



## Obtenção de biofilme ativo pelo cultivo em simbiose de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Komagataeibacter xylinus*

### Obtaining active biofilm by symbiotic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Komagataeibacter xylinus*

Evelyn Pereira Ribeiro Garcia<sup>1</sup>, Andréia Anschau<sup>2</sup>

#### RESUMO

A busca por alternativas sustentáveis na produção de biomassa e bioprodutos tem impulsionado pesquisas sobre estratégias para otimizar o crescimento de microrganismos de interesse industrial. A nanocelulose bacteriana (NCB) tem sido recentemente objeto de inúmeras pesquisas, não só pela sua biossíntese sustentável, mas também pelo seu elevado potencial em áreas como a biomedicina ou os biomateriais. Uma relação simbiótica entre uma microalga fotossintética, *Chlamydomonas reinhardtii*, e a bactéria produtora de celulose, *Komagataeibacter xylinus*, foi estabelecida a fim de obter um biofilme viável e ativo, explorando benefícios mútuos através de trocas de nutrientes e a possibilidade de utilização de nanocelulose bacteriana como suporte para o crescimento de microalgas, proporcionando um ambiente ideal para o seu desenvolvimento. A avaliação das diferentes proporções de meio misto TAP e HS revelou que a formulação de 9:1 (TAP:HS) foi a mais eficiente para a incorporação e imobilização das microalgas na matriz de nanocelulose bacteriana. Este estudo representa um passo importante em direção a soluções mais sustentáveis e inovadoras para aplicações de biofilmes de celulose bacteriana (BC) em áreas ainda não exploradas.

**PALAVRAS-CHAVE:** microalgas; nanocelulose; simbiose.

#### ABSTRACT

The search for sustainable alternatives in the production of biomass and bioproducts has driven research into strategies to optimize the growth of microorganisms of industrial interest. Bacterial cellulose (BC) has recently been the subject of a considerable amount of research, not only for its environmentally friendly biosynthesis, but also for its high potential in areas such as biomedicine or biomaterials. A symbiotic relationship between a photosynthetic microalga, *Chlamydomonas reinhardtii*, and a cellulose producer bacterium, *Komagataeibacter xylinus*, was established in order to obtain a viable and active biofilm, exploring mutual benefits through nutrient exchanges and the possibility of using bacterial nanocellulose as support for growth of microalgae, providing an ideal environment for their development. The evaluation of the different proportions of TAP and HS mixed media revealed that the 9:1 (TAP:HS) formulation was the most efficient for the incorporation and immobilization of microalgae in the bacterial nanocellulose matrix. This study represents an important step towards more sustainable and innovative solutions for applications of bacterial cellulose (BC) biofilms in areas not yet explored.

**KEYWORDS:** microalgae; nanocellulose; symbiosis.

#### INTRODUÇÃO

A busca por alternativas sustentáveis e inovadoras na produção de biomassa e bioprodutos tem impulsionado a investigação de estratégias inovadoras para otimizar a produção de microrganismos de interesse industrial. A simbiose de microalgas e bactérias oferece um grande potencial para aplicações biotecnológicas, com benefícios mútuos que vão desde a otimização das condições de crescimento até a descontaminação de água, uma vez que há uma reciclagem de nutrientes, as microalgas consomem o CO<sub>2</sub> produzido

<sup>1</sup> Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: eveprgarcia@gmail.com. ID Lattes: 5378500187340669.

<sup>2</sup> Docente de Engenharia de Bioprocesso e Biotecnologia e Chefe do Departamento de Ensino. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: andreiaanschau@utfpr.edu.br. ID Lattes: 3961734985713527.

pelas bactérias e o O<sub>2</sub> produzido pelas cianobactérias é consumido pelas bactérias. A simbiose entre microalgas e bactéria, permite a troca de nutrientes e promove um ambiente favorável para ambas as espécies. Além disso, o desenvolvimento de suportes de nanocelulose bacteriana tem se provado uma abordagem promissora para encapsulamento e cultura microbiana, sendo um polissacarídeo usado em diversas áreas por conta de suas características únicas, como a hidrofiliabilidade, porosidade, cristalinidade, resistência mecânica, biocompatibilidade e possibilidade de modificação química, fornecendo um ambiente tridimensional adequado para o crescimento e proliferação de microalgas. Neste contexto, este trabalho aborda a simbiose de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Komagataeibacter xylinus*, explorando interações benéficas entre esses organismos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A microalga *C. reinhardtii* foi cedida pela Universidade Federal de Uberlândia (CC-124 wild type mt-[137c]), origem Chlamydomonas Resource Center/University of Minnesota, e mantida em geladeira à 7°C por 3 dias. Após, foi feita a ativação da linhagem utilizando 10 mL de células em um erlenmeyer com meio tris-acetato-fosfato (TAP) a uma temperatura de incubação de 30 °C, fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa de 1800 lux. Após 7 dias, foi feito repique e mantido a uma temperatura de incubação de aproximadamente 30°C e pH 7, com repiques mensais. O meio de cultura das microalgas consiste em solução de tris-acetato-fosfato (TAP) sais (cloreto de amônio, NH<sub>4</sub>Cl; sulfato de magnésio, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; cloreto de cálcio, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), solução fosfato (fosfato dipotássico, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; fosfato monopotássico KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), solução de oligoelementos de Hutner (sal dissódico de EDTA; sulfato de zinco, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; ácido bórico, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; cloreto de manganês (II), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; cloreto de cobalto (II), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; sulfato de cobre, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; sulfato de ferro, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; molibdato de amônio, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O); tris-hidroximetil-aminometano, (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) e ácido acético, (CH<sub>3</sub>COOH). A linhagem de *Komagataeibacter xylinus* (ATCC® 53524™), cedida pela Universidade Federal de Santa Catarina, foi cultivada em meio Hestrin-Schramm (HS) (glicose, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>; peptona, extrato de levedura; fosfato dissódico, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; ácido cítrico, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) a pH 6,5, a temperatura de 28°C por 7 dias, de forma estática, possibilitando a formação de diferentes camadas de celulose produzida pela bactéria.

Para o crescimento em simbiose, as microalgas foram adicionadas ao meio de cultivo bacteriano e cresceram juntas em uma mistura de meio TAP e HS em concentrações diferentes, sendo dois deles cultivos controle de *Chlamydomonas reinhardtii* com meio em 100% TAP e *Komagataeibacter xylinus* com meio 100% HS, 9,5:0,5 (TAP:HS), 9:1 (TAP:HS) e 8:2 (TAP:HS). Os cultivos foram feitos de forma estática a 28°C com fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 1800 lux, em placas de cultivo de células de 24 poços (Figura 1), e em erlenmeyers de 250 mL para moldar a nanocelulose em diferentes diâmetros e espessuras.

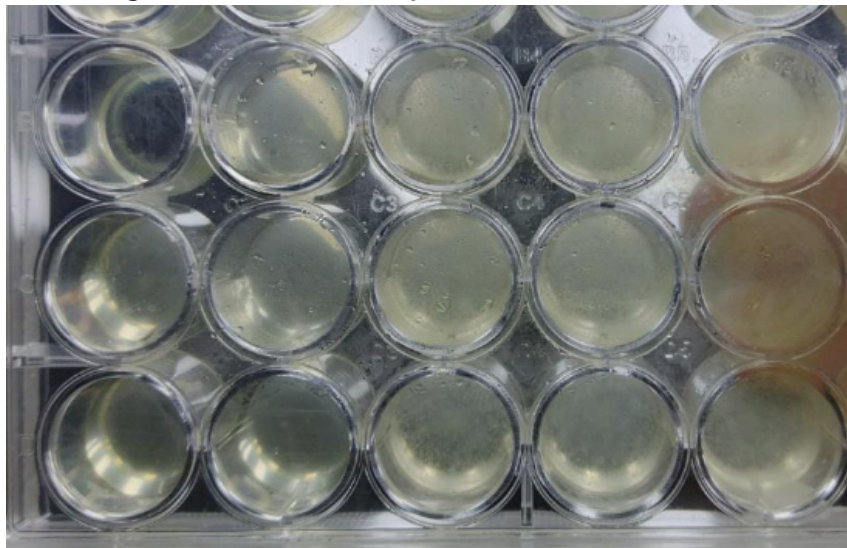
Após 14 dias de cultivo, foram retiradas amostras de nanocelulose, sendo lavadas três vezes com água destilada e comprimidas até que saísse todo meio líquido interno (Figura 2A), e levado ao microscópio óptico para observação de incorporação (Figura 2B).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

As células cultivadas em meio misto com diferentes proporções de TAP e HS permitiram avaliar a eficiência de integração. A razão de 9:1 (TAP:HS) foi a formulação

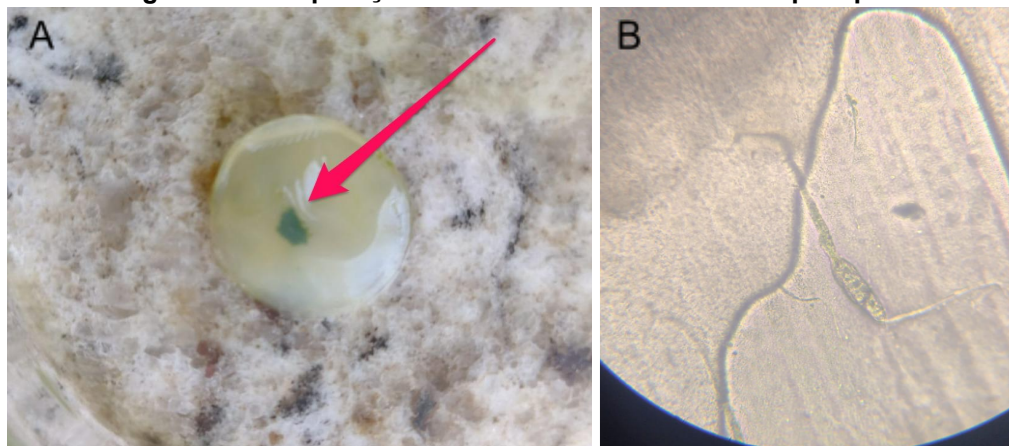
ideal para incorporação e imobilização das microalgas na matriz de nanocelulose bacteriana. Tal proporção permitiu o crescimento de ambas e formação das camadas de nanocelulose. A maior proporção de meio HS em comparação com meio TAP se dá pela necessidade de glicose para a síntese da nanocelulose bacteriana. A viabilidade das células de microalgas se manteve em todas as proporções, porém foi evidente a mudança da morfologia e textura do biomaterial vivo. Analisando e identificando as concentrações necessárias de cada inóculo, foi possível manter um consórcio simbiótico bem-sucedido.

Figura 1 - Simbiose em placas de cultivo de células



Fonte: Autoria própria

Figura 2 - Incorporação visível e através de microscopia óptica



Fonte: Autoria própria

## CONCLUSÃO

O estudo aqui apresentado abordou a potencial simbiose entre a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* e a bactéria produtora de celulose *Komagataeibacter xylinus*, explorando as interações benéficas entre esses microrganismos para otimização sustentável da produção de biomassa. A simbiose de microalgas e bactérias se mostra como uma abordagem promissora, oferecendo vantagens de otimização das condições

de cultivo, como o reuso e troca de nutrientes, criando um ambiente favorável para ambas as espécies.

A avaliação das diferentes proporções de meio misto TAP e HS revelou que a formulação de 9:1 (TAP:HS) foi a mais eficiente para a incorporação e imobilização das microalgas na matriz de nanocelulose bacteriana. Embora as morfologias e texturas tenham apresentado mudanças, a viabilidade das células de microalgas se manteve em todas as proporções testadas. Os inóculos permitiram um consórcio simbiótico, apontando para um potencial significativo para aplicações biotecnológicas e de produção sustentável.

Portanto, os resultados e discussões apresentados destacam o potencial dessa abordagem simbiótica e do uso de nanocelulose bacteriana como suporte para o cultivo de microalgas, abrindo caminho para avanços na biotecnologia e na produção de bioprodutos.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária e ao CNPQ pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (PIBIC CNPq - AÇÕES AFIRMATIVAS – CNPQ / Bolsa Iniciação científica - Ações Afirmativas), ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia Ambiental e Alimentos (LABMULT LABIA) e demais laboratórios da UTFPR-DV pela infraestrutura para realização dos experimentos e análises.

## CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflito de interesse em ambos os lados.

## REFERÊNCIAS

ALVES DE SOUZA PANTA, Daniel et al. MICROALGAS COMO UMA ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVES 3G. **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 8, n. 3, p. 58-76, 22 out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.20873/uftv8-11171>. Acesso em: 08 fev. 2023.

ANDRADE, L. A. et al. Characterization and product formation during the catalytic and non-catalytic pyrolysis of the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Renewable Energy**, v. 119, p. 731-740, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.12.056>. Acesso em: 20 abr. 2023.

BALASUBRAMANIAN, Srikanth et al. Bioprinting of Regenerative Photosynthetic Living Materials. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 31, p. 2011162, 29 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adfm.202011162>. Acesso em: 13 mar. 2023.

CANTILLO CARRERO, Andrea María et al. Optimización de consorcio alga-bacteria para degradación de fenol. 2014.

COSTA, Maria Helena Juvito da et al. Ocorrências e aplicações de consórcio de microalgas: uma revisão sistemática da literatura. **Research, Society and Development**,

v. 11, n. 1, p. e11511124421, 3 jan. 2022. Disponível em:  
<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24421>. Acesso em: 14 mai. 2023.

DAS, Anupam A. K. et al. Fabrication of living soft matter by symbiotic growth of unicellular microorganisms. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 21, p. 3685-3694, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c5tb02489g>. Acesso em: 06 fev. 2023.

DE SOUZA, Samara S. *et al.* Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. **Cellulose**, v. 26, n. 3, p. 1641-1655, 8 dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2178-4>. Acesso em: 5 mai. 2023.

DONINI, Ígor A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010.

GUZAL-DEC, Danuta. Review of the Report Entitled: The Impact of the European Green Deal on Polish Agriculture, Gradziuk, P.; Matyka, M.; Poczta, W.; Czerniak, A.; Czubak, W.; Jończyk, K.; Kopiński, J.; Kozyra, J.; Pawlak, K.; Sadowski, A.; Siebielec, G.; Stalenga, J.; Wawer, R.; Zawalińska, K.; Berbeć, A.; Krupin, V.; Madej, A.; Skowron, P.; Jendrzewski, B.; Komisarek, D.; Łopatka, A.; Wojciechowska, A.; Klepacki, B.; Wrzaszcz, W.; Gradziuk, K.; Trocewicz, A. Reports Of Polityka Insight 2021. Polityka Insight Sp. Z O.O. Warsaw. DOI: 10.13140/Rg.2.2.35624.49922/1, 233 PP. **Economic and Regional Studies / Studia Ekonomiczne i Regionalne**, v. 15, n. 3, p. 423-430, 1 set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/ers-2022-0029>. Acesso em: 28 abr. 2023.

LOPES, Pricilla Vicente. Ação antimicrobiana de um filme nanocompósito formado por nanocelulose bacteriana e dióxido de titânio. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v. 19, n. 56, p. 314-324, 2023. Disponível em:  
<https://doi.org/file:///C:/Users/evepr/Downloads/15211-60021-1-PB.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2023.

MANEERUNG, Thawatchai; TOKURA, Seiichi; RUJIVARANIT, Ratana. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 43-51, 2008.

ROMÃO, B. B. et al. Biohydrogen Production Through Dark Fermentation by a Microbial Consortium Using Whey Permeate as Substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3670-3685, 23 fev. 2014. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-0778-5>. Acesso em: 20 abr. 2023.

ROSSETO, Marieli & Toniciulli Riguetto, Cesar & Dettmer, Aline & Loss, Raquel & Pizzutti, Ionara & Richards, Neila. (2021). Adição de compostos bioativos em embalagens alimentícias ativas e inteligentes: tendências, avanços e desafios. Disponível em:  
<https://doi.org/file:///C:/Users/evepr/Downloads/15211-60021-1-PB.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2023.