

EnziMar



"More enzymes Less pesticides"

Biology 23/24

Authors: Catarina Carneiro, Diana Barroso, Inês Rodrigues.

Responsible teacher: Luísa Meira Santos.

Índice

Index

05

Equipa
Team

06

Resumo
Abstract

08

Cronograma
Timeline

10

Introdução
Introduction

12

Procedimento
Procedure

16

Resultados
Results

18

Discussão/Conclusão
Discussion/Conclusion

19

Agradecimentos
Acknowledgments

21

Reflexões da equipa
Team reflections

26

Website e redes sociais
Website and social media

28

Webgrafia
Webgraphy

Equipa

Esta é a equipa por detrás deste ambicioso projeto. Somos 4 alunos do 12ºB da Escola Secundária da Maia e desenvolvemos este projeto no âmbito da disciplina de Biologia.



Catarina Carneiro



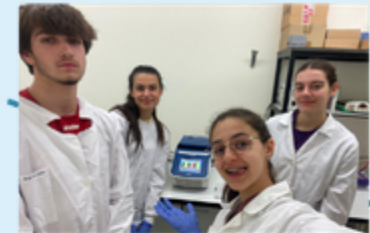
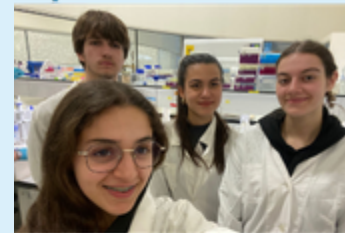
Diana Barroso



Inês Carmona



Rodrigo Fernandes



Resumo

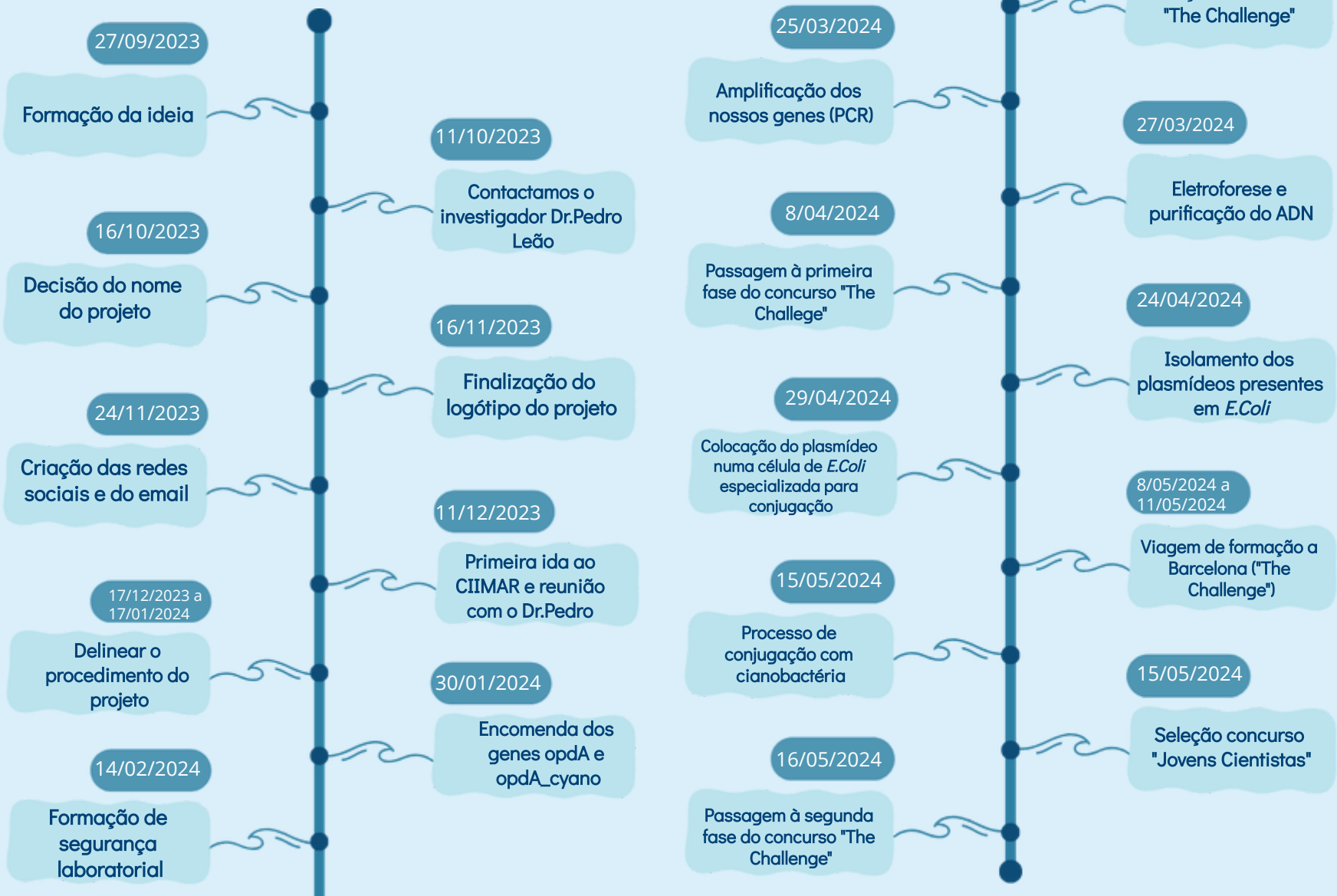
Atualmente, os pesticidas são uma das maiores fontes de poluição no oceano, uma vez que os organofosfatos, parte da sua constituição, são praticamente insolúveis em água e têm tendência para se bioacumularem. Estes compostos tóxicos ameaçam, significativamente, tanto a vida aquática como a saúde humana. Face a este problema, o obstáculo imposto foi como reduzir a quantidade e o impacto dos pesticidas em diversos ecossistemas, uma vez que não foi encontrada nenhuma solução na literatura. O projeto visa uma abordagem inovadora, que consiste em criar um produto (líquido ou *spray*) a partir da enzima opdA, produzida em cianobactérias geneticamente modificadas para este fim, cuja função é hidrolisar organofosfatos. Inicialmente fez-se uma pesquisa científica e a partir desta selecionou-se o par enzima-substrato adequado para utilizar na prova-conceito, bem como o método analítico ideal para analisar as substâncias em laboratório. O método proposto envolve a utilização de colónias de *E. coli* para conservação dos plasmídeos com o gene da opdA inserido; utilização da técnica PCR para amplificar o gene e introdução desse mesmo num plasmídeo, com o auxílio de *primers* desenhados

especificamente para essa finalidade, compatível com a cianobactéria a ser utilizada; cromatografia de gás para analisar a reação de degradação, mais especificamente as concentrações de reagentes e produtos de reação. De acordo com as investigações feitas até agora, os resultados esperados são produzir eficazmente a enzima opdA em cianobactérias e que esta consiga degradar eficientemente os organofosfatos no oceano. Até ao momento, todos os procedimentos têm demonstrado os resultados esperados.

Palavras-chave: opdA, organofosfatos, cianobactérias, enzimas.



Cronograma



Introdução

Atualmente, os pesticidas são das maiores fontes de poluição dos ambientes marinhos. Devido ao contínuo aumento da atividade agrícola, de modo a acompanhar o crescimento industrial, torna-se cada vez mais recorrente a chegada destes poluentes a qualquer meio marinho, através do desaguar de rios, por exemplo. No seguimento deste contexto, o projeto iniciou-se, em parceria com o CIIMAR, analisando o artigo de revisão sobre biorremediação enzimática de compostos organofosforados, (Thakur et al., 2019). O objetivo desta pesquisa inicial foi selecionar o par enzima-substrato (pesticida) adequado a utilizar na prova-conceito a realizar, bem como o melhor método analítico para analisar as substâncias em laboratório. A conselho dos cientistas, focou-se em duas das enzimas presentes no artigo acima mencionado: OpdA ([Anderson et al., 2011](#); [Bird et al., 2008](#); [Horne et al., 2002](#); [Jackson et al., 2014](#); [Scott et al., 2011](#)) e a PTE ([Bigley et al., 2019](#); [Ghanem and Raushel 2005](#); [Merone et al., 2005](#)). A partir do estudo dos artigos científicos relacionados a ambas, concluiu-se quais os pesticidas mais frequentemente usados e por isso com mais chance de terminarem o seu trajeto no meio aquático, pelo que os três selecionados foram

o Diazinão, o Paratão e o Clorpirifós; como a enzima OpdA era a mais estudada e a que apresentava uma relação mais forte com os pesticidas selecionados foi também a escolhida. O processo de produção de enzimas teria ainda de ser feito através de cianobactérias [*Anabaena sp. PCC 7120*], para uma semelhança mais próxima com o ambiente de atuação do produto, pelo que ainda foi feita uma investigação de enzimas homólogas à OpdA em cianobactérias (NCBI), sendo que optamos por utilizar a *Phosphotriesterase* [*Cyanothece sp. SIO1E1*] por ser a mais adequada a nível de homologia. Com todos os materiais a ser utilizados definidos, os cientistas idealizaram os procedimentos laboratoriais a seguir, seria necessário retirar os genes pretendidos de um plasmídeo e inseri-los novamente noutro compatível com a cianobactéria usada, através de técnicas de PCR e transformações em *E.coli*, de seguida será feita uma conjugação bacteriana, de modo a introduzir o último plasmídeo na cianobactéria para as enzimas necessárias serem produzidas.



Procedimento

Iniciamos o trabalho prático com a inserção dos plasmídeos, com os genes que permitem a produção da enzima OpdA e Opda_cyano, em *E.coli* – transformação. Seguidamente utilizamos a técnica PCR a diferentes temperaturas de modo a perceber qual seria a temperatura ideal para a amplificação dos genes. Por meio da eletroforese e observação do gel, obtivemos as temperaturas de 62°C. para ambos os genes.

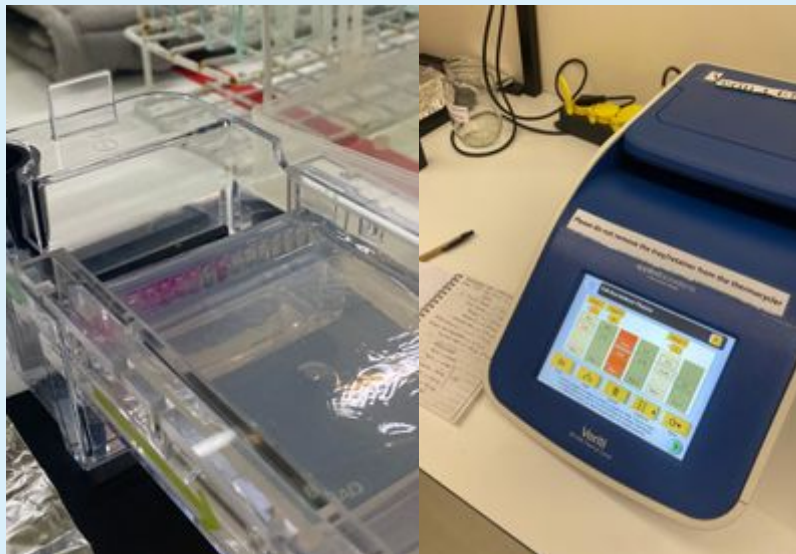


Figura 1: Eletroforese e PCR

Com a temperatura anteriormente estudada efetuamos novamente a técnica de PCR para obtermos uma maior quantidade de ADN e o isolamento dos genes desejados. Repetimos a eletroforese, de modo a verificarmos o sucesso da amplificação a existência de possíveis contaminações e, posteriormente, purificamos o ADN e medimos a sua concentração.

Incluímos, por complementaridade de bases, os genes, anteriormente isolados e obtidos no PCR, no plasmídeo compatível com as cianobactérias, com o auxílio de *primers* especificamente desenhados. Posteriormente, realizamos uma nova transformação em *E.Coli* do plasmídeo anteriormente mencionado. Extraímos as colónias de *E.coli* selecionadas e por via da técnica de PCR e posteriormente eletroforese, verificamos a incorporação dos plasmídeos com os nossos genes nas mesmas. Extraímos e isolamos novamente os plasmídeos das células e medimos as concentrações de ADN.

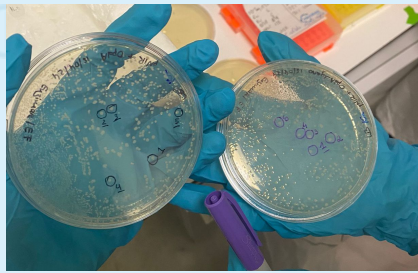


Figura 2: Seleção das colônias isoladas de *E.Coli*

Depois de isolados, introduzimos os plasmídeos em células especializadas de *E.Coli*, que nos vão auxiliar no processo de transferência do plasmídeo das células de *E.Coli* para a cianobactéria -conjugação. Seguidamente, preparamos os meios de cultura que serão utilizados para o processo de crescimento das cianobactérias e de conjugação na câmara de fluxo laminar, evitando qualquer contaminação.

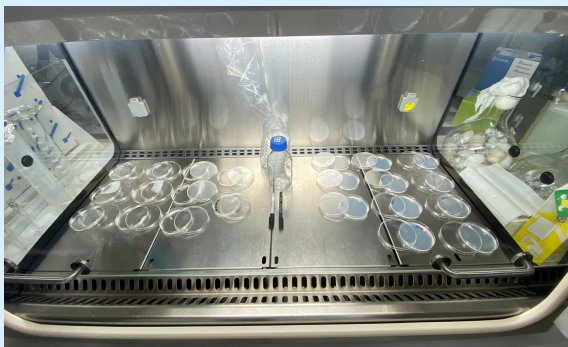


Figura 3: Câmara de fluxo laminar com as placas de Petri

Finalmente fomos capazes de efetuar o processo de conjugação, juntando as *E.Coli*, que contêm os plasmídeos, com as cianobactérias a utilizar, seguindo-se atualmente o período de crescimento das mesmas nos meios de cultura apropriados



Figura 4: Conjugação



Resultados

Perante o procedimento até ao momento efetuado, os resultados foram os desejados: as colónias de *E.Coli* cresceram como o esperado (Figura 5), com a amplificação e análise através da eletroforese identificamos uma temperatura mais eficiente para o processo (Figura 6), verificamos a pureza das amostras do ADN (Figura 7), as incorporações dos plasmídeos foram bem sucedidas e prevemos um resultado positivo para a conjugação (Figura 8).

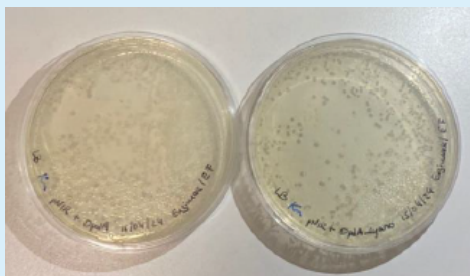


Figura 5: Transformação em *E.coli* dos genes *opdA* e *opdA*-cyano.

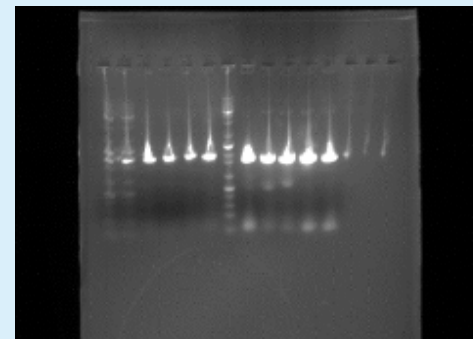


Figura 6: Identificação da temperatura mais adequada para a amplificação de ADN, através de técnica de eletroforese.



Figura 8: Colónias em *E.coli* contendo o plasmídeo compatível à cianobactéria com os genes *opdA* e *opdA*-cyano inseridos.

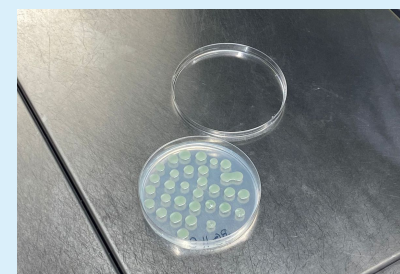


Figura 8: Conjugação.

Discussão/Conclusão

De acordo com os estudos e investigações efetuadas até ao momento, é fundamental ressaltar o sucesso dos resultados dos procedimentos realizados que se verificou. Através do protocolo idealizado por cientistas, que envolve a inserção do gene *OpdA* num plasmídeo compatível com a cianobactéria, e a inserção do mesmo através de uma conjugação bacteriana, de forma que esta produza a enzima desejada e através da cromatografia gasosa (GC) analisar a reação da mesma com compostos organofosforados, é de esperar uma eficácia total dos resultados. Prevemos assim, a produção eficaz da enzima *OpdA* em cianobactérias, de modo que esta seja eficiente na degradação dos compostos organofosforados presentes no oceano.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Pedro Leão e à sua equipa, nomeadamente, à Amaranta Kahn, Diana Sousa, Eunice Ferreira e Paulo Oliveira, do CIIMAR (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental), que contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento do projeto de pesquisa, como orientadores, colaboradores e financiadores. Assim como, ao Centro de investigação pelo fornecimento de todos os materiais e recursos utilizados.

Por último, muito obrigada à professora Luísa Meira Santos pelo acompanhamento e orientação durante todo o projeto.



ciimar

Centro Interdisciplinar
de Investigação
Marinha e Ambiental



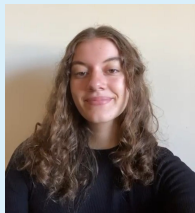
agrupamento de escolas da Maia





Reflexões da equipa





Catarina Carneiro

Este projeto mudou bastante a minha vida, não só por me fazer sair várias vezes da zona de conforto e conseguir comunicar mais com as pessoas mas também no meu futuro profissional. Com todo o trabalho que fomos desenvolvendo no laboratório, decidi fazer isto da minha vida e decidi finalmente o que vou seguir no ensino superior- bioquímica. O EnziMar também me proporcionou experiências inesquecíveis, como a viagem de formação a Barcelona e a futura viagem a Nova Iorque e Boston onde vamos apresentar o projeto à ONU, pelo concurso "The Challenge", e principalmente o contacto com pessoas incríveis com quem pude trabalhar e partilhar muitos pensamentos, que me ajudaram e ensinaram coisas que nunca pensei aprender. Dediquei muito de mim a este projeto ao longo de todo o ano letivo e nem tudo foram rosas, muitas noites sem dormir e horas a fio passadas em frente ao computador aconteceram, mas todo o trabalho (que foi muito) e esforço acabaram por compensar e estou muito feliz e orgulhosa com o que conquistei e com tudo o que este inesperado projeto me deu. Um grande obrigada ao CIIMAR e à professora Luísa por tornarem este projeto possível e por me fazerem acreditar que sou capaz.



Diana Barroso

O EnziMar abriu-me portas. Fez-me pensar em opções profissionais que nunca me passaram pela cabeça, fez-me evoluir diversas competências e ensinou-me outras tantas. No início do ano letivo, nunca imaginei que a ideia ambiciosa que projetaríamos nos levaria tão longe, literalmente ao outro lado do oceano, mas com o enorme apoio e financiamento do CIIMAR, da equipa do Dr. Pedro Leão e da professora Luísa Santos, o projeto foi possível. Sinto-me imensamente realizada e orgulhosa por todo o esforço e horas que foram dedicadas a este trabalho. Descobri e explorei capacidades que não conhecia e novos interesses. O EnziMar também me permitiu criar amizades inesperadas, desenvolver as minhas habilidades de comunicação e de informática, desenvolver o meu nível de inglês e o aprendizado de lidar com o trabalho sobre stress, porque sim, este trabalho também me deu algumas dores de cabeça e noites em frente a um computador, foi intenso, mas no final sempre valeu a pena. Creio que este projeto será uma mais-valia para o meu futuro e terá sempre um peso enorme na minha vida profissional. Sou extremamente grata por todo o desenvolvimento deste projeto e por todas as oportunidades que me foram proporcionadas.



Inês Rodrigues

Este projeto tornou-se algo maior do que alguma vez imaginei. No início do ano quando nos foi pedido para idealizar um projeto para biologia não tinha a menor ideia do que ia alcançar. Completamente perdida e sem ideias de alguma forma surgiu o EnziMar e depois disso dediquei-me ao máximo que consegui ao projeto. Desenvolvi capacidades incríveis nas mais variadas áreas desde de científicas até competências de trabalho em equipa e de entrega. Olhando para trás ao longo deste ano marcaram-me momentos de stress e frustração, mas também momentos gratificantes e de orgulho ao experienciar tudo que conseguimos alcançar com o nosso trabalho e dedicação. Contudo, penso que o mais valioso foi mesmo toda a experiência de trabalhar com um centro de investigação (CIIMAR) e todas as experiências que os concursos nos proporcionaram. O projeto e toda a sua envolvência apenas me deu mais certezas sobre o caminho a seguir nos próximos passos de aprendizagem, tendo um valor inimaginável. Muito trabalho e suor dedicados a este projeto, mas vou levá-lo para a vida e sinto um orgulho e uma realização enorme ao perceber o que fui capaz de atingir. Um obrigado à professora Luísa por nos ter proporcionado um ano que me trouxe tanto a tantos níveis.

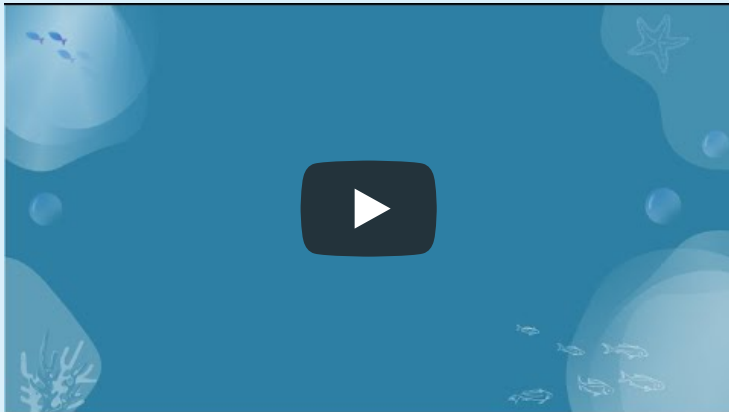


Rodrigo Fernandes

Um grande agradecimento à equipa que tornou isto possível, a equipa do Dr. Pedro Leão (Amaranta Kahn, Eunice Ferreira, Diana Sousa e Paulo Oliveira) do CIIMAR que ajudaram, desde a pesquisa até toda a parte laboratorial, dando um enorme contributo como orientadores e financiadores. Outro agradecimento à professora Luísa Meira Santos da Escola Secundária da Maia, que serviu de mentora desde o nascimento do projeto, numa das suas aulas e nos acompanhou aonde foi necessário. Obrigado também ao grupo, como um todo por este projeto.

Website e redes sociais

Aqui encontram o nosso site que possui o vídeo de apresentação abaixo representado e também poderão passar pelas nossas redes sociais e ficar a saber mais sobre o projeto.



Email: enzimar.team@gmail.com



Webgrafia

Anderson, B., Phillips, B., Hunt, J., Largay, B., Shihadeh, R., & Tjeerdema, R. (2011). Pesticide and toxicity reduction using an integrated vegetated treatment system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(5), 1036–1043. <https://doi.org/10.1002/etc.471>

Bigley, A. N., Desormeaux, E., Dao Feng Xiang, Bae, S. Y., Harvey, S. P., & Raushel, F. M. (2019). Overcoming the Challenges of Enzyme Evolution To Adapt Phosphotriesterase for V-Agent Decontamination. *Biochemistry*, 58(15), 2039–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00097>

Bird, S. B., Sutherland, T. D., Gresham, C., Oakeshott, J., Scott, C., & Eddleston, M. (2008). OpdA, a bacterial organophosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides. *Toxicology*, 247(2-3), 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.02.005>

GHANEM, E., & RAUSHEL, F. (2005). Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 459–470. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.02.025>

Horne, I., Sutherland, T. D., Harcourt, R. L., Russell, R. J., & Oakeshott, J. G. (2002). Identification of an opd (Organophosphate Degradation) Gene in an Agrobacterium Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3371–3376. <https://doi.org/10.1128/aem.68.7.3371-3376.2002>

Jackson, C. J., Carville, A., Ward, J., Mansfield, K., Ollis, D. L., Khurana, T., & Bird, S. B. (2014). Use of OpdA, an organophosphorus (OP) hydrolase, prevents lethality in an African green monkey model of acute OP poisoning. *Toxicology*, 317, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.01.003>

Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M., & Manco, G. (2005). A thermostable phosphotriesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: cloning, overexpression and properties. *Extremophiles*, 9(4), 297–305. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0445-4>

Scott, C., Begley, C., Taylor, M. J., Pandey, G., Momiroski, V., French, N., Brearley, C., Kotsonis, S. E., Selleck, M. J., Carino, F. A., Bajet, C. M., Clarke, C., Oakeshott, J. G., & Russell, R. J. (2011). Free-Enzyme Bioremediation of Pesticides. *ACS Symposium Series*, 155–174. <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1075.ch011>

Thakur, M., Medintz, I. L., & Walper, S. A. (2019). Enzymatic Bioremediation of Organophosphate Compounds—Progress and Remaining Challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00289>