

## “OBTENCIÓN DE UN MICROORGANISMO RECOMBINANTE CON ACTIVIDAD DEGRADATIVA SOBRE EL POLIPROPILENO BIORIENTADO (BOPP)”

Peretti Canale María

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL  
Directora: María Gabriela Latorre Rapela

Área: Ciencias Biológicas

### INTRODUCCIÓN

El BOPP es una de las poliolefinas más importantes a nivel mundial (Galli y Vecellio, 2004). Debido a su alta demanda de consumo son responsables de gran parte de los residuos contaminantes que se acumulan en la naturaleza, con la consecuente contaminación ambiental (Téllez Maldonado, 2012). Si bien en la actualidad existen diferentes prácticas que intentan dar solución a la problemática generada por la acumulación de residuos plásticos del tipo BOPP, ninguna de ellas representa una alternativa atractiva. La biodegradación, como parte de la biorremediación, es una tecnología poco invasiva y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos que signifiquen una amenaza para el medio. En este proceso, diferentes enzimas microbianas descomponen los polímeros complejos en moléculas más simples, que son utilizadas como fuente de carbono y energía por los microorganismos (Kyrikou y Briassoulis, 2007). Si bien hasta el momento no se conocen los genes involucrados en el proceso de degradación del BOPP, estudios realizados en base al análisis de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) indican que el mismo comenzaría con una oxidación del polímero. En este proceso participarían enzimas similares a las hidroxilasas de alcanos (Liu y col., 2014; Kohno y col., 2002). Por lo tanto, la identificación de los genes que codifican estas enzimas (*alkB* y genes relacionados a *alkB*) en los microorganismos capaces de degradar BOPP (Belhaj y col., 2002), con la posterior obtención de un microorganismo recombinante conteniendo dicho gen, reviste una enorme importancia tanto teórica como práctica. De esta manera, la ingeniería genética puede ofrecer una solución a este problema, que consiste en el desarrollo de microorganismos genéticamente modificados capaces de eliminar aquellos materiales que son difíciles de degradar naturalmente transformando los contaminantes en productos ambientalmente más seguros, convirtiéndose así en mejores agentes de biorremediación (ArgenBio, 2007).

Este trabajo propone la obtención de un microorganismo recombinante con acción degradativa frente al BOPP, el cual podría ser utilizado en una unidad procesadora (reactor), en donde se generen las condiciones óptimas para su actividad biológica y de esa manera lograr una reducción significativa de los residuos de esta naturaleza.

### OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo comprende la obtención de un microorganismo recombinante capaz de biodegradar el BOPP. Para ello se plantearon dos objetivos específicos:

I- Evaluar la presencia de los genes codificantes de las enzimas involucradas en la degradación del BOPP en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada del relleno sanitario de la Ciudad de Santa Fe, mediante una técnica de PCR optimizada en el laboratorio.

II- Obtener un microorganismo recombinante con capacidad para degradar el BOPP.

Título del proyecto: Obtención de un microorganismo recombinante con actividad degradativa frente al polipropileno biorientado (BOPP).

Instrumento: 2.1

Año convocatoria: 2014

Organismo financiador: SECTEI

Director/a: María Gabriela de los Milagros Latorre Rapela

## METODOLOGÍA

### Identificación del gen *alkB* codificante para la enzima alcanol 1-monooxigenasa

Se realizó la extracción del ADN genómico de la *P. aeruginosa*, mediante lisis total por calentamiento. El fragmento de interés, gen *alkB*, se amplificó mediante una técnica de PCR optimizada en el laboratorio. Los resultados de la secuenciación se analizaron empleando bases de datos (GenBank y BLAST) y programas informáticos (*SnapGene*).

### Cepas bacterianas y vectores plasmídicos

Para el clonado de los productos de PCR y conservación de las construcciones plasmídicas se utilizó una cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y el vector pGEM-T Easy (Promega), mientras que para la expresión de la proteína se utilizó una cepa de *E. coli* BL21(DE3) y el vector pET28c (Novagene). El cultivo líquido de las bacterias se realizó en medio Luria-Bertani (LB), a  $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  y en agitación a 180 rpm (Sambrook y col., 1989).

### Transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ por electroporación

Las células electrocompetentes (Ausubel y col., 2003.) se pusieron en contacto con la construcción plasmídica pGEM-*EcoalkBHind* y se sometieron a cortos pulsos de corriente eléctrica de alto voltaje con el equipo *MicroPulser<sup>TM</sup> Electroporation Apparatus* (BIO-RAD). Las transformantes se sembraron en placas conteniendo LB suplementado con ampicilina, X-gal 5% e IPTG 1mM para reconocer las colonias recombinantes (color blanco). Se incubaron a  $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. La presencia del inserto se confirmó por PCR de colonia. A los clones que resultaron positivos se les extrajo el ADNp que se envió para su secuenciación y se conservaron en LB-glicerol 15% (v/v) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Minipreparación de ADNp, ligación y digestión con enzimas de restricción.

Para la extracción de ADN plasmídico (ADNp) se utilizó el *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific).

Para la reacción de ligación se mezcló el fragmento de ADN purificado con el vector en una relación molar 3:1 siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se incubó toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La construcción pGEM-*EcoalkBHind* se cortó con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Promega) según instrucciones del fabricante y se corrió en un gel de agarosa al 0,8%. Una vez identificada la banda correspondiente al inserto, se cortó la porción del gel que la contenía y se purificó el fragmento con el kit *Accuprep gel purification* (BIONNER). Se procedió de igual manera con el vector pET28c, a fin de purificar la banda correspondiente al vector linealizado.

### Transformación de *E. coli* BL21(DE3) por shock térmico

Las células químicamente competentes se pusieron en contacto con la construcción plasmídica pET28c-*EcoalkBHind* y se sometieron a un shock térmico. Las transformantes se sembraron en placas de Petri conteniendo medio LB-agar con kanamicina (KAN) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. La presencia del inserto se confirmó por PCR de colonia. A los clones que resultaron positivos se les extrajo el ADNp que se envió para su secuenciación y se conservaron en LB-glicerol 15% (v/v) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Expresión de la proteína recombinante

Las bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas se sembraron en medio LB suplementado con KAN e IPTG (1mM y 0,1mM). A las 3 h post inducción, se tomó una alícuota y el resto se incubó toda la noche (ON) a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación. Luego, a fin de visualizar la expresión de la proteína recombinante (41 kDa), se realizó la extracción de proteínas totales y posterior electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

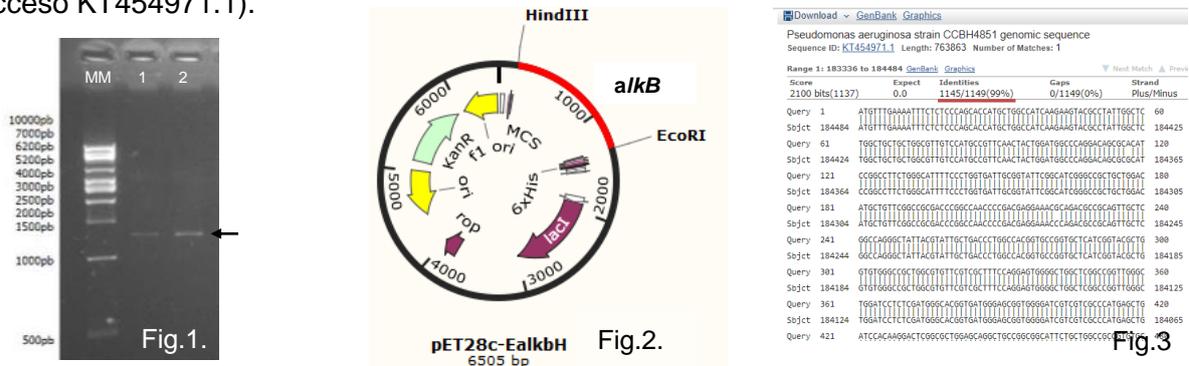
### Evaluación de la actividad degradativa

Se llevó a cabo una técnica de "screening", para lo cual se sembró una estría de la colonia previamente inducida en la superficie de placas de Petri conteniendo un medio mínimo de sales agarizado, suplementado con una emulsión de hexadecano (Yoon et al, 2012) e IPTG 0,1mM y se incubó a 35°C durante 7 días. La actividad degradativa se pone de manifiesto por la formación de un halo transparente en el medio de cultivo alrededor de la colonia.

### RESULTADOS/CONCLUSIONES

#### Gen *alkB* y construcciones plasmídicas

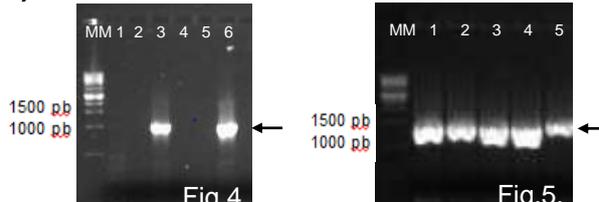
En la figura 1 se muestra la banda correspondiente al gen *alkB* amplificado, de 1149 pb. En la figura 2 se muestra la construcción pET28c-*EcoalkBHind* obtenida, donde se observan los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII* y la secuencia del gen *alkB* (en rojo). La secuencia del gen *alkB* analizada (figura 3) presentó 99% de identidad con la secuencia correspondiente a la enzima alcano 1-monooxigenasa de *P. aeruginosa* CCBH4851 (Nº de acceso KT454971.1).



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa. Calle MM: Marcador 1kB DNA Ladder (Genbiotech); calles 1 y 2: amplificación del fragmento de 1149 pb por PCR.  
**Figura 2.** Vector de expresión pET28c-*EcoalkBHind*, generado mediante el programa SnapGene.  
**Figura 3.** Resultado del alineamiento de la secuencia obtenida en BLAST.

#### Obtención de *E. coli* DH5α y *E. coli* BL21(DE3) recombinantes

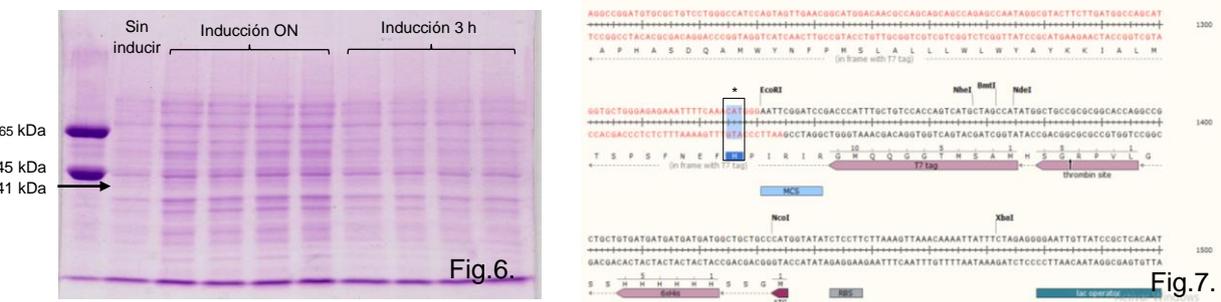
En las figuras 4 y 5 se observan los resultados de las PCR de colonia de *E. coli* DH5α y *E. coli* BL21(DE3) respectivamente. La presencia de una banda a la altura de los 1200 pb indica que las bacterias se transformaron exitosamente.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa. Calle MM: Marcador 1kB DNA Ladder (Genbiotech); calles 1, 2, 4 y 5 *E. coli* DH5α no transformadas; calles 3 y 6 *E. coli* DH5α transformadas.  
**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa. Calle MM: Marcador 1kB DNA Ladder (Genbiotech); calles 1 a 5 *E. coli* BL21(DE3) transformadas.

#### Expresión de la proteína recombinante

No se observaron diferencias significativas en el perfil de proteínas de las bacterias *E. coli* BL21(DE3) no inducidas, inducidas 3 h e inducidas ON, que se muestra en la figura 6. A partir del análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica en SnapGene, se corroboró que la misma se encuentra en fase con el marco de lectura del vector (Fig. 7).



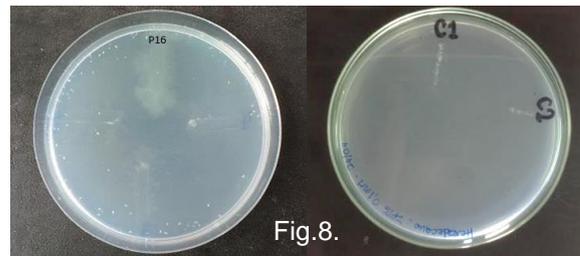
**Fig. 6.** SDS-PAGE de *E. coli* BL21(DE3) no inducida, inducida ON y 3h. **Fig. 7.** Análisis de secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen *alkB*.

**Figura 6.** SDS-PAGE. Calle M1: Marcador de PM (kDa); calle 2: *E.coli* BL21(DE3) no inducida; calles 3-6: *E.coli* BL21(DE3) inducida ON con IPTG 0,1mM; calles 7-10: *E.coli* BL21(DE3) inducida 3 h con IPTG 1mM.

**Figura 7.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica visualizada en *SnapGene*. \* Codón de inicio de la secuencia nucleotídica y Metionina inicial de la secuencia aminoacídica.

### Evaluación de la actividad degradativa

No se observó la presencia de halos alrededor de las colonias *E. coli* BL21(DE3) C1 y C2 recombinantes. La *P. aeruginosa* (P16) utilizada como control positivo presentó halo de inhibición.



**Figura 8.** Método de "screening". Colonia P16: control positivo. Colonias C1 y C2: *E. coli* BL21(DE3) inducida con IPTG 0,1 mM.

Considerando los resultados obtenidos, se puede concluir que se alcanzaron los objetivos propuestos. Se logró identificar y aislar el gen *alkB* de una *P. aeruginosa* nativa, el cual presentó una alta homología con los disponibles en base de datos.

Además, se obtuvo una cepa de *E. coli* BL21(DE3) recombinante conteniendo el gen *alkB* aislado. Dicha cepa no expresó la proteína alcano 1-monooxigenasa en concentraciones significativas, dificultándose su detección por las limitaciones tanto de la técnica SDS-PAGE como del método de *screening*.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- ArgenBio 2007. Biotecnología y limpieza del medio ambiente. <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=46>
- Ausubel, FM et al., 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc., NY, USA.
- Belhaj, A.; Desnoues, N. y Elmerich, C., 2002. *Alkane biodegradation in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a polluted zone: identification of alkB and alkB-related genes*. *Res Microbiol* 153: 339-344.
- Galli, P. y Vecellio, G., 2004. *Polyolefins: The most promising large-volume materials for the 21st century*. *J Polym Sci* 42:396-415.
- Kyrikou, I. y Briassoulis, D., 2007. *Biodegradation of Agricultural Plastic Films: A Critical Review*, *J Polym Environ* 15: 125-150.
- Kohno, T.; Sugimoto, Y.; Sei, K. y Mori, K., 2002. *Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria*. *Microbes Environ* 17(3):114-121.
- Laemmli, U.K., 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227: 680-685.
- Liu, H.; Xu, J.; Liang, R. y Liu, J., 2014. *Characterization of the medium- and long-chain n-alkanes degrading Pseudomonas aeruginosa strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes*. *PLoS ONE* 9(8): e105506. doi:10.1371/journal.pone.0105506.
- Menn, F.; Easter, J. y Saylor, G., 2000. *Genetically engineered microorganisms and bioremediation*. *Biotechnol* 11:441-451.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York, USA.
- Téllez Maldonado A., 2012. *La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá*. Tesis Magister. Colombia.
- Yoon M.G.; Jeon H.J. y Kim M.N., 2012. *Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell*. *J Bioremed Biodegrad* 3:145. doi:10.4172/2155-6199.1000145