

BIOCONVERSÃO DE CO₂ E CH₄ EM BIOPRODUTOS A PARTIR DO CO-CULTIVO DE MICROALGAS E BACTÉRIAS METANOTRÓFICAS

P.C.C. de JESUS^{1,4}, L.O. B CARDOSO^{2,4}, A.C.B. STERN¹, E.A. PERPETUO^{3,4}, T.O. BASSO¹,
C.A.O do NASCIMENTO^{1,4}

¹ Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Química

² Universidade de São Paulo, Programa Interunidades em Biotecnologia

³ Universidade Federal do Estado de São Paulo, Instituto de Ciências do Mar

⁴ Centro de Pesquisa para Inovação em Gás (RCGI)

E-mail para contato: priscilaccj@usp.br

RESUMO – O trabalho avaliou a bioconversão concomitante dos principais gases de efeito estufa (CO₂ e CH₄) através do co-cultivo de microalgas e bactérias metanotróficas, em diferentes proporções iniciais, com o objetivo de verificar a melhor configuração. Os parâmetros avaliados foram a proporção de células de cada grupo microbiano ao final dos cultivos, a composição de ácidos graxos e o teor de PHB na biomassa. A configuração com concentrações iniciais equivalentes (1:1) foi a que favoreceu a formação de lipídios com composição de ácidos graxos semelhante ao controle, além de propiciar aumento na produção de PHB em relação ao controle.

1. INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento global levou ao aumento nas emissões de gases de efeito estufa (GEEs), constituídos principalmente por dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄). O cenário atual de mudanças climáticas acelerou o campo das pesquisas para a utilização desses gases, sendo uma alternativa potencial a sua bioconversão em produtos de interesse comercial, através do uso de microrganismos ambientalmente selecionados.

Associações entre microrganismos ocorrem naturalmente no meio ambiente. Em bioprocessos, associações podem aumentar as chances de a cultura resistir a fortes variações ambientais, períodos de baixa disponibilidade de nutrientes e contaminações com outras espécies. Particularmente, interações entre microalgas e bactérias podem ser vantajosas, pois envolvem o fornecimento de nutrientes e oxigênio e até mesmo podem diminuir a toxicidade causada por eventuais subprodutos metabólicos (Singh et al. 2019). As microalgas utilizam o CO₂ como fonte de carbono para crescimento de biomassa, que pode ser matéria-prima para diversos bioprodutos, tais como lipídios (para produção de biodiesel ou para fins nutracêuticos), pigmentos, polissacarídeos, proteínas, entre outros (Borowitzka, 2013). As bactérias metanotróficas são capazes de oxidar o metano e utilizá-lo como única fonte de carbono, acumulando

intracelularmente sob condições específicas os polihidroxialcanoatos (PHAs), que são polímeros biodegradáveis com potencial para substituição aos derivados de petróleo (Liu et al., 2020).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o co-cultivo de um consórcio metano-heterotrófico dominado por *Methylosinus trichosporium* e microalgas (*Parachlorella kessleri*), em diferentes proporções iniciais, para produção de bioprodutos de interesse comercial (lipídios e polihidroxibutirato (PHB)) a partir da bioconversão de CO₂ e CH₄.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

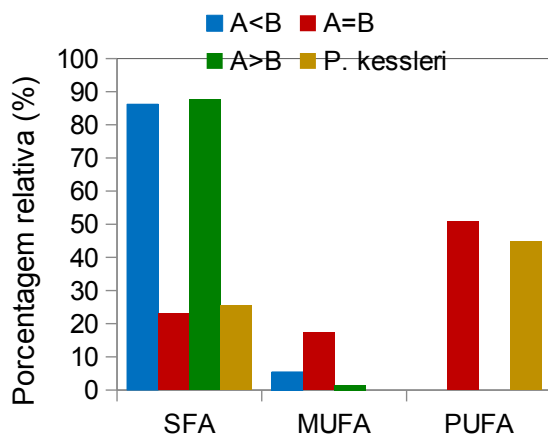
Os resultados referem-se ao estudo da interação entre os microrganismos mencionados, obtidos em áreas de mangue no litoral de São Paulo. Foram avaliadas diferentes concentrações iniciais de algas (A) e bactérias (B), as quais foram relacionadas de acordo com a densidade óptica (DO): $A < B$ (0,1 : 0,2); $A = B$ (0,1 : 0,1); $A > B$ (0,2 : 0,1). Todos os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura NMS (ATCC 1306), mantidos a 28°C sob agitação de 150 rpm e intensidade luminosa média de 25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 14h/10h claro/escuro. A composição do gás foi 5% (v/v) CO₂ e 12,5% (v/v) CH₄ em ar, renovado a cada 24 h. Os experimentos foram conduzidos durante 14 dias, sendo 10 dias de crescimento celular em meio de cultivo completo e 4 dias sob depleção da fonte de nitrogênio. Foram realizados também controles positivos para microalgas (na ausência de bactérias) e para bactérias (na ausência de microalgas). As proporções do número de células de cada grupo de microrganismos nas frações de cultura coletadas a cada 48 h foram analisadas por citometria de fluxo (S3e Cell Sorter FACS, Bio-Rad), diferenciadas segundo granulometria, tamanho e presença de clorofila. Os resultados mostraram a predominância das bactérias ao final de todos os cultivos: 90% em $A < B$, 62% em $A > B$ e 57% em $A = B$. No entanto, em concentrações iniciais iguais ($A = B$) houve um melhor equilíbrio entre as populações, o que pode sugerir alguma interação benéfica entre os dois grupos microbianos.

2.1. Composição de ácidos graxos

Ao final dos cultivos, a biomassa foi recolhida, centrifugada (3.000g por 5 min) e liofilizada. Os lipídios totais foram extraídos da biomassa seca com clorofórmio/metanol (1/2, v/v) (Bligh e Dyer, 1959). Para análise dos ácidos graxos, o óleo extraído reagiu com metanol contendo 5% H₂SO₄ (v/v) a 70°C por 3 h (Breuer et al., 2013) e os metil ésteres de ácidos graxos (FAME) foram recuperados com hexano e quantificados (Figura 1) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu).

A principal diferença observada entre os cultivos com variação da DO inicial ($A < B$ e $A > B$) em relação ao controle (*P. kessleri*) foi o aumento percentual relativo de quase 4 vezes nos ácidos graxos saturados. Em geral, sob carência de nutrientes, os ácidos graxos insaturados podem ser consumidos como fonte de energia, aumentando a concentração de saturados (Lim et al., 2012). A diferença mais notável entre $A = B$ e o controle foi a presença de ácido oleico (C18:1) em concentração relativa maior do que nas outras condições (17%). Estudos anteriores reportaram

esse fenômeno como uma situação de alta densidade celular e possível acúmulo de lipídeos (van der Ha et al., 2012). De fato, dentre as condições analisadas, A=B apresentou maior acúmulo de lipídios totais (17,8%) em comparação com A<B (10,7%) e A>B (10,9%). Os valores de DO em 750 nm no final de 14 dias de cultivo foram 2,0, 2,8 e 5,9 para A<B, A>B e A=B, respectivamente. As concentrações máximas de clorofila-a também foram bem discrepantes: aproximadamente 2 µg/mL (A<B), 5 µg/mL (A>B), 40 µg/mL (A=B) e 24 µg/mL (*P. kessleri*).



Porcentagem relativa (%)				Ácido graxo
A<B	A=B	A>B	<i>P. kessleri</i>	
nd	5,21	nd	6,74	C16:2
63,83	20,81	67,62	25,37	C16:0
nd	38,2	nd	30,08	C18:2
nd	7,51	nd	8,10	C18:3
5,44	17,34	1,50	nd	C18:1
22,37	2,13	20,11	nd	C18:0

nd – não detectado

Figura 1 – Porcentagem relativa dos principais ácidos graxos detectados (direita) e do total de saturados (SFA), mono-insaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) (esquerda)

2.2. Produção de PHB

A produção de PHB foi avaliada utilizando-se um consórcio metano-heterotrófico dominado por *Methylosinus trichosporium* e analisada por cromatografia gasosa. Para tanto, foi necessário converter o PHB em seus respectivos propil ésteres diretamente da biomassa liofilizada obtida ao final dos cultivos através do processo de propanólise descrito por Gomez et al. (1996). Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações finais de biomassa total e PHB

Amostra	Biomassa (g L ⁻¹)	PHB (g L ⁻¹)
A < B	2,71	0,28 ± 0,014
A = B	2,98	0,37 ± 0,046
A > B	3,33	0,17 ± 0,004
1SED	2,73	0,31 ± 0,010

A produção de PHB obtida nos co-cultivos A=B, A<B e A>B foi superior, equivalente e inferior, respectivamente, à produção obtida pelo controle positivo (1SED). A máxima produção atingiu 370 mg de PHB, sem alteração significativa na produção de biomassa entre as condições

avaliadas. Van der Ha et al. (2012) reportaram um estudo semelhante porém utilizando processo *two-step* (primeiro consumo de CO₂ e, então, consumo de CH₄) e obtiveram 295 mg de PHB a partir de cultura pura de *Methylocystis parvus*.

3. CONCLUSÃO

O co-cultivo de microalgas e bactérias metanotróficas mostrou ser uma estratégia potencial para consumo concomitante de CO₂ e CH₄ e conversão em lipídios e PHB, desde que as concentrações iniciais de ambos os grupos de microrganismos sejam equivalentes. O uso de GEEs como fonte de carbono apresenta viés ambiental e tecnológico que poderia agregar às empresas do setor de Óleo & Gás, as quais produzem grandes quantidades de CO₂ e CH₄, podendo tornar esse obstáculo algo lucrativo.

4. REFERÊNCIAS

- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37, 911–917.
- BOROWITZKA, M. A. 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J. of Appl. Phycol.*, 25, 743–756.
- BREUER, G., EVERS, W. A. C., DE VREE, J. H., KLEINEGRIS, D. M. M., MARTENS, D. E., WIJFFELS, R. H. & LAMERS, P. P. 2013. Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. *Jove-J. of Visual. Exp.*
- GOMEZ, J. G. C., RODRIGUES, M. F. A., ALLI, R. C. P., TORRES, B. B., BUENO NETTO, C. L., OLIVEIRA, M. S., DA SILVA, L. F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid, *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 45 (1996) 785–791.
- LIM, D. K., GARG, S., TIMMINS, M., ZHANG, E. S., THOMAS-HALL, S. R., SCHUHMANN, H., LI, Y. & SCHENK, P. M. 2012. Isolation and evaluation of oil-producing microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *PLoS One*, 7, e40751.
- LIU, L. Y., XIE, G. J., XING, D. F., LIU, B. F., DING, J., REN, N. Q. Biological conversion of methane to polyhydroxyalkanoates: Current advances, challenges, and perspectives. *Environ. Sci. and Ecotechnol.*, v. 2, p. 100029, 2020.
- SINGH, R.; RYU, J.; KIM, S. W. Microbial consortia including methanotrophs: some benefits of living together. *J. of Microbiol.*, v. 57, n. 11, p. 939–952, 2019.
- VAN DER HA, D., NACHTERGAELE, L., KERCKHOF, F. M., RAMEIYANTI, D., BOSSIER, P., VERSTRAETE, W. & BOON, N. 2012. Conversion of Biogas to Bioproducts by Algae and Methane Oxidizing Bacteria. *Environmental Science & Technology*, 46, 13425–13431.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Shell Brasil em conjunto com a FAPESP por meio do 'Centro de Pesquisas para Inovação em Gás - RCGI' (Fapesp Proc. 2014 / 50279-4), sediado na Universidade de São Paulo, e a importância estratégica do apoio dado pela ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) por meio da regulamentação de P&D.