

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE ENERGIA E AMBIENTE

DIOGO MITSUO OLIVEIRA OGAWA

Prospecção de microrganismos marinhos antárticos direcionada à fixação  
de dióxido de carbono em estado supercrítico

São Paulo, 2024

Diogo Mitsuo Oliveira Ogawa

Prospecção de microrganismos marinhos antárticos direcionada à fixação  
de dióxido de carbono em estado supercrítico

Versão corrigida

Tese apresentada ao Instituto de  
Energia e Ambiente da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciência Ambiental.

Área de concentração: Ciência  
Ambiental

Orientador: Cláudio Augusto Oller do  
Nascimento

São Paulo

2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Ogawa, Diogo Mitsuo Oliveira.

Prospecção de microrganismos marinhos antárticos direcionada à fixação de dióxido de carbono em estado supercrítico. / Diogo Mitsuo Oliveira Ogawa; orientador: Cláudio Augusto Oller do Nascimento. – São Paulo, 2024.  
57 f.: il; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciência Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental - Instituto de Energia e Meio Ambiente - Universidade de São Paulo

Elaborado por Maria Penha da Silva Oliveira CRB-8/6961

Nome: OGAWA, Diogo Mitsuo Oliveira

Título: Prospecção de microrganismos marinhos antárticos direcionada à fixação de dióxido de carbono em estado supercrítico.

Tese apresentada ao Programa de Ciência Ambiental do Instituto de Energia e Ambiente da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2024.

Banca examinadora:

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

*À minha família e  
e ao Yamane Sensei (in memoriam)*

Agradecimentos:

À minha família, pelo apoio irrestrito.

Ao Prof. Dr. Cláudio Augusto Oller do Nascimento pela oportunidade, pela orientação, por todo o apoio e pela enorme paciência.

Ao Sr. Sigueru Yamagishi, pelo apoio financeiro e de infraestrutura.

À Profa. Rita Maria de Brito Alves e sua equipe, pelo apoio e infraestrutura.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento pelo apoio e pela indicação do orientador.

Ao Prof. Arthur Ayres, pela disponibilização das amostras.

Ao Dr. Enrique Rozas, pelas prolíficas discussões e decisiva contribuição em meu trabalho.

Ao Dr. Paulo Firmino Moreira Jr., pelo imenso auxílio técnico, discussões e amizade.

Ao Prof. Thiago Olitta Basso e sua equipe, pelo apoio técnico e infraestrutura.

À Dra. Maria Villegas, pelo apoio técnico e treinamento na operação do sistema de pressurização do reator.

À Dra. Maria Anita Mendes e Dra. Meriellen Dias Pantolfi, pelo apoio técnico.

À secretaria de pós-graduação do PROCAM – USP, sempre solícitos, sem eles meu trabalho estaria comprometido.

Ao amigo Fábio Godoy, pelo auxílio com os programas de identificação de espectros Raman.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) sob o Programa de Excelência Acadêmica, que viabilizou minha carreira acadêmica.

A todos professores, mentores, amigos e colegas por todo o apoio.



*“The era of global warming has ended.  
The era of global boiling has arrived.”*

(António Guterres)

## RESUMO

O ano de dois mil e vinte e três foi o ano mais quente já registrado, o aquecimento global acelera sua escalada, testemunhamos a uma série de eventos de clima extremo, mais frequentes e mais intensos, desabrigados climáticos, infraestrutura danificada, incêndios florestais, “tsunamis meteorológicos”. Falhamos no cumprimento das principais metas do protocolo de Kyoto, estamos muito próximos de descumprir com a meta de desaceleração do aquecimento global do acordo de Paris. As emissões dos gases do efeito estufa se incrementam e, mesmo se cessassem, as temperaturas continuam a subir, elevando a média global. As tecnologias de captura e armazenamento de carbono estão se desenvolvendo para contrabalançar as emissões desses gases, retirando-os da atmosfera e armazenando fisicamente ou transformando-os em moléculas úteis para a sociedade. Neste trabalho prospectamos microrganismos que possam servir de plataforma para desenvolvimento de tecnologias de captura de carbono. Processamos amostras de sedimento marinho da região do Estreito de Brainsfield, Antártida, e cultivamos sob 100 bar de pressão e dióxido de carbono em estado supercrítico como fonte de carbono, condições similares às encontradas nas jazidas de petróleo, onde a tecnologia pode ser uma ferramenta para o sequestro de carbono e contribuir para a diminuição da concentração dos gases de efeito estufa na atmosfera.

Palavras-chave: Bactérias quimioautotróficas. CCS. Fixação de carbono. Captura de carbono. Tioacetato. Dióxido de carbono supercrítico.



## ABSTRACT

The year of two thousand twenty-four was the hottest year ever recorded, global warming accelerates its rising, we witness a series of extreme weather events, more frequent and more intense, climate refugees, infrastructure harmed, forests burning, "meteorological tsunamis". We failed to meet the main goals of the Kyoto protocol; we are very close fail in meeting the Paris agreement's slowing global warming goal. Greenhouse gases emissions are at rise and, even if completely halt, temperatures would keep rising, enhancing the global average. Carbon capture and storage technologies are being developed to counterbalance these emissions by removing such gases from the atmosphere and physically storing or transforming them into useful molecules for the society. In this work we prospect microorganisms that can serve as a platform for developing carbon capture technologies. We process marine sediment samples from the seabed in the Brainsfield Strait region, Antarctica, and cultivate them under 100 bar of pressure and supercritical carbon dioxide as carbon source, conditions similar to those found in oil fields, where the technology can be used as a tool for carbon sinking, decreasing greenhouse gas concentrations in the atmosphere.

Keywords: Chemoautotrophic bacteria. CCS. Carbon fixation. Carbon capture. Thioacetate. Supercritic carbon dioxide.

## Lista de figuras

Figura 1: Gráfico adaptado do relatório da organização meteorológica mundial apresentando o escalar da temperatura média global anual comparada com a média de 1850 a 1900 (WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION, 2023), .....	16
Figura 2: Diagrama de fase do dióxido de carbono. O ponto crítico, onde o CO <sub>2</sub> alcança o estado supercrítico, é a partir de 31,1°C e 73,8 bar (Adaptado de Voormeij e Simandl, 2016)(VOORMEIJ; SIMANDL, 2016).....	26
Figura 3: Diagrama do sistema de incubação das amostras a 100 bar e scCO <sub>2</sub> . .....	33
Figura 4: A: Foto dos 3 reatores utilizados com suas respectivas tampas desatarraxadas (em fluxo laminar); B: Foto do reator montado no trocador de calor e acoplado ao sistema de pressurização e controle de temperatura.....	39
Figura 5: Sistema de monitoramento de pressão e controle de temperatura com os reatores acoplados. ....	39
Figura 6: Foto do equipamento MALDI-TOF-TOF utilizado neste trabalho. ....	42
Figura 7: Foto do equipamento de espectroscopia Raman utilizado para este trabalho.....	43
Figura 8: Aspecto das colônias em TSA suplementado com 2% NaCl incubadas por 7 dias em atmosfera de 20% CO <sub>2</sub> a 36°C. A: G1; B: G2; C: G3; D: G4; E: G5; e F: G6. (O aspecto em ASW ágar se altera e sua diferenciação é dificultada).....	47
Figura 9: Fotos em magnitude de 50 vezes das colônias de G3 em diferentes diluições após inoculação em TSA suplementado com 2% NaCl. A: sem diluição (100); B: diluição 10-1; e C diluição 10-2.....	48
Figura 10: Fotos da morfologia das colônias de G5 em placa de ASW ágar em magnitude de 50 vezes. A: colônias com aspecto de gotas de orvalho de T0; B: colônias com aspecto de gotas de orvalho do controle; C: colônia com aspecto cristalino após incubação no reator (G5TF); D: comparação do tamanho das colônias com régua de G5TF (menor divisão corresponde a décimo de milímetro); E: foto com fundo preto de G5TF; F: foto de agrupamento de 5 colônias de G5TF.....	50
Figura 11: A: perfil de detecção das amostras submetidas ao equipamento. B: espectro obtido da detecção. ....	51
Figura 12: Fotos das amostras posicionadas no microscópio da espectroscopia Raman, magnitude de 100 vezes. A: Amostra T0; B: amostra controle; e C: amostra pós experimento. ....	52
Figura 13: Representação gráfica da análise PCA. Eixo horizontal representa a dimensão 1, entre parênteses a porcentagem de explicação; eixo vertical representa a dimensão 2, entre parênteses a porcentagem de explicação; a escala de cores à direita indica a qualidade de representação das variáveis e as amostras estão em forma de vetores indicando sua força na análise. Elipse indica posição da amostra da colônia em ASW ágar recuperada da incubação no reator (G5_agar100bar).....	53
Figura 14: Comparação dos espectros. Em preto, amostra G5 pós experimento e incubada em ASW ágar; em vermelho, espectro de tioacetato de potássio do banco de dados do programa. Eixo horizontal representa o comprimento de onda em cm <sup>-1</sup> e eixo vertical representa a intensidade.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fórmula do meio ASW base .....	31
Tabela 2: Fórmula da solução de elementos traço .....	31
Tabela 3: Identificação das amostras coletadas no Estreito de Brasfield (BENDIA et al., 2023; MARTINS et al., 2022). .....	34
Tabela 4: Identidade de cada amostra manipulada e peso em mg. (continua) .....	35
Tabela 5: Peso médio e desvio padrão (SD) de acordo com o ponto de coleta da amostra.....	45
Tabela 6: Contagem de células viáveis pré incubação (T0) a pressão atmosférica, 36°C e 20% CO <sub>2</sub> e contagem de células viáveis pós incubação (TF) a 100 bar, 36°C e CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	48
Tabela 7: Contagem de UFC por ml. Comparação da contagem de células viáveis entre pré incubação (T0) e pós incubação (TF) das triplicatas. ....	49

## Sumário

1. Introdução .....	15
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo principal.....	21
2.2. Objetivos secundários.....	21
3. Revisão da literatura.....	22
3.1. A crise climática .....	22
3.2. Petróleo e gás .....	23
3.3. Tecnologias de captura, uso e armazenamento de carbono.....	24
3.4. Microrganismos antárticos .....	25
3.5. Dióxido de carbono em estado supercrítico .....	26
3.6. MALDI – TOF .....	27
3.7. Espectroscopia Raman.....	28
3.8. Tratamento estatístico e identificação .....	28
4. Métodos.....	30
4.1. Verificação do sistema e procedimento .....	30
4.2. Coleta das amostras .....	33
4.3. Ativação e enriquecimento dos microrganismos.....	34
4.4. Seleção dos microrganismos .....	37
4.5. Incubação em condições extremas .....	38
4.6. MALDI – TOF .....	41
4.7. Espectroscopia Raman.....	43
4.8. Análise estatística .....	44
5. Resultados e discussão.....	45
5.1. Ativação e enriquecimento dos microrganismos.....	45
5.2. Seleção dos microrganismos .....	46
5.3. Incubação em condições extremas .....	47
5.4. MALDI – TOF .....	51
5.5. Espectroscopia Raman.....	52
5.6. Análise estatística .....	52
6. Conclusão.....	56
7. Referências .....	57

## 1. Introdução

Em anúncio do secretário geral das Nações Unidas, António Guterres em julho de 2023: “A era do aquecimento global chegou a seu término. A era da ebulição global chegou.”(United Nations, 2023, tradução nossa)

O efeito estufa, um fenômeno necessário para a manutenção da vida na Terra, em que certos gases da atmosfera evitam a perda de calor da superfície do planeta para o espaço, vem se intensificando de maneira a segurar mais calor na atmosfera que o clima como estávamos acostumados está se alterando, colocando em risco a biosfera atual. A causa da drástica intensificação nas últimas décadas do efeito estufa são as emissões antropogênicas dos principais gases envolvidos no fenômeno, o gás carbônico (CO<sub>2</sub>), o metano (CH<sub>4</sub>) e o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). (UNITED NATIONS, 2015)

O ano de 2023 foi o ano mais quente já registrado na história, os níveis de CO<sub>2</sub> estão 50 % mais altos que na era pré-industrial (considerado o período de 1850 a 1900), a taxa de aumento do nível do mar entre 2013 e 2022 é maior que o do dobro da taxa da primeira década do registo de satélite (1993-2002), acompanhamos um maior número e maior intensidade de incêndios, secas, enchentes e climas extremos. Temos desabrigados e deslocados por todo o globo devido ao calor excessivo, provocando em algumas áreas secas intensas noutras alagamentos, ou mesmo o calor em si, que torna a vida em certas regiões do planeta insalubres; os impactos socioeconômicos são



severos, causados por necessidade de deslocamento ou de adaptação às novas condições.(WMO, 2023)

Apesar de se constituírem indicativos de uma organização mundial para mitigar o aquecimento global, os acordos globais falharam em suas principais metas relacionadas à crise climática.

Os dados coletados até outubro de dois mil e vinte três, mostraram que tal ano terminará 1,4°C, com margem de erro de  $\pm 0,12^\circ\text{C}$ , acima da temperatura média global da era pré-industrial (1855 a 1900) tomada como base, como visto no gráfico (Figura 1).(WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION, 2023)

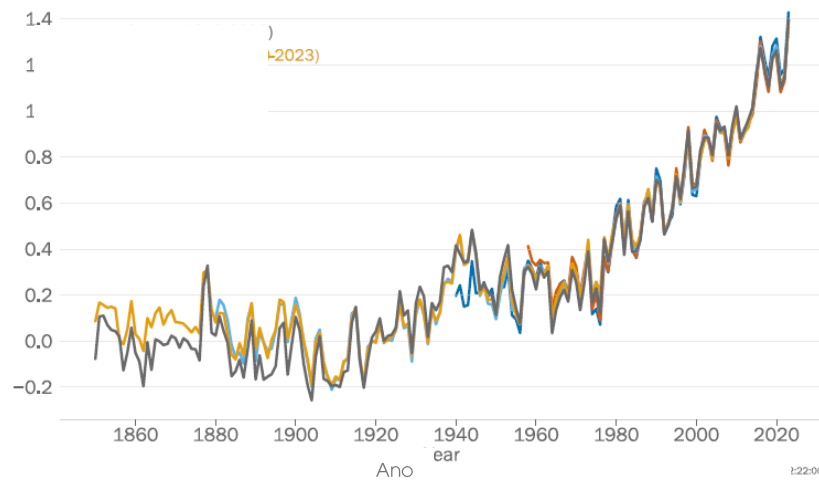


Figura 1: Gráfico adaptado do relatório da organização meteorológica mundial apresentando o escalar da temperatura média global anual comparada com a média de 1855 a 1900 (WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION, 2023).

O painel intergovernamental sobre mudanças climáticas, IPCC, em seu relatório resumido das mudanças climáticas, além de apresentar os dados relacionado às emissões, temperatura e clima, reafirma a responsabilidade humana no aumento de gases do efeito estufa, descreve outros danos relacionados à mudança climática como efeitos no bioma, colocando

espécies em risco de extinção e efeitos na agricultura, aumentando a pressão na segurança alimentar. Afirma ainda que as regiões do planeta que menos contribuíram para o aumento da emissão dos gases estufa e menos beneficiadas pelo progresso gerado são as regiões que mais sofrem as consequências dos eventos de clima extremo que já assolam o globo (CALVIN et al., 2023).

Não apenas deixamos de cumprir os acordos para diminuição das emissões dos gases do efeito estufa, fizemos o oposto, acelerando o aumento de suas emissões de tal forma que, mesmo que cessássemos suas emissões hoje, a crise climática já se instalou. Nesse dado cenário, mesmo que se consiga reduzir suas emissões, é necessário retirar os gases de efeito estufa da atmosfera, desenvolvendo tecnologias de captura e armazenamento desse carbono (CCS) (BUI et al., 2018; GIBBINS; CHALMERS, 2008).

Os combustíveis fósseis – carvão, gás e petróleo – constituem os maiores contribuintes para alteração climática global, responsáveis por mais de 75% das emissões de gases do efeito estufa e, aproximadamente, 90% se avaliarmos apenas a emissão de CO<sub>2</sub> total (CALVIN et al., 2023; NATIONS, 2015). É considerando essas emissões que se precisa desenvolver tecnologia de CCUS. O conceito de CCS, anterior ao de CCUS, foi tecnicamente desenvolvido nesse setor desde 1996. Em 2020, 39 Mt de CO<sub>2</sub> por ano era retirado da atmosfera pelas tecnologias de CCS, menos de 0,1% do total de ~ 45 Gt de CO<sub>2</sub> emitidos naquele ano (CALVIN et al., 2023; GARCIA FREITES).

Tecnologias de captura e armazenamento de carbono têm o potencial para atenderem os objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS)

9º e o 13º ODS que são, respectivamente, “Indústria, inovação e infraestrutura” e “Tomar medidas urgentes para combater a mudança climática e seus impactos” dentre os 17 ODS enumerados pela Organização das Nações Unidas em 2015 em sua proposta de plano de ação denominada “Agenda 2030” que lançou metas relacionadas ao combate à crise climática (CENTRO DE INFORMAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O BRASIL, 2015; UNITED NATIONS, 2015).

Na tese projeto aqui apresentada, prospectamos microrganismos-chave com potencial de nos auxiliar no combate à mudança climática, que consomem CO<sub>2</sub> da atmosfera sem a presença de luz, microrganismos quimioautótricos (THAKUR et al., 2018), para que se possa servir como plataforma para desenvolver tecnologia de captura e armazenamento de carbono. Organismos quimioautótrofos são mais propensos a serem encontrados em ambientes de baixa disponibilidade de carbono orgânico, como prospectados neste trabalho, em amostras do leito marinho coletadas próximo ao Estreito de Brainsfield do continente Antártico (DEMASTER et al., 1991; KELLY, 1981; PLETSCHE, 2021), selecionamos os quimioautótrofos por incubação em meio sem a presença de carbono orgânico (água marinha artificial – ASW) e sem a presença de luminosidade, após isoladas cepas de interesse, submetemos os microrganismos a incubação no mesmo meio líquido porém em condições mais extremas, sob 100 bar de pressão e CO<sub>2</sub> em estado supercrítico sem a presença de luz – condições similares às que encontramos nas jazidas de petróleo, para onde se deseja desenvolver essa tecnologia.

A Bacia de Bransfield é uma bacia submarina marginal de bacia retro arco alongada, orientada NE-SW, com até 130 km de largura e estendendo-se por mais de 500 km. A bacia é limitada pelas Ilhas Shetland do Sul em NW, pela Península Antártica em SE, pela Zona de Fratura de Shackleton em SW e Scotia Ridge em NE (GALINDO-ZALDÍVAR et al., 2004). Sua origem está relacionada a complexas interações geotectônicas de pequenas placas, zonas de fratura e centros de disseminação ativos e inativos e é amplamente interpretado como um mar marginal extensional associado com reversão de trincheira na Fossa Shetland do Sul (PRIETO et al., 1998). Evidências geológicas mostram que, no passado, o arco magmático das atuais Ilhas Shetlands do Sul fazia parte da Placa Antártica. A separação ocorreu devido a tensões extensionais geradas por causa da subducção passiva da Placa Fênix sob a Placa Antártica durante o Mesozóico. Essa extensão forçou a placa a se quebrar em uma estrutura de fenda. A bacia é muito assimétrica com o eixo central de disseminação, povoada por vários vulcões submarinos ativos, localizados muito mais perto das Ilhas Shetland do Sul. Além disso, a margem continental da Ilha Shetland do Sul é muito mais estreita (entre 6 e 15 km) e mais íngreme (até 24 °) do que a margem continental da península Antártica, que apresenta largura entre 75 k e 90 km, e gradientes máximos na ordem de 10 ° (GARCÍA et al., 2008).

A arquitetura sedimentar da bacia de Bransfield reflete a ciclicidade climática que controla o avanço e recuo contínuo das plataformas de gelo em ambos os lados da bacia, juntamente com fatores como a fisiografia das massas de terra, entrada de sedimentos, atividade vulcânica e o padrão oceanográfico (ANDERSON, 1999). Durante o Último Máximo Glacial (LGM),

entre vinte e dezoito mil anos atrás, a plataforma de gelo da Antártica avançou sobre a margem continental e a encosta superior, erodindo os sedimentos do fundo do mar até a profundidade de 750-900 m (YOON et al., 1998). Esses sedimentos erodidos foram depositados como bordas progressivas ao longo da encosta continental média e inferior.

Obtivemos sucesso em encontrar um microrganismo que se mantivesse viável sob dadas condições e observamos que formavam colônias de estrutura polimérica após serem recuperadas dos reatores sob alta pressão. A estrutura foi submetida à espectroscopia Raman para levantamento de moléculas candidatas.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo principal

Prospectar, isolar e enriquecer microrganismo oriundo de amostras de sedimentos marinhos antártico capaz de fixação de CO<sub>2</sub> em condição supercrítica a 100 bar de pressão, 36°C.

### 2.2. Objetivos secundários

- I) Identificação do microrganismo por MALDI-TOF;
- II) Identificação do metabólito principal produzido pelo organismo em condição de pressão de 100 bar com CO<sub>2</sub> supercrítico.

### 3. Revisão da literatura

#### 3.1. A crise climática

O ano de dois mil e vinte três foi o ano mais quente já registrado na história, os níveis de CO<sub>2</sub> estão 50 % mais altos que na era pré-industrial (considerado o período de 1850 a 1900), a taxa de aumento do nível do mar entre 2013 e 2022 é maior que o do dobro da taxa da primeira década do registro de satélite (1993-2002), acompanhamos um maior número e maior intensidade de incêndios, secas, enchentes e climas extremos. Temos desabrigados e deslocados por todo o globo, temos impactos socioeconômicos severos (WMO, 2023).

Apesar de se constituírem indicativos de uma organização mundial para mitigar o aquecimento global, os acordos globais falharam em suas principais metas relacionadas à crise climática (MASLIN; LANG; HARVEY, 2023).

A convenção de Nova Iorque, de 1992, reconhece a ação humana como principal causa das mudanças climáticas e trazia, como principal objetivo, fomentar a diminuição dos gases de efeito estufa (GEE). Traçava em linhas gerais quais tipos de práticas deveriam ser desenvolvidos, porém de forma bastante flexível, com a função de checagem do monitoramento dividido entre as partes e com uma fácil saída dessa convenção (UNITED NATIONS, 1992).

O Protocolo de Quioto, de 1998, que trazia como sua principal meta a diminuição das emissões de CO<sub>2</sub> mundial para os níveis de 1990 até 2008 a

2012 (UNITED NATIONS, 1998). Além de não indicar, por exemplo, quais sanções seriam imputadas em caso de desacordo com as metas estabelecidas, a construção do documento, princípios e diretrizes podem ser apontados como responsáveis por seu não cumprimento (RUGELEY; GERLACH, 2012).

O acordo de Paris, de 2015, já partia do princípio que já não se evitaria o aquecimento global, tendo como objetivo incentivar esforços para que o aumento médio de temperatura não ultrapassasse 1,5°C acima das temperaturas pré-industriais. Considerava também que a crise climática já era inevitável, traçando como segundo objetivo o incentivo ao aumento de resiliência e adaptação climática. E, constituindo o terceiro objetivo, incentivar o fluxo monetário para financiar caminhos para a baixa emissão de gases do efeito estufa e desenvolvimento de resiliência climática (UNFCCC, 2015).

Os dados coletados até outubro de 2023 mostram que tal ano terminará 1,4°C, com margem de erro de  $\pm 0,12^\circ\text{C}$ , acima da temperatura média global da era pré-industrial (1855 a 1900) tomada como base, como visto no gráfico apresentado pela organização mundial meteorológica (WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION, 2023).

### 3.2. Petróleo e gás

Os combustíveis fósseis – carvão, gás e petróleo – constituem os maiores contribuintes para alteração climática global, responsáveis por mais



de 75% das emissões de gases do efeito estufa e, aproximadamente, 90% se avaliarmos apenas a emissão de CO<sub>2</sub> total. (CALVIN et al., 2023; NATIONS, 2015).

Mesmo anteriormente ao destino como produto como, por exemplo, combustível veicular ou geração de energia, a própria exploração de petróleo e gás já emite grandes quantidades de CO<sub>2</sub> para resultado das turbinas a gás que geram energia para essa atividade (BLANCO, 2016).

Um dos procedimentos mais utilizados no mundo para deslocar o petróleo para fora da jazida é a injeção de água (recuperação secundária) ou CO<sub>2</sub> (recuperação terciária) assim mantendo a pressão interna da jazida (LIMEIRA et al., 2021).

### 3.3. Tecnologias de captura, uso e armazenamento de carbono

As tecnologias de captura e armazenamento de carbono (CCS) estão em diversos níveis de desenvolvimento, (BUI et al., 2018). O termo foi ligado previamente a processos físico-químicos baseados em separação, solubilização e compressão, para posterior armazenagem (GIBBINS; CHALMERS, 2008), ou queima controlada de biomassa para a produção de biochar, utilizando o produto obtido (SCHNEIDER, 2018), ou ainda capturando carbono biologicamente por fixação fotoautótrofa (SHAHRIAR RAHMAN; RAZIN AHMED; SALMAN QUAIYUM, 2012), fixação biológica quimiotrófica

(PLETSCH, 2021) e ainda tecnologias que acoplam geração de energia sustentável e captura de carbono (PEYERL; RELVA; DA SILVA, 2023).

Apesar de estarem muito aquém de equilibrar as emissões com a fixação de carbono, são essas tecnologias que possuem potencial para que a taxa de fixação seja maior que a taxa de emissão, ou seja, potencial para reversão do aquecimento global (BUI et al., 2018).

As jazidas de petróleo e gás ativas ou esgotadas podem receber CO<sub>2</sub> para armazenamento, constituindo uma solução já em uso e com viabilidade econômica (VOORMEIJ; SIMANDL, 2016).

### 3.4. Microrganismos antárticos

Mesmo apresentando condições extremas de clima e limitada oferta de nutrientes, o ambiente antártico revela um mosaico de habitats que hospeda uma diversidade microbiana desempenhando papel fundamental na cadeia alimentar e ciclos biogeoquímicos (BENDIA et al., 2023) .

Essa diversidade é dependente de onde as amostras são coletadas pois variam se vieram do continente, de geleiras ou de determinada profundidade em águas marinhas (BENDIA et al., 2023; BOWMAN, 2018; LIMA et al., 2022) .

### 3.5. Dióxido de carbono em estado supercrítico

O estado supercrítico da matéria se encontra acima do ponto de pressão e temperatura (Figura 2) onde as características das substâncias são intermediárias entre as de um gás e um líquido, um estado de fluido supercrítico. Especificamente para o dióxido de carbono, esse ponto corresponde a pressão de 73,8 bar e a temperatura de 31,1°C.

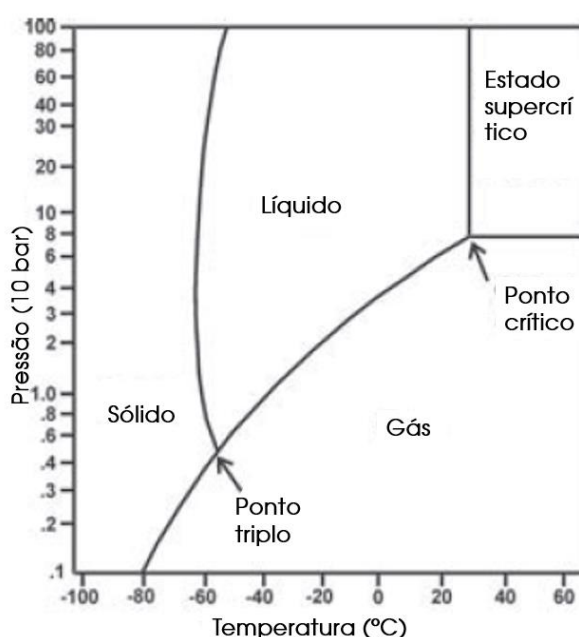


Figura 2: Diagrama de fase do dióxido de carbono. O ponto crítico, onde o CO<sub>2</sub> alcança o estado supercrítico, é a partir de 31,1°C e 73,8 bar (Adaptado de Voormeij e Simandl, 2016)(VOORMEIJ; SIMANDL, 2016).

O CO<sub>2</sub> em estado supercrítico apresenta propriedades bastante relevantes para o trabalho com sistemas vivos, neste caso microbiano em solução aquosa: i) sua forte propriedade solvente apolar (PEACH; EASTOE, 2014) e ii) sua solubilidade em sistema aquoso – que baixa o pH por formar ácido carbônico na água (ROCHELLE; MOORE, 2002). Devido sua natureza lipídica, a membrana celular tende a se romper com a presença de solvente apolar – tornando o sistema estéril (KUBRUSLY et al., 2000). Encontrar um

organismo que suporta estar imerso em dióxido de carbono em estado super crítico é um desafio necessário para a proposta deste estudo, uma vez que essa é uma das condições que o microrganismo será eventualmente exposto nas jazidas de petróleo.

### 3.6. MALDI – TOF

MALDI – TOF é a abreviação em inglês para “ionização por dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo” onde a amostra é aplicada junto a uma matriz que tem propriedade de absorver a energia de um laser em comprimento de onda na faixa ultravioleta e se vaporizar, ionizando e lançando parte da amostra numa câmara com sensores que vão identificar o padrão de “voo” da amostra por meio dos sensores do equipamento. Cada padrão de voo é reproduzível se utilizadas moléculas idênticas, logo, possui a propriedade similar a uma impressão digital. Comparadas as impressões digitais com o banco de dados, podemos identificar a amostra se o mesmo padrão se encontrar nos bancos de dados (MURRAY, 2012).

Tem como vantagem a rapidez no resultado, volume de amostra pequeno e operação simples.

Como desvantagem há a necessidade do isolamento do microrganismo a ser estudado, custo do equipamento e dependência do banco de dados – diferentemente do sequenciamento onde se é gerada a leitura genômica e, mesmo se o organismo não estiver em nenhum banco de

dados, é possível utilizar a sequência para estudo filogenético e identificar até certo taxon.

### 3.7. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman se baseia no espalhamento inelástico da fonte luminosa após interação com a estrutura eletrônica da molécula, fornecendo informação em forma de espectro onde o eixo vertical representa o comprimento de onda em  $\text{cm}^{-1}$  e o eixo horizontal a intensidade da luz espalhada (SCHLOTTER, 1988).

Tem sua aplicação para determinar estruturas e interações moleculares como em polímeros orgânicos e até mesmo materiais compostos apenas por carbono como o grafite e o grafeno (LI et al., 2023; SCHLOTTER, 1988).

### 3.8. Tratamento estatístico e identificação

As análises estatísticas constituem ferramentas poderosas para a extração de informação dos dados. Neste trabalho, os valores gerados na espectroscopia RAMAN foram tratados para encontrar os picos mais importantes estatisticamente e sua identificação.

A sequência de análises foi i) normalização, ii) análise dos componentes principais e iii) correlação de Pearson.

Normalização pelo método de mínimo e máximo: permite comparar matrizes de dados, nesse caso espectros, que estão em escalas diferentes. O método retorna valores entre 0 e 1 sem alterar a proporcionalidade dos pontos de cada espectro, facilitando a comparação entre os valores gerados nos espectros (SALLES, 2014).

Análise dos componentes principais: reduz a dimensionalidade do conjunto de dados que consiste num grande número de variáveis interrelacionadas, enquanto retém o máximo possível da variação presente nesse conjunto de dados – dessa forma explicando a maior parte da variabilidade do conjunto de dados com menos variáveis (SPRINGER, 2002). Neste trabalho foi utilizado para apontar os picos de maior importância estatística, apontando o metabólito principal.

Correlação de Pearson: verifica e informa a força de relação entre duas variáveis (correlação) resultando em um coeficiente que varia continuamente entre -1, correlação totalmente inversamente proporcional, a 1, correlação totalmente diretamente proporcional. Valores próximos de 0 são considerados como baixa correlação. Valores comumente considerados com forte correlação são maiores iguais a  $|0,70|$  (KREMELBERG, 2024). A correlação de Pearson foi utilizada para a identificação do metabólito principal.

## 4. Métodos

### 4.1. Verificação do sistema e procedimento

Tanto o sistema quanto o procedimento foram avaliados quanto sua estanqueidade e esterilidade na operação.

Os reatores de alta pressão foram construídos sob medida sendo constituídos de corpo com rosca e tampa com rosca complementar, ambos em aço inoxidável. A vedação entre o corpo do reator e sua tampa é auxiliada por anel de vedação. Acoplada a tampa há a entrada e a saída de gases, assim como o termopar. A entrada recebe o scCO<sub>2</sub> do equipamento marca “Teledine ISCO” modelo “O series” de compressão que envia e mantém o gás na pressão desejada. A saída é usada para despressurizar o sistema. A temperatura é controlada por arduíno que recebe informação do termopar e ativa/desativa a barra de aquecimento acoplada ao trocador de calor.

Os reatores, a tampa e o anel de vedação foram lavados com Extran®. O material foi enxaguado com água potável e água deionizada, nessa ordem.

Os corpos dos reatores foram embrulhados em saco termorresistente e submetidos a um ciclo de esterilização por calor úmido na autoclave de 121°C por 15 min. Após o ciclo, foi levado a estufa de secagem.

As tampas foram imersas em solução de etanol a 70 %.

Após um dia, a tampa seguiu para o fluxo laminar, foi retirada da solução de etanol e ficou sob luz ultravioleta para secar.

Foi transferido 3 ml de meio de cultura água marinha artificial (ASW), atarraxada a tampa ao corpo de cada reator com auxílio de chave inglesa e simulou-se a incubação.

As fórmulas do meio de cultura ASW base e de sua solução de elementos traço estão nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Fórmula do meio ASW base

reagente	g/l
<i>NaCl</i>	28,30
<i>KCl</i>	0,77
<i>MgCl<sub>2</sub> * 6H<sub>2</sub>O</i>	5,48
<i>MgSO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O</i>	7,39
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	1,11
<i>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub></i>	5,00
<i>NaNO<sub>3</sub></i>	1,8
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	0,5

Tabela 2: Fórmula da solução de elementos traço

reagente	g/l
<i>MnCl<sub>2</sub> * 4H<sub>2</sub>O</i>	0,18
<i>FeCl<sub>3</sub> * 6H<sub>2</sub>O</i>	3,15
<i>Na<sub>2</sub>EDTA * 2H<sub>2</sub>O</i>	4,36
<i>CuSO<sub>4</sub> * 5H<sub>2</sub>O</i>	9,80
<i>ZnSO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O</i>	22,00
<i>CoCl<sub>2</sub> * 6H<sub>2</sub>O</i>	10,00
<i>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> * 2 H<sub>2</sub>O</i>	6,30

A solução base é esterilizada por calor úmido em autoclave a 121°C por 15 min e a solução de elementos traço é esterilizada por filtração por membrana com porosidade de 0,22 µm. Após o resfriamento da solução base é adicionado solução de elementos traço na proporção de 2 ml de traço por litro de base.



O sistema operou por sete dias a 100 bar de pressão, 100% scCO<sub>2</sub> e 36°C, mesmas condições da incubação das amostras para verificação de possíveis vazamentos de CO<sub>2</sub> e eficiência no controle de temperatura.

A operação do sistema é descrita a seguir:

O reator é posicionado no trocador de calor, o termopar é conectado ao painel, a entrada e saída de CO<sub>2</sub> são acopladas ao sistema com ajuda de chave de boca número 8.

Com todas as válvulas fechadas, abrir a válvula (1) para admissão de CO<sub>2</sub> da linha (2); no console da bomba (3) selecionar "REFILL" para encher o cilindro (4); após o preenchimento, fechar válvula (1), aguardar 30 min e selecionar programa para 100 bar, pressão constante; abrir válvula (5) que envia o CO<sub>2</sub> pela válvula de fluxo unidirecional (6) para válvula de admissão do reator (7) que alimenta o reator (8). Abrir válvula de despressurização (9) para purgar a atmosfera por 30 segundos. Fechar a válvula (9) e ligar o aquecimento no painel (10) que ativa o trocador de calor (11). A temperatura é medida pelo termopar (12) acoplado ao painel (10) que controla a temperatura em 36°C ±1 ligando e desligando o trocador de calor (11) de acordo com a informação do termopar (12). O console da bomba (3) mantém automaticamente a pressão em 100 bar, porém há um manômetro (13) em redundância ligado à saída do reator, antes da válvula (9) para acompanhamento. As setas indicam o sentido do CO<sub>2</sub> (Figura 3).

Ao término da incubação, selecionar "STOP" no console (3), fechar válvula de admissão (7) e abrir válvula de despressurização (9). Aguardar

despressurização, desacoplar reator do sistema, levar ao fluxo laminar e desatarraxar a tampa com auxílio de chave inglesa.

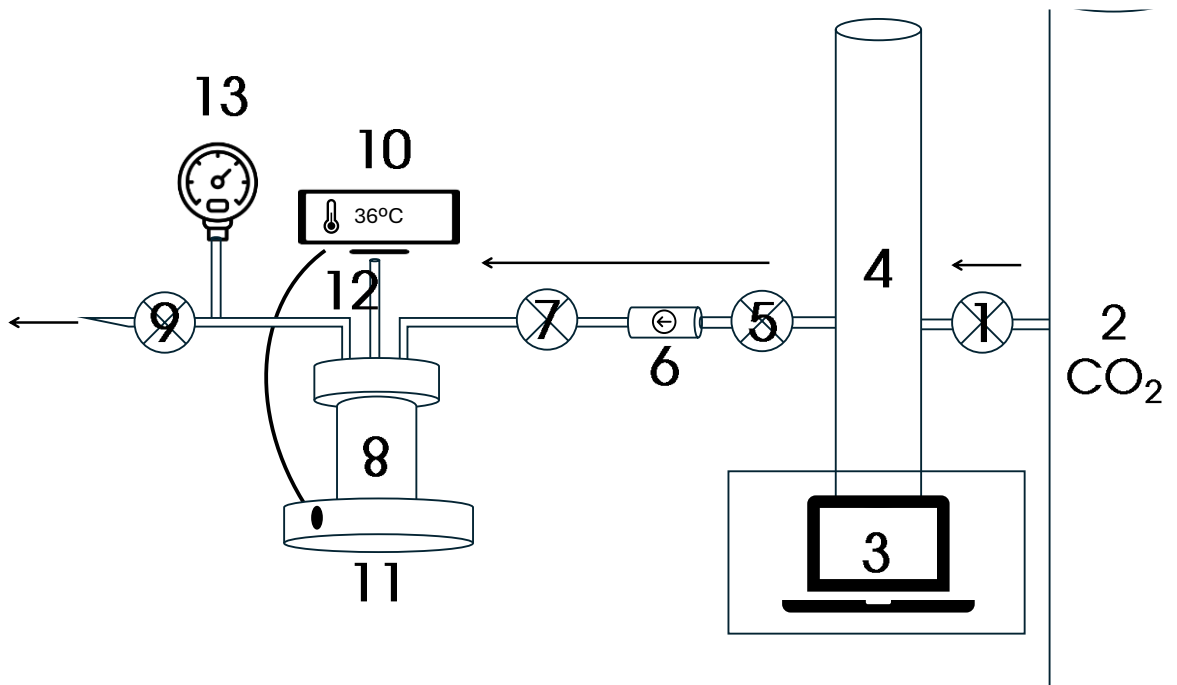


Figura 3: Diagrama do sistema de incubação das amostras a 100 bar e scCO<sub>2</sub>.

#### 4.2. Coleta das amostras

Foram recebidas e processadas 44 amostras de sedimento marinho de três pontos de amostragem próximos ao Estreito de Bransfield, Antártida coletadas nas expedições antárticas OPERANTAR XXXIV e OPERANTAR XXXV durante os verões de 2015 e 2016, respectivamente, conforme a tabela 3.

Tabela 3: Identificação das amostras coletadas no Estreito de Brasfield (BENDIA et al., 2023; MARTINS et al., 2022).

Fonte: BENDIA et al., 2023; MARTINS et al., 2022.

ID	Ambiente sedimentar	ID	Latitude	Longitude	Profundidade (m)
GC06A	Inclinação superior	GC06A	-58.3362	-63.1086	840
GC12	Plataforma	GC12	-59.3807	-62.5393	760
AM10	Base	AM10	-59.0015	-62.7545	1463

Cada conjunto de amostras foi fragmentada horizontalmente em 17 amostras para o ponto GC06A, 22 amostras para o ponto GC12 e 5 amostras para o ponto AM10 e liofilizadas anteriormente ao envio. As amostras foram então armazenadas em freezer - 20°C até manipulação.

### 4.3. Ativação e enriquecimento dos microrganismos

Foi retirada uma alíquota de cada amostra e transferida um microtubo estéril e tarado com ajuda de uma balança analítica até volume aproximado de 200 µl, obtendo o peso de cada amostra (Tabela 4).

Tabela 4: Identidade de cada amostra manipulada e peso em mg.

(continua)

ID	Peso (mg)
AM10-10	88.10
AM10-150	79.62
AM10-215	90.33
AM10-285	80.97
AM10-320	60.90
GC06-75 sec 2	52.95
GC06A-0 sec 4	104.35
GC06A-10 sec 3	84.27
GC06A-15 sec 2	41.57
GC06A-20 sec 4	79.36
GC06A-25 sec 1	40.54
GC06A-30 sec 3	85.25
GC06A-35 sec 2	45.23
GC06A-40 sec 3	46.69
GC06A-40 sec 4	33.27
GC06A-45 sec 1	55.80
GC06A-5 sec 1	36.11
GC06A-50 sec 3	34.57
GC06A-55 sec 2	38.35
GC06A-70 sec 3	52.52
GC06A-85 sec 1	48.04
GC06A-95 sec 2	50.92
GC12-10 sec 3	400.08
GC12-10 sec 4	412.62
GC12-15 sec 5	248.28
GC12-25 sec 1	303.54

Tabela 4 – Identidade de cada amostra manipulada e peso em mg (conclusão)

ID	Peso (mg)
GC12-25 sec 2	225.48
GC12-30 sec 3	214.98
GC12-30 sec 4	244.81
GC12-45 sec 1	136.97
GC12-45 sec 2	313.97
GC12-5 sec 1	250.23
GC12-5 sec 2	192.46
GC12-5 sec 5	258.27
GC12-50 sec 3	219.92
GC12-50 sec 4	147.18
GC12-65 sec 1	230.59
GC12-65 sec 2	389.53
GC12-70 sec 3	325.14
GC12-70 sec 4	156.86
GC12-85 sec 1	192.89
GC12-90 sec 3	314.65
GC12-90 sec 4	270.54
GC12-95	254.66

Fonte: Autoria própria.

Em condições de esterilidade, cada amostra foi transferida para tubo cônico de capacidade para 50 ml e suspendida em 30 ml de meio “água marinha artificial” (ASW) desprovido de qualquer fonte de carbono, orgânica ou inorgânica e incubadas em estufa com atmosfera de 20% CO<sub>2</sub>, 36°C, sem agitação, sem iluminação por 15 dias.

Para a diminuição da interferência dos nutrientes oriundos dos sedimentos da amostra original, após 15 dias, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 5 min, sobrenadante descartado e precipitado ressuspendido em novos 30 ml de ASW para nova incubação sob mesmas condições por 7 dias

#### 4.4. Seleção dos microrganismos

Uma alíquota de 100 µl de cada um das 44 amostras incubadas foi inoculada em meio triptona, soja, ágar suplementado com 2% de NaCl (TSA+NaCl): um meio sólido com fonte de carbono orgânico e pressão osmótica regulada para organismos marinhos. A incubação se deu nas mesmas condições anteriores por 7 dias.

Foram coletadas diferentes colônias e semeadas em 2 diferentes placas, de TSA+NaCl e ASW ágar e incubadas por 7 dias, seguindo mesmas condições.

Observou-se a olho nu e em lupa de aumento de 50 vezes, 6 morfologias distintas de colônias e esses foram denominados de G1, G2, G3, G4, G5 e G6.

#### 4.5. Incubação em condições extremas

Colônias G1, G2, G3, G4 e G5 foram inoculadas em 30 ml de ASW e incubadas em estufa com atmosfera de 20% CO<sub>2</sub>, 36°C, sem agitação, sem iluminação por 7 dias.

Após, foram centrifugadas a 8.000 rpm por 5 min, sobrenadante descartado e precipitado ressuspendido em novos 15 ml de ASW.

Foram separadas 3 alíquotas:

i) Uma de 3 ml foi transferido para o reator de inox para alta pressão a ser incubada a 100 bar de pressão, 100% scCO<sub>2</sub> e 36°C por 7 dias; (Figuras 4 e 5);

ii) Uma de 100 µL para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em TSA suplementado com 2% NaCl, essas amostras pré-inoculação em condições extremas foram denominadas amostras de tempo 0 (T0). Essa alíquota sofreu diluição seriada em 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup> e 10 µl de cada diluição foi inoculada em sua respectiva placa e incubada em estufa com atmosfera de 20% CO<sub>2</sub>, 36°C, sem iluminação por 7 dias. Após 7 dias contaram-se as UFC.; e

iii) Uma de 1,5 ml para posterior análise metabólica comparativa por espectroscopia RAMAN. Armazenada em -80°C.

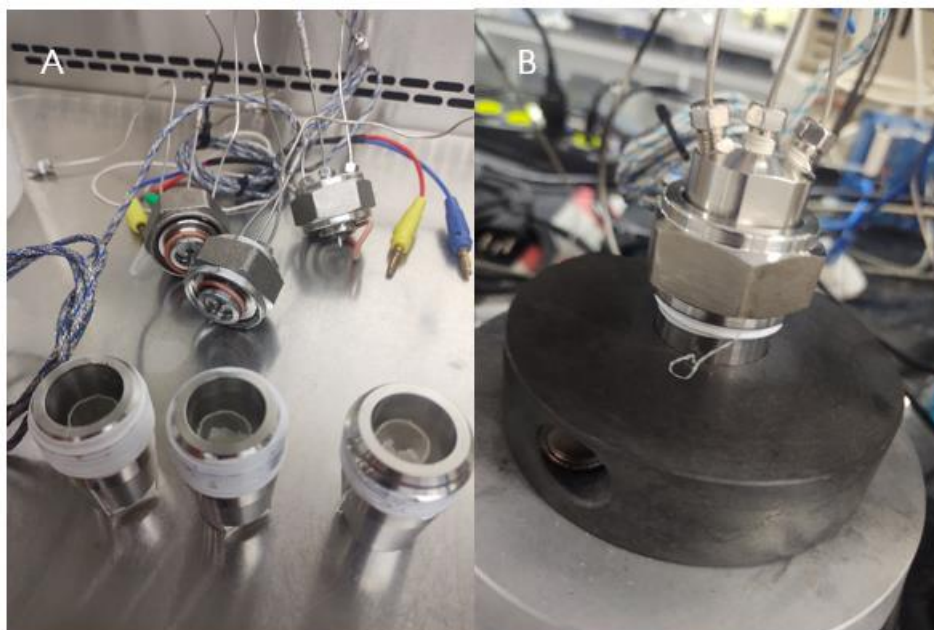


Figura 4: A: Foto dos 3 reatores utilizados com suas respectivas tampas desatarraxadas (em fluxo laminar); B: Foto do reator montado no trocador de calor e acoplado ao sistema de pressurização e controle de temperatura.

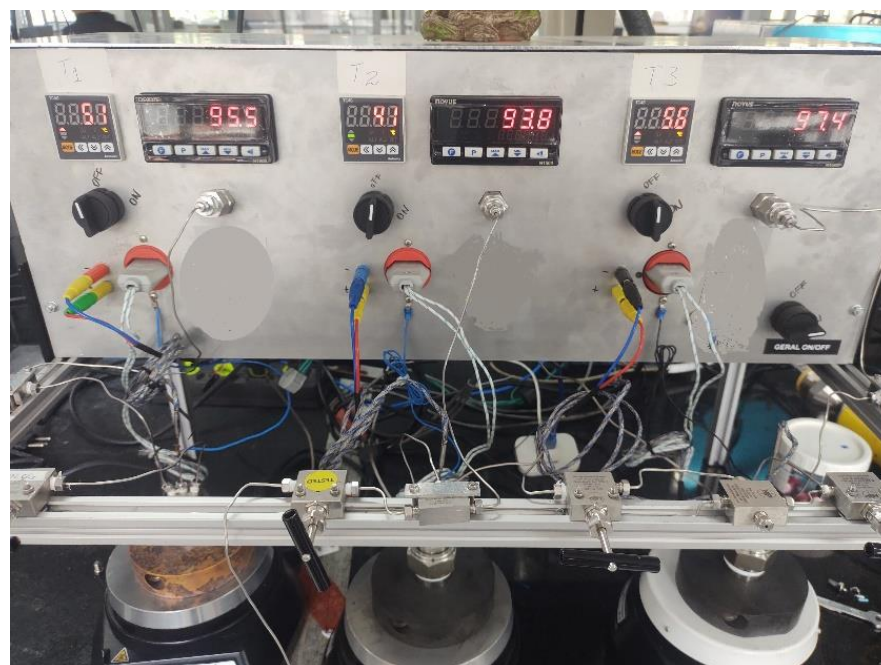


Figura 5: Sistema de monitoramento de pressão e controle de temperatura com os reatores acoplados.



Após a incubação, retiraram-se as amostras denominadas de tempo final (TF):

- i) Uma de 100  $\mu$ L para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em TSA suplementado com 2% NaCl; e
- ii) Uma de 1,5 ml para posterior análise comparativa. Armazenada em  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A alíquota para contagem de UFC sofreu diluição seriada em  $10^0$ ,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , 10  $\mu$ l de cada diluição foi inoculada em placa e incubada em estufa com atmosfera de 20%  $\text{CO}_2$ ,  $36^{\circ}\text{C}$ , sem iluminação por 7 dias. Após 7 dias procedeu-se a contagem de UFC.

Com a amostra que apresentou crescimento após a incubação em condições extremas, G5, procedemos a repetição em triplicata sob mesmas condições e tempo, retirando similarmente as amostras em T0 e TF para armazenagem e contagem de UFC. Incubamos também em triplicata, controles de 3 ml a pressão de 1 bar, atmosfera de 20%  $\text{CO}_2$ ,  $36^{\circ}\text{C}$ , sem iluminação, sem agitação.

As amostras foram identificadas como:

ASW\_agar: amostra do meio de cultura da placa de contagem de UFC;

G5\_T0agar: fragmentos das colônias da placa de contagem de UFC pré inoculação no reator;

G5\_agar100bar: fragmentos das colônias da placa de contagem de UFC após incubação no reator;

G5\_controle\_agar: fragmentos das colônias da placa de contagem de UFC de controle;

G5T0: meio ASW inoculado pré incubação no reator;

G5CTF I, II e III: triplicata do controle - meio ASW inoculado incubado a pressão de 1 bar; e

G5TF I, II e III: triplicata pós incubação no reator - meio ASW inoculado incubado a pressão de 100 bar.

#### 4.6. MALDI – TOF

G5 foi inoculado em 30 ml de meio líquido ASW e em meio sólido ASW ágar, ambos incubados a 20% CO<sub>2</sub>, 36°C, sem luminosidade.

O meio líquido foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, descartado o sobrenadante, lavado por 3 vezes com etanol 80% em ciclos de adição de etanol, agitação, centrifugação e descarte de sobrenadante, após a lavagem, procedeu-se a secagem por centrifugação sob vácuo, por 3 h, fez-se a extração das proteínas com ácido fórmico a 70%, sonicou-se 1 h, derivou-se por reação com acetronitrila e foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 min.

A matriz e o sobrenadante foram pipetados na placa de leitura do equipamento e esperou-se secar sob fluxo laminar.

Uma amostra da colônia do ASW ágar foi coletada com ajuda de palito estéril e passada na placa de leitura do equipamento. A matriz foi pipetada em cima e esperou-se secar sob fluxo laminar.

A placa de leitura foi inserida no equipamento e feito a leitura.

Equipamento marca "Bruker Daltonics", modelo "UltrafleXtreme" e software "Biotyper".

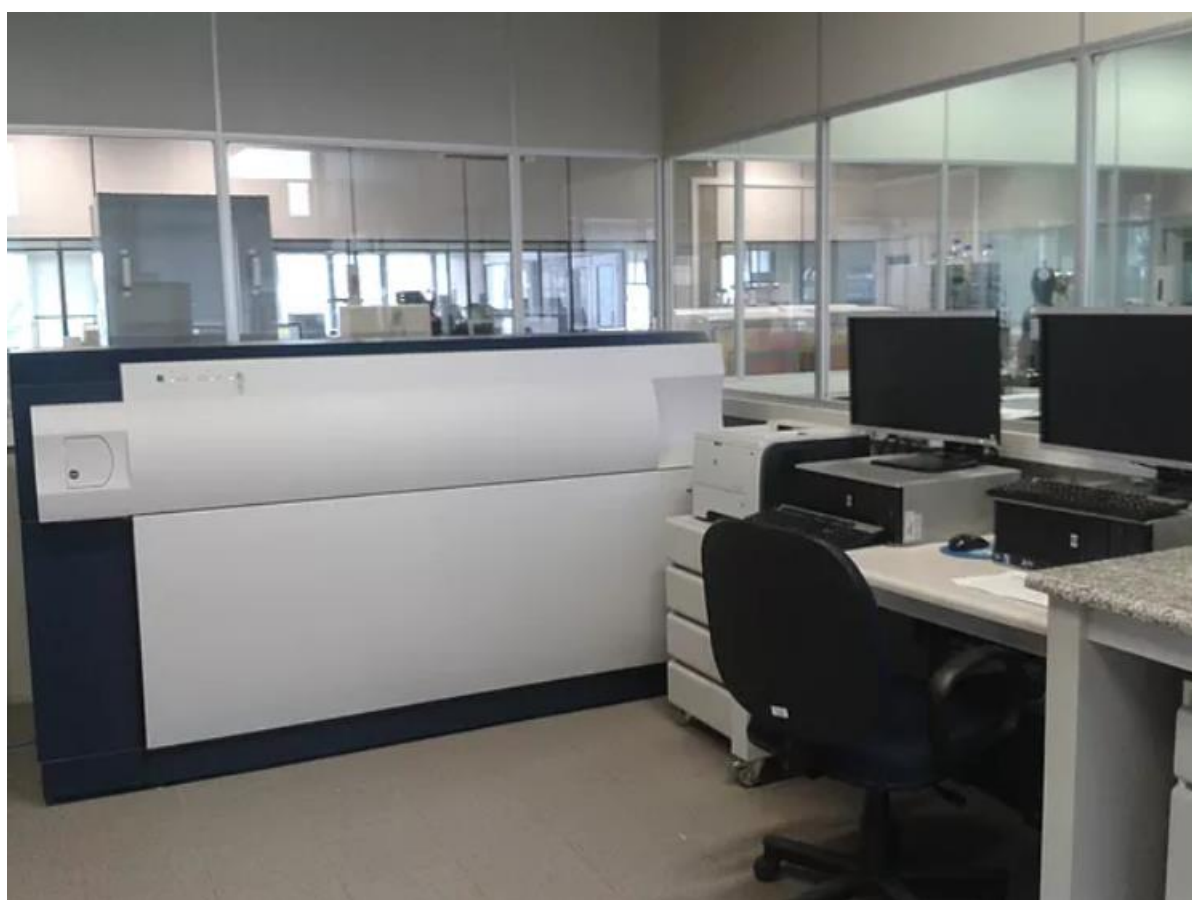


Figura 6: Foto do equipamento MALDI-TOF-TOF utilizado neste trabalho.

#### 4.7. Espectroscopia Raman

As amostras que estavam armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (G5T0, G5CTF I, II e III, G5TF I, II e III) foram submetidas a secagem em centrífuga sob vácuo (speed vac) por 6 h.

Fragmentos do material seco das amostras assim como material do meio de cultura ASW ágar e de colônias das placas de contagem de UFC (ASW\_agar, G5\_agar100bar e G5TF foram submetidas a análise por espectroscopia Raman a laser de comprimento de onda de 101 a 4002 nm, gerando arquivos com os dados de cada espectro.

Equipamento marca “Renishaw”, modelo “INVIA” e software “WIRE”.



Figura 7: Foto do equipamento de espectroscopia Raman utilizado para este trabalho.

#### 4.8. Análise estatística

Os arquivos gerados foram abertos em excel, as leituras agrupadas em um arquivo e preparados para serem lidos pelo programa R Project (R CORE TEAM, 2023).

No programa R foram carregados os pacotes `corr`, `ggcorrplot`, `FactoMineR` e `RamanMP` (RENNER et al., 2019).

Os espectros foram normalizados pelo método de min-max e os principais componentes calculados para comparação com a amostra recuperada da incubação a 100 bar, atmosfera 100% scCO<sub>2</sub> a 36°C.

O perfil do espectro da amostra pós-experimento foi comparada pelo método de correlação de Pearson ao banco de dados incluso no software "KnowItAll" (LABORATORIES; DIVISION, 2024).

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Ativação e enriquecimento dos microrganismos

Ao pesar as amostras, verificou-se uma variação nos pesos das amostras de sedimento antártico entre os pontos de coleta e entre as amostras do mesmo ponto de coleta (Tabela 5)

Tabela 5: Peso médio e desvio padrão (SD) de acordo com o ponto de coleta da amostra.

ID	Peso médio (mg)	SD
GC06A	54.69	±20.85
GC12	259.26	±77.33
AM10	79.98	±11.60

Fonte: A autoria própria.

A variação do peso média entre os pontos de coleta de amostras é devido a variação na composição do sedimento entre os pontos. O desvio padrão indica variação de composição dentro de um mesmo ponto de coleta e reflete o padrão de sedimentação temporal como estudado por Martins (MARTINS et al., 2022).

Das 44 amostras processadas, 15 delas tiveram microrganismos reativados nas condições dadas: AM10-10, AM10-150, GC06-75 sec 2, GC06A-15 sec 2, GC06A-35 sec 2, GC06A-55 sec 2, GC06A-70 sec 3, GC06A-85 sec 1, GC12-5 sec 1, GC12-45 sec 1, GC12-65 sec 1, GC12-25 sec 2, GC12-70 sec 3, GC12-90 sec 3, GC12-95.

## 5.2. Seleção dos microrganismos

Obtivemos 6 morfologias de colônias que denominamos de G1 a G6 (Figura 8):

- i) G1: apresenta aspecto liso, branco, uniforme. Isoladas das amostras AM10-10 e GC06-15 sec 2;
- ii) G2: apresentam aspecto rugoso, creme, irregular. Isoladas das amostras AM10-150, GC06-15 sec2 e GC12-5 sec3;
- iii) G3: colônias pequenas, transparentes. Isoladas das amostras GC06A-35 sec2, GC06A-45 sec1, GC06A-55 sec2, GC06A-70 sec3, GC06-75 sec2 e GC06A-85 sec1;
- iv) G4: apresentam aspecto liso, amarelo, uniforme. Isoladas das amostras GC12-5 sec1, GC06A-85 sec1 e GC12-90 sec3;
- v) G5: apresentam colônias multinucleadas, branca. Isoladas das amostras GC12-45 sec1, GC12-65 se1, GC12-25 sec2, GC12-70 sec3; e
- vi) G6: apresenta aspecto filamentososo como algodão, colônia grande, bege. Identificado como fungo (organismo quimioheterótrofo) e foi retirado de posteriores experimentos.

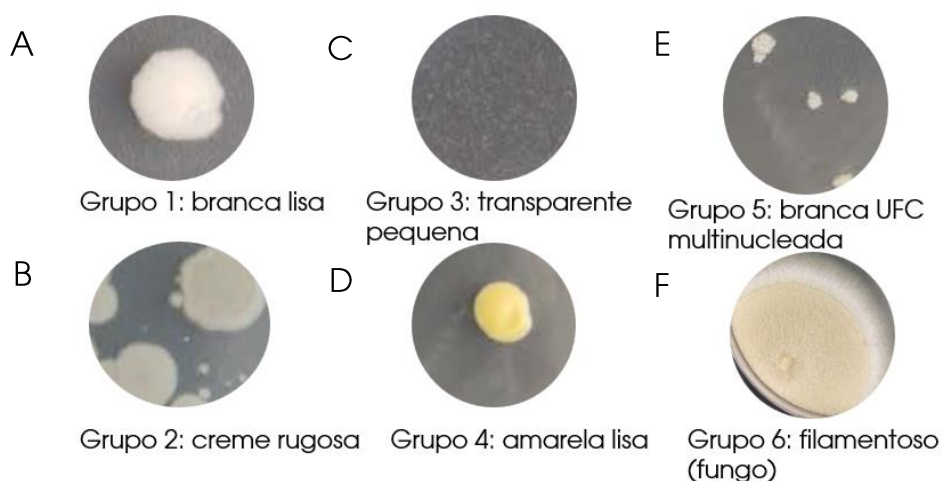


Figura 8: Aspecto das colônias em TSA suplementado com 2% NaCl incubadas por 7 dias em atmosfera de 20% CO<sub>2</sub> a 36°C. A: G1; B: G2; C: G3; D: G4; E: G5; e F: G6. (O aspecto em ASW ágar se altera e sua diferenciação é dificultada).

### 5.3. Incubação em condições extremas

Após a incubação de preparo dos grupos de 7 dias nas condições de atmosfera a 20% de CO<sub>2</sub>, a 36°C, observamos que o G4 não apresentou crescimento no T0, indicando que esse microrganismo necessita de carbono orgânico para seu metabolismo. Seu crescimento em etapas anteriores pode indicar a presença de carbono orgânico na amostra inicial em concentração suficiente. Com exceção do G4, todos apresentaram crescimento em T0, indicando que o reator foi inoculado com microrganismos viáveis. G3 apresentou a maior concentração de UFC nesta etapa (Figura 9).





Figura 9: Fotos em magnitude de 50 vezes das colônias de G3 em diferentes diluições após inoculação em TSA suplementado com 2% NaCl. A: sem diluição (100); B: diluição 10-1; e C diluição 10-2.

Após a incubação no reator, sob 100 bar de pressão, 36°C e 100% supCO<sub>2</sub>, G1 e G3 não apresentaram células viáveis, indicando que não suportam esse ambiente. G2 e G5 apresentaram células viáveis nessas condições, mantendo a ordem de grandeza de sua concentração inicial, indicando resistência ao tratamento (Tabela 6).

Tabela 6: Contagem de células viáveis pré incubação (T0) a pressão atmosférica, 36°C e 20% CO<sub>2</sub> e contagem de células viáveis pós incubação (TF) a 100 bar, 36°C e CO<sub>2</sub> supercrítico.

ID	Contagem T0 (UFC/mL)	Contagem TF (UFC/mL)
G1	$9.0 \times 10^2$	0
G2	$7.0 \times 10^2$	$7.0 \times 10^2$
G3	$1.3 \times 10^5$	0
G4	0	0
G5	$6.5 \times 10^2$	$9.0 \times 10^2$

Fonte: Autoria própria.

Verificando que G2 e G5 permanecem viáveis nessa etapa, procedeu-se o experimento em triplicata com seus respectivos controles nas mesmas condições a 100 bar e 100% atmosfera scCO<sub>2</sub> (Tabela 7).

Tabela 7: Contagem de UFC por ml. Comparação da contagem de células viáveis entre pré incubação (T0) e pós incubação (TF) das triplicatas.

ID	Contagem T0 (UFC/mL)	Contagem TF (UFC/mL)
G2	$2.8 \times 10^3$	0
	$2.8 \times 10^3$	0
	$2.8 \times 10^3$	0
G5	$7.5 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$
	$7.5 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$
	$7.5 \times 10^4$	$3.1 \times 10^4$

Fonte: Autoria própria.

Controles:

- i) G2 manteve-se estável em concentração de células de  $10^3$  por ml; e
- ii) G5 se multiplicou em 1 ordem de grandeza, de  $10^4$  para  $10^5$  células por ml.

Experimento:

- i) G2 não apresentou células viáveis após o experimento, não resistindo a segunda incubação; e
- ii) G5 manteve-se estável em concentração de células de  $10^4$  por ml.

Apenas G5 continuou com células viáveis após o experimento. Foram isoladas do mesmo ambiente sedimentar, plataforma (ponto de amostragem G12) a 760 m de profundidade, com baixo conteúdo biogênico e caracterizado como formação do tipo diamicton (KNIGHT, 2011; MARTINS et al., 2022).

Ainda mais notável, após a incubação a condições extremas, na contagem de UFC em placa de ASW ágar, G5 apresentou uma grande alteração na morfologia da colônia, aparência cristalina, enquanto as colônias recuperadas da pré-incubação e do controle mantiveram aspecto de gotas de orvalho (Figura 10).

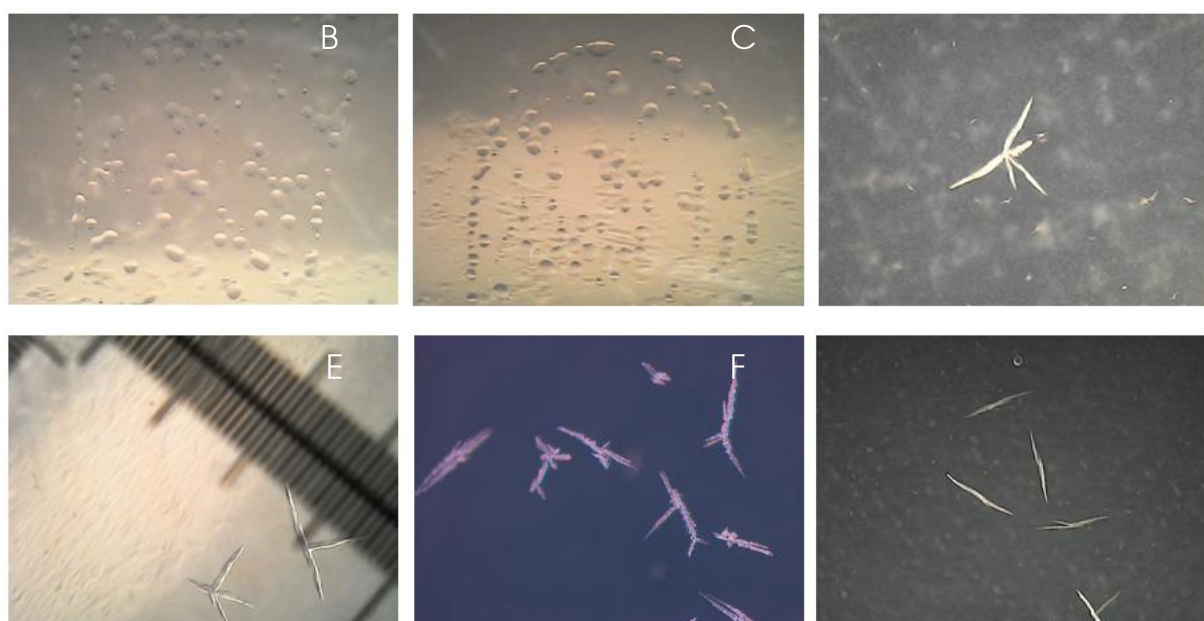


Figura 10: Fotos da morfologia das colônias de G5 em placa de ASW ágar em magnitude de 50 vezes. A: colônias com aspecto de gotas de orvalho de T0; B: colônias com aspecto de gotas de orvalho do controle; C: colônia com aspecto cristalino após incubação no reator (G5TF); D: comparação do tamanho das colônias com régua de G5TF (menor divisão corresponde a décimo de milímetro); E: foto com fundo preto de G5TF; F: foto de agrupamento de 5 colônias de G5TF.

As amostras coletadas de G5 procederam para as próximas etapas onde foram analisados os metabólitos produzidos.

#### 5.4. MALDI – TOF

As amostras analisadas produziram espectro, porém sua identificação não foi possível pois não havia representantes com boa correlação no banco de dados.

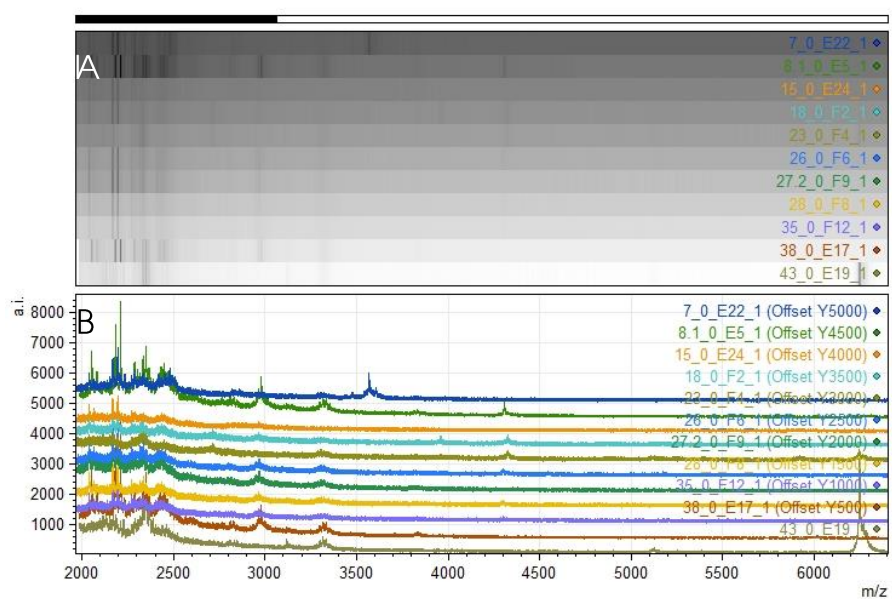


Figura 11: A: perfil de detecção das amostras submetidas ao equipamento. B: espectro obtido da detecção.

### 5.5. Espectroscopia Raman

Com a amostra posicionada no espectro, tiramos algumas fotos ilustrativas (Figura 12).

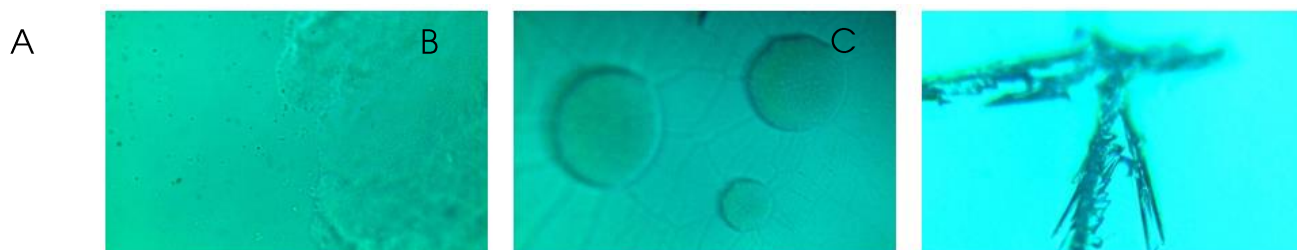


Figura 12: Fotos das amostras posicionadas no microscópio da espectroscopia Raman, magnitude de 100 vezes. A: Amostra T0; B: amostra controle; e C: amostra pós experimento.

Os espectros foram coletados e armazenados em arquivo para análise estatística.

### 5.6. Análise estatística

Verificamos que não apenas a morfologia da colônia se alterou após o experimento, seu perfil metabólico, como indicado na análise PCA no valores encontrados para os espectros RAMAN gerados (Figura 13).

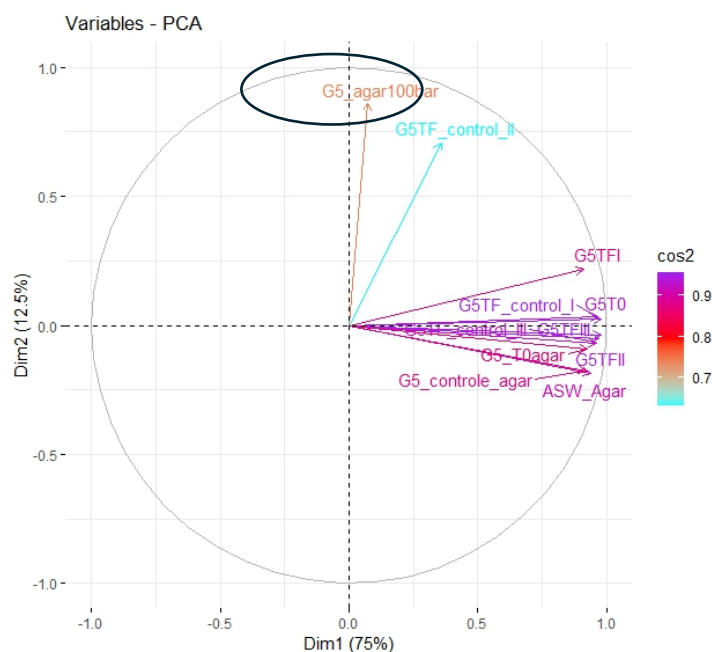


Figura 13: Representação gráfica da análise PCA. Eixo horizontal representa a dimensão 1, entre parênteses a porcentagem de explicação; eixo vertical representa a dimensão 2, entre parênteses a porcentagem de explicação; a escala de cores à direita indica a qualidade de representação das variáveis e as amostras estão em forma de vetores indicando sua força na análise. Elipse indica posição da amostra da colônia em ASW ágar recuperada da incubação no reator (G5\_agar100bar).

Com a indicação na diferença morfológica da colônia e distância em relação às outras amostras no PCA, procedeu-se a identificação do perfil químico por correlação com a base de dados do software “KnowItAll”(LABORATORIES; DIVISION, 2024) (Figura 14) (Anexo 1).

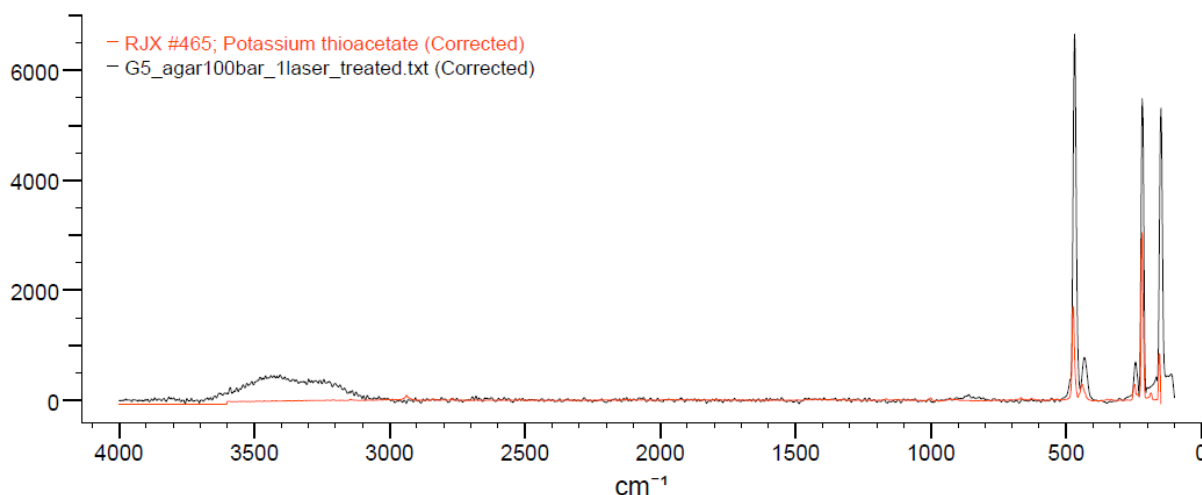


Figura 14: Comparação dos espectros. Em preto, amostra G5 pós experimento e incubada em ASW ágar; em vermelho, espectro de tioacetato de potássio do banco de dados do programa. Eixo horizontal representa o comprimento de onda em  $\text{cm}^{-1}$  e eixo vertical representa a intensidade.

O programa apontou tioacetato de potássio como o candidato possível mais próximo do perfil da amostra com uma correlação de 83,29 % entre os espectros.

O sistema foi preliminarmente avaliado quanto a sua esterilidade e funcionalidade preliminarmente ao início dos experimentos, a incubação procedeu com o meio ASW, temperatura e pressão idênticas ao experimento, sem a inoculação de qualquer amostra. Comprovou-se que o sistema estava estéril e funcional. Não foi observada a formação de artefatos na amostra nem crescimento ou aparecimento de cristais nas placas de ASW agar onde se avaliou a esterilidade.

Desta forma, o tioacetato necessariamente está relacionado a amostra G5 após sua incubação a 100 bar e atmosfera 100%  $\text{scCO}_2$ .

O acúmulo de tioacetato após condições extremas de incubação pode indicar a ativação de uma rota metabólica alternativa, viável em anaerobiose, derivada dos organismos que habitavam o planeta antes do grande evento de oxigenação (CANFIELD; ROSING; BJERRUM, 2006), com energia de ligação suficiente para promover biossíntese, fixando CO<sub>2</sub> (DUVE, 2002; STUBBS et al., 2020; WHICHER et al., 2018).



## 6. Conclusão

A solução para a crise climática, desencadeada pelo aquecimento global, passa necessariamente por políticas ambientais nacionais e transnacionais para implementar limites de emissão de GEE. No entanto, mesmo que se alcance o balanço completo de emissão e fixação dos GEE, o aquecimento global já se encontra em níveis alarmantes e não retrocederá senão com o desenvolvimento de tecnologias de captura de carbono.

Corroboramos com os estudos que indicam a antártica como fonte de microrganismos dotados de metabolismos e características ímpares que podem auxiliar tanto na elucidação das questões sobre a vida no planeta quanto no desenvolvimento de novas tecnologias.

Neste trabalho, obtivemos sucesso na prospecção de microrganismo marinho antártico adaptado a pressão osmótica marinha, quimioautótrofo capaz de fixar CO<sub>2</sub> em condição de alta pressão e atmosfera anóxica.

A bactéria aqui isolada tem o potencial para ser utilizada nas jazidas ativas ou desativadas de petróleo e gás consumindo o CO<sub>2</sub> da recuperação terciária ou ainda servir como plataforma para melhoramento genético ou fonte de genes de interesse para que se desenvolva uma (bio)tecnologia que some forças para combater a crise climática pelo sequestro de carbono (CCS).

## 7. Referências

- ANDERSON, J. **Antarctic Marine Geology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- BENDIA, A. G. et al. Insights into Antarctic microbiomes: diversity patterns for terrestrial and marine habitats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20211442, 2023.
- BLANCO, V. L. A. **Diagnóstico de emissões de gases de efeito estufa em plataformas FPSO**. Campinas: UNICAMP, 2016.
- BOWMAN, J. S. Identification of Microbial Dark Matter in Antarctic Environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 29 mar. 2018.
- BUI, M. et al. **Carbon capture and storage (CCS): The way forward**. **Energy and Environmental Science** Royal Society of Chemistry, , 1 maio 2018.
- CALVIN, K. et al. **IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland**. (P. Arias et al., Eds.). [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ipcc.ch/report/ar6/syr/>>.
- CANFIELD, D. E.; ROSING, M. T.; BJERRUM, C. **Early anaerobic metabolisms**. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. **Anais...**Royal Society, 29 out. 2006.
- CENTRO DE INFORMAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O BRASIL. **Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://sustainabledevelopment.un.org>>. Acesso em: 2 jan. 2024.
- DEMASTER, D. J. et al. The cycling and accumulation of biogenic silica and organic carbon in Antarctic deep-sea and continental margin environments. **Marine Chemistry**, v. 35, n. 1–4, p. 489–502, nov. 1991.
- DUVE, C. DE. **A RESEARCH PROPOSAL ON THE ORIGIN OF LIFE Closing Lecture given at the ISSOL Congress in**. [s.l: s.n.].
- GALINDO-ZALDÍVAR, J. et al. Tectonic development of the Bransfield Basin and its prolongation to the South Scotia Ridge, northern Antarctic Peninsula. **Marine Geology**, v. 206, n. 1–4, p. 267–282, 31 maio 2004.
- GARCIA FREITES, S.; JONES, C. **A Review of the Role of Fossil Fuel-Based Carbon Capture and Storage in the Energy System**. [s.l: s.n.].
- GARCÍA, M. et al. New insights on the post-rift seismic stratigraphic architecture and sedimentary evolution of the Antarctic Peninsula margin (Central Bransfield Basin). **Marine Geology**, v. 251, n. 3–4, p. 167–182, 6 jun. 2008.
- GIBBINS, J.; CHALMERS, H. Carbon capture and storage. **Energy Policy**, v. 36, n. 12, p. 4317–4322, dez. 2008.
- KELLY, D. P. Introduction to the Chemolithotrophic Bacteria. Em: [s.l: s.n.]. p. 997–998.
- KNIGHT, J. Uses and limitations of field mapping of lowland glaciated landscapes. Em: **Developments in Earth Surface Processes**. [s.l.] Elsevier B.V., 2011. v. 15p. 533–550.

- KREMELBERG, D. **Practical Statistics**. [s.l.] SAGE Publications, Inc., 2024.
- KUBRUSLY, F. S. et al. **A natural surfactant from pig lungs***Biotechnology Letters*. [s.l: s.n.].
- LABORATORIES, B.-R.; DIVISION, I. **KnowItAll® Vibrational Spectroscopy Edition KnowItAll® Informatics System**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.training.knowitall.com](http://www.training.knowitall.com)>.
- LI, Z. et al. **Raman spectroscopy of carbon materials and their composites: Graphene, nanotubes and fibres**. *Progress in Materials Science* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2023.
- LIMA, I. G. O. et al. Antarctic environments as a source of bacterial and fungal therapeutic enzymes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 94, 2022.
- LIMEIRA, V. et al. SIMULAÇÃO DA INJEÇÃO DE CO<sub>2</sub> COM ANÁLISE DA EFICIÊNCIA: APLICAÇÃO NO CAMPO DE LULA. out. 2021.
- MARTINS, M. D. S. et al. Geophysical investigation in sediment cores and its relationship with the governing sedimentary processes at Bransfield Basin, Antarctica. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 94, 2022.
- MASLIN, M. A.; LANG, J.; HARVEY, F. A short history of the successes and failures of the international climate change negotiations. *UCL Open Environment*, v. 5, 2023.
- MURRAY, P. R. **What Is new in clinical microbiology: microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: A paper from the 2011 William Beaumont Hospital symposium on molecular pathology**. *Journal of Molecular Diagnostics*, set. 2012.
- NATIONS, U. **Causes and Effects of Climate Change | United Nations**. Disponível em: <<https://www.un.org/en/climatechange/science/causes-effects-climate-change>>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- PEACH, J.; EASTOE, J. **Supercritical carbon dioxide: A solvent like no other**. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften, , 14 ago. 2014.
- PEYERL, D.; RELVA, S.; DA SILVA, V. **Energy Transition in Brazil**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2023.
- PLETSCH, H. **Helena\_tese**. [s.l: s.n.].
- PRIETO, M. J. et al. **Structure and geodynamic evolution of the Central Bransfield Basin (NW Antarctica) from seismic reflection data***Marine Geology*. [s.l: s.n.].
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Viena R Foundation for Statistical Computing, , 2023. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 2 jan. 2024
- RENNER, G. et al. **Data preprocessing & evaluation used in the microplastics identification process: A critical review & practical guide**. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* Elsevier B.V., , 1 fev. 2019.
- ROCHELLE, C. A.; MOORE, Y. A. **The solubility of supercritical CO<sub>2</sub> into pure water and synthetic Utsira porewater**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.thebgs.co.uk](http://www.thebgs.co.uk)>.
- SALLES, R. P. **Minmax Data Normalization Description**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://search.r-project.org/CRAN/refmans/TSPred/html/minmax.html>>.

SCHLOTTER, N. E. **RAMAN spectroscopy**. Red Bank: [s.n.].

SCHNEIDER, J. K. **UTILIZAÇÃO DE BIOMASSAS BRASILEIRAS PARA PRODUÇÃO DE CARVÃO ATIVADO DE ALTA QUALIDADE: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COMO ADSORVENTE**. [s.l.: s.n.].

SHAHRIAR RAHMAN; RAZIN AHMED; SALMAN QUAIYUM. **Proceedings of ICECE 2012 : venue, Pan Pacific Sonargaon Dhaka, Dhaka-1215, Bangladesh, 20-22 December 2012**. [s.l.] IEEE, 2012.

SPRINGER, I. T. J. **Principal Component Analysis, Second Edition**. [s.l.: s.n.].

STUBBS, R. T. et al. A plausible metal-free ancestral analogue of the Krebs cycle composed entirely of  $\alpha$ -ketoacids. **Nature Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 1016–1022, 1 nov. 2020.

THAKUR, I. S. et al. **Sequestration and utilization of carbon dioxide by chemical and biological methods for biofuels and biomaterials by chemoautotrophs: Opportunities and challenges**. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 maio 2018.

UNITED NATIONS. **Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**. [s.l.: s.n.].

UNITED NATIONS. **Hottest July ever signals 'era of global boiling has arrived' says UN chief**. Disponível em: <<https://news.un.org/en/story/2023/07/1139162>>. Acesso em: 6 jan. 2024.

VOORMEIJ, D.; SIMANDL, G. J. **Geological and Mineral CO<sub>2</sub> Sequestration Options: A Technical Review Geological and Mineral CO<sub>2</sub> Sequestration Options: A Technical Review**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/246314679>>.

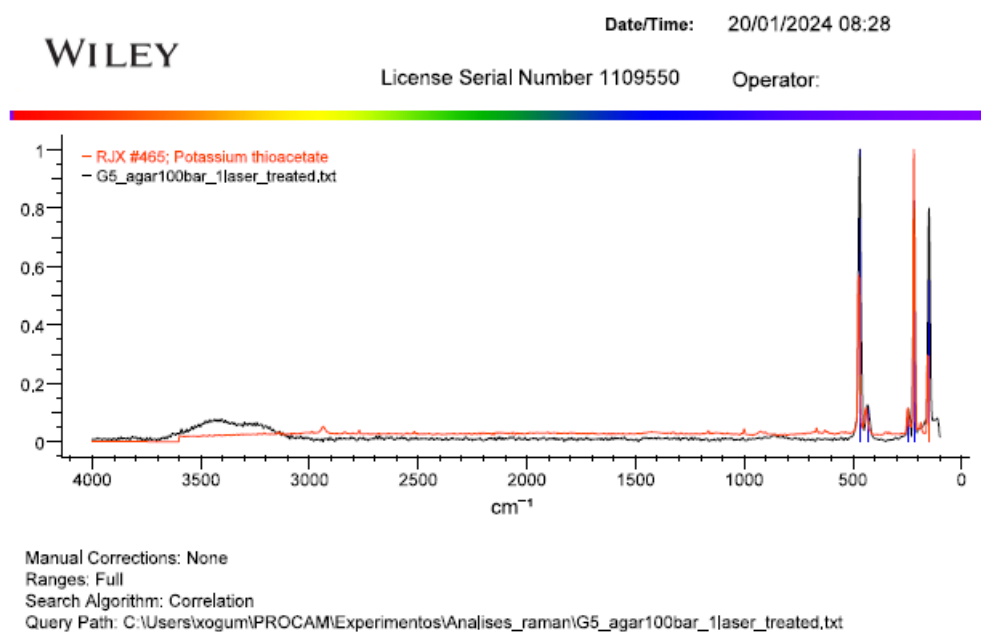
WHICHER, A. et al. Acetyl Phosphate as a Primordial Energy Currency at the Origin of Life. **Origins of Life and Evolution of Biospheres**, v. 48, n. 2, p. 159–179, 1 jun. 2018.

WMO, O. M. M. **2023 shatters climate records, with major impacts**.

WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. **Provisional State of the Global Climate 2023** **Nature Climate Change**. [s.l.] Nature Publishing Group, 25 ago. 2023.

YOON, H. I. et al. Distribution and dispersal pattern of suspended particulate matter in Maxwell Bay and its tributary, Marian Cove, in the South Shetland Islands, West Antarctica. **International Journal of Marine Geology, Geochemistry and Geophysics**, v. 152, p. 261–275, 1998.

## Anexo 1



G5\_agar100bar

Score	Info	Name	Spectrum	Chemical Structure
83,29		Potassium thioacetate		<chem>CH3COSK</chem>