con Clorpirifos. La máxima actividad con CuSO₄ en presencia de ambos plaguicidas fue a 40 °C y en ausencia de contaminantes, a 50 °C. El valor de pH óptimo para todos los tratamientos fue de 3,6. La enzima mostró alta estabilidad a distintas T° y pHs con ambos plaguicidas, incrementando su vida media en presencia de cobre en la mayoría de los tratamientos.

CONCLUSIÓN

Estos resultados indican que *P. brevispora* BAFC 633 mantiene crecimiento y actividad lacasa con 2,4-D y CP, mostrando su potencial para futuras aplicaciones biotecnológicas de biorremediación.