

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS**

EGON PETERSOHN JUNIOR

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE CÉLULAS A COMBUSTÍVEL
MICROBIANAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2016**

EGON PETERSOHN JUNIOR

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE CÉLULAS A COMBUSTÍVEL
MICROBIANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Giselle Maria Maciel

CURITIBA
2016

EGON PETERSOHN JUNIOR

CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE CÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – PROF. DR. LUIZ MARCOS DE LIRA FARIA
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – PROF. DR^a. MARLENE SOARES
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientador – PROF. DR. GUSTAVO HENRIQUE COUTO
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Co-orientador – PROF. DR^a. GISELLE MARIA MACIEL
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenador de Curso – PROF. Me ALESSANDRO FEITOSA MACHADO

Curitiba, 24 de novembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor, por cada novo dia.

À Roberta, por cada momento.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química e Biologia (DAQBI), UTFPR, pois são eles que tornaram possível este trabalho. Em especial, gostaria de agradecer aos professores Doutor Gustavo Henrique Couto, Doutora Giselle Maria Maciel e à professora Doutora Marlene Soares pela dedicação, orientação e paciência neste projeto e ao longo de minha graduação; ao professor Doutor Luiz Marcos de Lira Faria, por sua ajuda e paciência; à professora Doutora Wanessa Algarte Ramsdorf, por sua dedicação e ajuda; à professora Doutora Larissa Kummer, pela paciência e ajuda; e a Andrew Fung, por seus conselhos e atenção.

Sinto ter deixado de mencionar muitos que mereciam ser lembrados, mas penso que seria inviável escrever todos os nomes aqui, neste espaço tão curto. Contudo, porém, com a compreensão de todos de que ninguém foi esquecido e que sempre estarão em minha mente.

RESUMO

PETERSOHN JUNIOR, Egon. Construção e avaliação de células a combustível microbianas. 2016. 64f. Trabalho de Conclusão (Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Curitiba. 2016.

Células a combustível microbianas (CCMs) são dispositivos que promovem a degradação da matéria orgânica por meio de microrganismos, com produção concomitante de energia elétrica, apresentando-se como uma tecnologia autossustentável. Possui potencial utilização, por exemplo, no tratamento de águas residuárias para a recuperação de energia elétrica, em biossensores ou ainda na construção de dispositivos eletrônicos autossustentáveis. Com o entendimento dos mecanismos que relacionam o metabolismo microbiano e a geração de eletricidade, pesquisas recentes estão voltadas para otimizar o desempenho e a eficiência das CCMs. O presente trabalho teve por objetivo construir CCMs de três arquiteturas diferentes e avaliar o funcionamento das mesmas, utilizando em separado as bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, operadas com meio M9. Foram confeccionadas CCMs de duas câmaras com eletrodos de grafite e membrana Nafion, sendo duas em sistema de batelada com volumes de 90 mL e 350 mL, e uma de alimentação intermitente com volume de 350 mL. No estudo foi avaliado o efeito da oxidação nas terminações dos fios de cobre conectados ao eletrodo de grafite; o efeito do uso do mediador azul de metileno; e o funcionamento de CCMs com alimentação intermitente. O pico de geração de diferença de potencial foi de 325 mV e 10 mV para eletrodos com e sem oxidação, respectivamente. A utilização de mediador promoveu um acréscimo aproximado de 250% na geração de diferença de potencial. E as CCMs em alimentação intermitente apresentaram estabilidade de geração de diferença de potencial e consumo de glicose.

Palavras-chave: Azul de metileno. Oxidação do cobre. *Bacillus subtilis*. *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

PETERSOHN JUNIOR, Egon. Construction and evaluation of microbial fuel cells. 2016. 64f. Trabalho de Conclusão (Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Curitiba. 2016.

Microbial fuel cells (MFCs) are devices that promote the degradation of organic matter by means of microorganisms, with concomitant production of electric energy, presenting itself as a self-sustaining technology. It has potential use, for example, in the treatment of wastewater for the recovery of electric energy, in biosensors or in the construction of self-sustaining electronic devices. With the understanding of the mechanisms that relate the microbial metabolism and the generation of electricity, recent research focuses on optimizing the performance and efficiency of MFCs. The objective of the present work was to construct MFCs from three different architectures and to evaluate their operation using the *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* separately, operated with M9 medium. Were made two-chamber MFCs with graphite electrodes and Nafion membrane, being two in a batch system with volumes of 90 mL and 350 mL, and an intermittent feed system with a volume of 350 mL. In the study, the effect of oxidation was evaluated on the terminations of the copper wires connected to the graphite electrode; the effect of the use of the methylene blue mediator; and the operation of MFCs with intermittent power. The potential difference generation peak was 325mV and 10mV for electrodes with and without oxidation, respectively. The use of mediator promoted an approximate increase of 250% in the generation of potential difference. And MFCs in intermittent feeding presented stability of potential difference generation and glucose consumption.

Keywords: Methylene blue. Oxidation of copper. *Bacillus subtilis*. *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DOS COMPONENTES BÁSICOS DE UMA CÉLULA A COMBUSTÍVEL.....	16
FIGURA 2 - FOTOGRAFIAS DE MATERIAIS DE CARBONO USADOS PARA ÂNODOS DE CCMs: (A) PAPEL CARBONO (E-TEK); (B) TECIDO DE CARBONO (E-TEK); (C) TRÊS DIFERENTES TIPOS DE CARBONO VÍTREO RETICULADO (RVC) COM DIFERENTES TAMANHOS DE POROS (10, 20 E 45 POROS POR POLEGADA).....	18
FIGURA 3 - ESTRUTURA BÁSICA DA MEMBRANA TROCADORA DE PRÓTONS NAFION.....	19
FIGURA 4 - TÍPICA CCM DE DUAS CÂMARAS	20
FIGURA 5 - (A) ESQUEMÁTICO DA CCM; (B) PROTÓTIPO DE UMA CCM DE UMA CÂMARA EM ESCALA DE LABORATÓRIO USADA PARA GERAR ELETRICIDADE A PARTIR DE ESGOTO E GLICOSE.....	21
FIGURA 6 - PROPOSTA DE MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS DIRETA POR MEIO DE CITOCROMOS DA MEMBRANA EXTERNA.....	24
FIGURA 7 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA SIMPLIFICADA DA TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS MEDIADA.....	24
FIGURA 8 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BACILLUS SUBTILIS.....	28
FIGURA 9 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	29
FIGURA 10 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA CCM DE 350 ML EM SISTEMA DE BATELADA.....	31
FIGURA 11 - CCMS EM SISTEMA DE ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE DE 350 ML EM OPERAÇÃO.....	32
FIGURA 12 - CCM DE 90mL A: CCM EM VISTA EXPLODIDA; B: CCM MONTADA E EM OPERAÇÃO; C: DESENHO ESQUEMÁTICO DA CCM.....	33
FIGURA 13 - OXIDAÇÃO DOS JACARÉS DE FIXAÇÃO DOS ELETRODOS.....	38
FIGURA 14 - ELETRODOS COM OS FIOS DE COBRE ISOLADOS COM TINTA CONDUTIVA, SEM A PRESENÇA DE OXIDAÇÃO.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - GERAÇÃO DE DPE POR CCMS INOCULADAS COM <i>B. SUBTILIS</i> COM E SEM OXIDAÇÃO DO FIO CONDUTOR (EIXO PRINCIPAL: COM OXIDAÇÃO DO FIO CONDUTOR; EIXO SECUNDÁRIO: SEM OXIDAÇÃO DO FIO CONDUTOR).	40
GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DE DPE GERADA POR CCMS COM E SEM A PRESENÇA DO MEDIADOR AZUL DE METILENO. AS FLECHAS NO GRÁFICO INDICAM OS PONTOS DE INJEÇÃO DE GLICOSE E MEDIADOR.....	42
GRÁFICO 3 - TESTE DE ESTABILIDADE DE RESPOSTA. AS FLECHAS MARCAM OS PONTOS DE INJEÇÃO DE GLICOSE.....	43
GRÁFICO 4 - GERAÇÃO DE DIFERENÇA DE POTENCIAL ELÉTRICO POR CCM DE ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE, INOCULADAS COM <i>B. SUBTILIS</i>	44
GRÁFICO 5 - GERAÇÃO DE DIFERENÇA DE POTENCIAL ELÉTRICO POR CCM DE ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE, INOCULADAS COM <i>P. AERUGINOSA</i>	45
GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DE GERAÇÃO DE DPE ENTRE CCMS INOCULADAS COM <i>P. AERUGINOSA</i> E COM <i>B. SUBTILIS</i>	46
GRÁFICO 7 - CURVA DE POLARIZAÇÃO SEM A PRESENÇA DE MEDIADOR, PLOTADA TENSÃO E POTÊNCIA VERSUS CORRENTE	47
GRÁFICO 8 - CURVA DE POLARIZAÇÃO COM O USO DE MEDIADOR, PLOTADA TENSÃO E POTÊNCIA VERSUS CORRENTE	48
GRÁFICO 9 - CURVA DE POLARIZAÇÃO COM O USO DE MEDIADOR, PLOTADA TENSÃO E POTÊNCIA VERSUS RESISTÊNCIA.	48
GRÁFICO 10 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ANÁLISE DE AÇUCARES REDUTORES.....	49
GRÁFICO 11 - GERAÇÃO DE DPE VERSUS CONSUMO DE GLICOSE, POR CCMS INOCULADAS POR <i>B. SUBTILIS</i> . LINHA TRACEJADA MARCA O INÍCIO DA ALIMENTAÇÃO DA CCM.....	50
GRÁFICO 12 - GERAÇÃO DE DPE VERSUS CONSUMO DE GLICOSE, POR CCMS INOCULADAS COM <i>P. AERUGINOSA</i> . A INTERRUPÇÃO DE DPE SÃO DADOS PERDIDOS. LINHA TRACEJADA MARCA O INÍCIO DA ALIMENTAÇÃO DA CCM.	51

GRÁFICO 13 - ACOMPANHAMENTO DO PH DAS CCMS AO LONGO DO TEMPO DO ITEM 6.1.1.	52
GRÁFICO 14 - ACOMPANHAMENTO DO PH DAS CCMS INOCULADAS COM <i>B. SUBTILIS</i> AO LONGO DO TEMPO DO ITEM 6.1.3.	53
GRÁFICO 15 - ACOMPANHAMENTO DO PH DAS CCMS INOCULADAS COM <i>P. AERUGINOSA</i> AO LONGO DO TEMPO DO ITEM 6.1.3.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

CCM	Célula a Combustível Microbiana
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DPE	Diferença de Potencial Elétrico
MTP	Membrana Trocadora de Prótons
TDE	Transferência Direta de Elétrons
TEM	Transferência de Elétrons Mediada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4 REVISÃO DA LITERATURA	15
4.1 CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA	15
4.1.1 Componentes de uma CCM	17
4.1.2 Tipos de Células Combustíveis Microbianas (CCMs)	19
4.1.2.1 CCM de Duas Câmaras.....	19
4.1.2.2 CCM de Uma Câmara	20
4.1.3 Aplicações de CCMs	21
4.2 MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS	22
4.2.1 Transferência Direta de Elétrons (TDE)	23
4.2.2 Transferência de Elétrons Mediada (TEM)	24
4.3 DESEMPENHO ELÉTRICO DAS CCMs	25
4.3.1 Geração de Tensão	25
4.3.2 Geração de Potência	26
4.4 MICRORGANISMO	27
4.4.1 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	27
4.6.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PSPA7_5686.....	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1 MICRORGANISMOS.....	30
5.1.1 Inóculo.....	30
5.2 CONFECÇÃO DAS CCMs.....	31
5.3 OPERAÇÃO DAS CCMs	34
5.3.1 CCMs em Batelada de 350mL e 90mL	34
5.3.2 CCMs em Alimentação Intermitente de 350mL.....	34
5.3.3 Curva de Polarização	35
5.3.4 Monitoramento da CCM.....	36
5.3.4.1 Diferença de Potencial Elétrico (DPE)	36
5.4.3.2 pH.....	36
5.4.3.3 Análise de Açúcares Redutores.....	36
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1 OPERAÇÃO DAS CCMs	38

6.1.1 Comparação Entre CCMs de 350mL Operadas em Batelada Com e Sem Oxidação dos Terminais de fixação dos Eletrodos, Inoculadas com <i>B. subtilis</i>	38
6.1.2 Comparação Entre CCMs de 90mL Operadas em Batelada Com e Sem Mediador de Elétrons, Inoculadas Com <i>B. Subtilis</i>	41
6.1.3 CCMs Em Alimentação Intermitente	44
6.2 Curvas de Polarização.....	46
6.3 ANÁLISE DE AÇUCARES REDUTORES	49
6.3.1 Curva de Calibração.....	49
6.3.2 Análise de Açucares Redutores das CCMs em Sistema de Alimentação Intermitente.....	50
6.4 MONITORAMENTO DO PH	52
7 CONCLUSÕES	55
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Com uma população mundial em expansão, que demanda cada vez mais energia e gera resíduos de maneira crescente, a sustentabilidade não é uma palavra da moda utilizada pelos “politicamente corretos”, mas uma necessidade que se impõe, caso a humanidade se preocupe com o seu próprio futuro. Para se alcançar a sustentabilidade, as condições mais urgentes a serem cumpridas é a redução da dependência de combustíveis fósseis –os quais são altamente poluentes e finitos –e a diminuição significativa da poluição gerada. Em razão de células a combustível microbianas (CCMs) converterem um substrato diretamente em eletricidade, ao contrário de outras tecnologias, esse dispositivo vem sendo foco de grande interesse de pesquisadores (MAHENDRA; MAHAVARKAR, 2013).

CCMs são dispositivos que utilizam microrganismos para catalisar a oxidação de matéria orgânica e inorgânica ao mesmo tempo em que produz energia elétrica (LOGAN et al., 2006). Tipicamente uma CCM é formada de duas câmaras, uma anaeróbia e outra aeróbia. Na câmara anaeróbia é onde ocorre a degradação da matéria orgânica, gerando elétrons, prótons e CO₂. Os elétrons são capturados pelo ânodo e transferidos, por meio de um circuito externo, até o cátodo, ao mesmo tempo em que os prótons migrarão, por meio de uma membrana trocadora de prótons, do ânodo até o cátodo, combinando-se, então, com os elétrons e um católito (geralmente oxigênio), promovendo a sua redução na superfície do cátodo e ocasionando uma diferença de potencial elétrico (DPE) (KHALEDA; ONDELB; ALLARD, 2016).

CCMs possuem potencial aplicação em diversas áreas tais como: sensoriamento ambiental, geração de energia elétrica em áreas remotas, tratamento de efluentes com a cogeração de energia elétrica, dentre outros. Com o entendimento dos mecanismos que relacionam o metabolismo microbiano com a geração de eletricidade, pesquisas recentes têm grande interesse na otimização do desempenho e eficiência das CCMs.

Deste modo, este trabalho tem por objetivo desenvolver CCMs de três arquiteturas diferentes e avaliar o seu funcionamento, como uma contribuição ao estudo e desenvolvimento de tecnologias alternativas de produção de energia.

2 JUSTIFICATIVA

Na atualidade, grandes desafios ambientais se apresentam. Os dois mais urgentes que exigem respostas são: desenvolver fontes limpas e renováveis de energia que atendam à uma população crescente e garantir água potável a todos.

Uma tecnologia que vem sendo estudada e desenvolvida e que pode responder a ambas as questões é a CCM, dispositivo que degrada a matéria orgânica e produz diferença de potencial elétrico concomitantemente. Assim, o presente trabalho se justifica como uma contribuição para o entendimento e otimização dessa tecnologia visando o melhor aproveitamento energético da CCM.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Construir células a combustível microbianas (CCMs) de duas câmaras e monitorar o desempenho das mesmas utilizando as bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir CCMs de duas câmaras, utilizando eletrodos de grafite e membrana trocadora de prótons do tipo Nafion;
- Construir CCMs de dois volumes diferentes;
- Construir CCMs com operação em batelada e alimentação intermitente;
- Avaliar o desempenho das CCMs quanto às bactérias utilizadas e os regimes de funcionamento;
- Realizar curva de polarização.

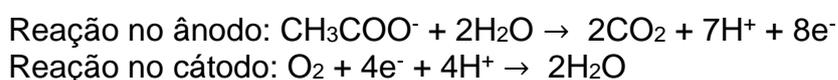
4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 CÉLULA COMBUSTÍVEL MICROBIANA

O primeiro trabalho a reportar a geração de energia elétrica a partir da atividade microbiana sobre um substrato foi realizado em 1911 por Potter, com o uso de culturas de *Escherichia coli* ou *Saccharomyces* sp. e eletrodos de platina (LEWIS, 1966; IEROPOULOS et al., 2005). Porém, foi só após a década de 1960 que esta capacidade microbiana passou a ser objeto de importância no meio científico, vindo a aumentar significativamente o interesse e o número de trabalhos a partir de 1990 (LOGAN, 2008), sendo hoje vista como uma tecnologia promissora de tratamento de águas residuárias e geração sustentável de bioeletricidade.

Uma CCM pode ser definida como um dispositivo que utiliza microrganismos como catalisadores para transformar a energia contida nas ligações químicas dos compostos orgânicos em energia elétrica (LOGAN, 2008). Na figura 1, é apresentado um esquema simplificado de uma CCM típica, onde se pode observar, de uma maneira geral, o seu funcionamento. Este dispositivo é composto de duas câmaras, uma anódica e outra catódica, separadas por uma membrana trocadora de prótons. A câmara do ânodo é mantida em condições de anaerobiose, ao passo que a câmara catódica tem o seu meio aerado ou o cátodo pode ser exposto ao ar (TEKLE; DEMEKE, 2015). Na câmara do ânodo, os microrganismos oxidam a matéria orgânica, produzindo elétrons e prótons, estes passam para câmara catódica por meio de uma membrana trocadora de prótons, e aqueles são conduzidos ao cátodo por meio de um circuito elétrico, constituído de um fio condutor e um resistor. Na superfície do cátodo, com os elétrons livres e os prótons, dá-se uma reação de redução do oxigênio, tendo por produto água com a geração concomitante de corrente elétrica (HE; ANGENENT, 2006).

As reações que ocorrem tipicamente em uma CCM, utilizando acetato como exemplo, são apresentadas abaixo (TEKLE; DEMEKE, 2015):



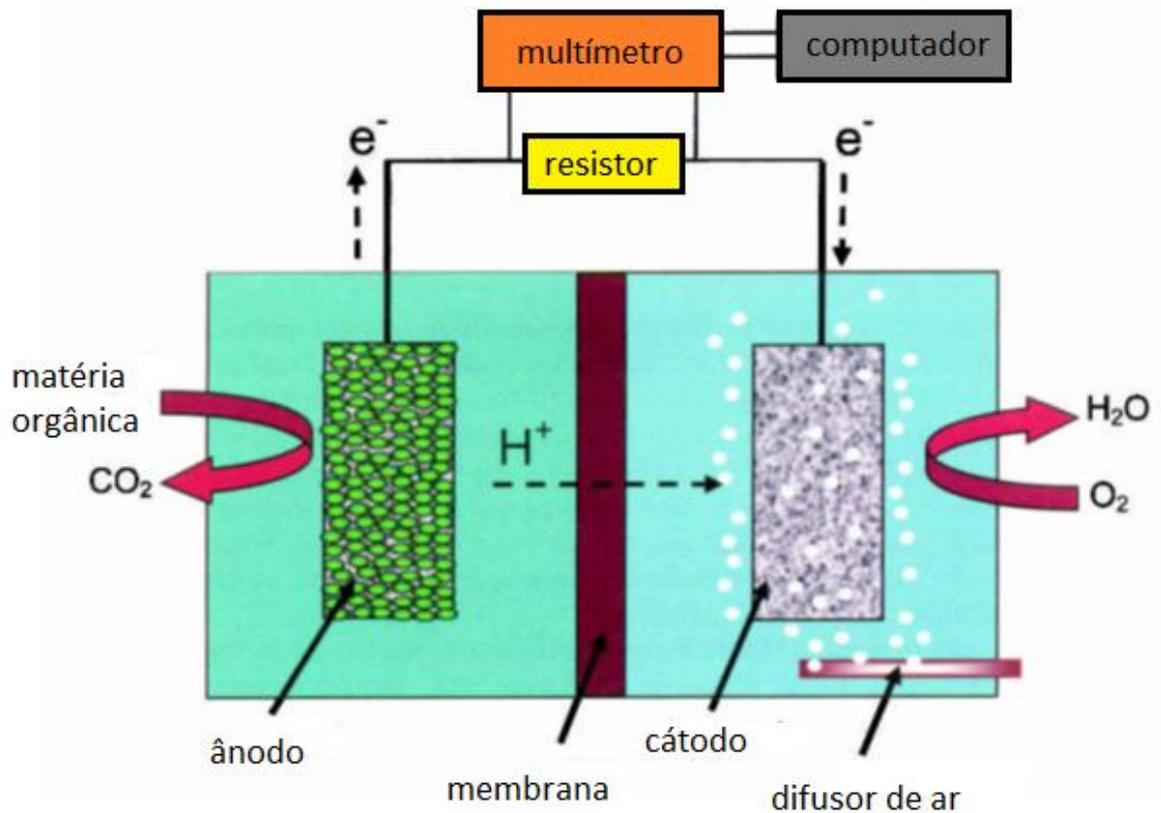


Figura 1. Esquema dos componentes básicos de uma célula a combustível.
 Fonte: Adaptado de Logan (2008).

O funcionamento de uma CCM pode ser explicado pelo metabolismo dos organismos heterotróficos, o qual apresenta duas vias principais, dependendo de seu aceptor final de elétrons externo: respiração e fermentação. Durante a oxidação do substrato, os elétrons liberados são transportados pela cadeia respiratória até serem finalmente transferidos a um aceptor final de elétrons externo. Sob condições anóxicas, organismos facultativos ou anaeróbios obrigatórios utilizam outros compostos exógenos, orgânicos ou inorgânicos, como aceptores finais de elétrons, tais como nitrato, sulfato, íons metálicos e dióxido de carbono (SCHRÖDER, 2007). Assim, alguns microrganismos podem utilizar um eletrodo como aceptor final de elétrons, por meio de três vias: através de um mediador exógeno, como, por exemplo, o Ferrocianeto de potássio; por meio de mediadores produzidos pela própria bactéria; ou por meio de transferência direta de elétrons de enzimas respiratórias (citocromos) para o eletrodo (LOGAN, 2008).

4.1.1 Componentes de uma CCM

Uma CCM típica é constituída essencialmente de três elementos físicos: ânodo, cátodo e separador, este sendo normalmente uma membrana trocadora de prótons (MTP), mas pode também ser usada uma ponte salina, embora apresente uma menor eficiência (ZHANG, 2012). Um dos grandes inconvenientes do uso de membranas comerciais é o seu alto custo. Assim, como forma de contornar este problema, alguns pesquisadores têm desenvolvido arquiteturas de CCMs sem membranas trocadora de prótons (TARDAST et al., 2012).

As características que o material do ânodo deve apresentar são, segundo Zhou et al (2011): (a) boa condutividade elétrica e baixa resistência; (b) forte biocompatibilidade; (c) estabilidade química e anti-corrosão; (d) ampla área de superfície; (e) resistência mecânica adequada e tenacidade. Além de alta porosidade; baixo custo; e de fácil construção em pequena e grande escala (LOGAN, 2008).

Vários metais podem ser utilizados na confecção de eletrodos, tais como platina, titânio, aço inoxidável e ouro, em razão de suas excelentes propriedades de não corrosividade e boa condutividade. Heijnea et al. (2008), em um estudo de comparação de quatro materiais não porosos, obtiveram bons resultados para eletrodos de titânio revestidos de platina, enquanto que titânio sem revestimento foi considerado inadequado. Sun et al. (2010) obtiveram bons resultados, em um experimento com *Shewanella oneidensis* MR-1, para ânodo de papel carbono recoberto de ouro, quando comparado com papel carbono e barra de ouro. Segundo Du, Li e Gu (2007) platina e negro de platina são mais efetivos em comparação ao grafite, pelo fato de diminuir as energias de ativação de reações anódicas e da redução do O₂ no cátodo. Porém, a despeito do bom resultado que muitos destes materiais apresentam, o alto custo ou a sua superfície lisa, que dificulta a adesão das bactérias, os tornam pouco interessantes do ponto de vista prático, quando comparados com materiais a base de carbono (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015; DU; LI; GU, 2007). Sendo assim, por apresentarem boa biocompatibilidade, estabilidade química, boa condutividade e baixo custo, os materiais carbonáceos são os mais utilizados na construção de ânodos para CCMs (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015). Na figura 2 são apresentados alguns tipos de materiais de carbono utilizados em ânodos de CCMs.

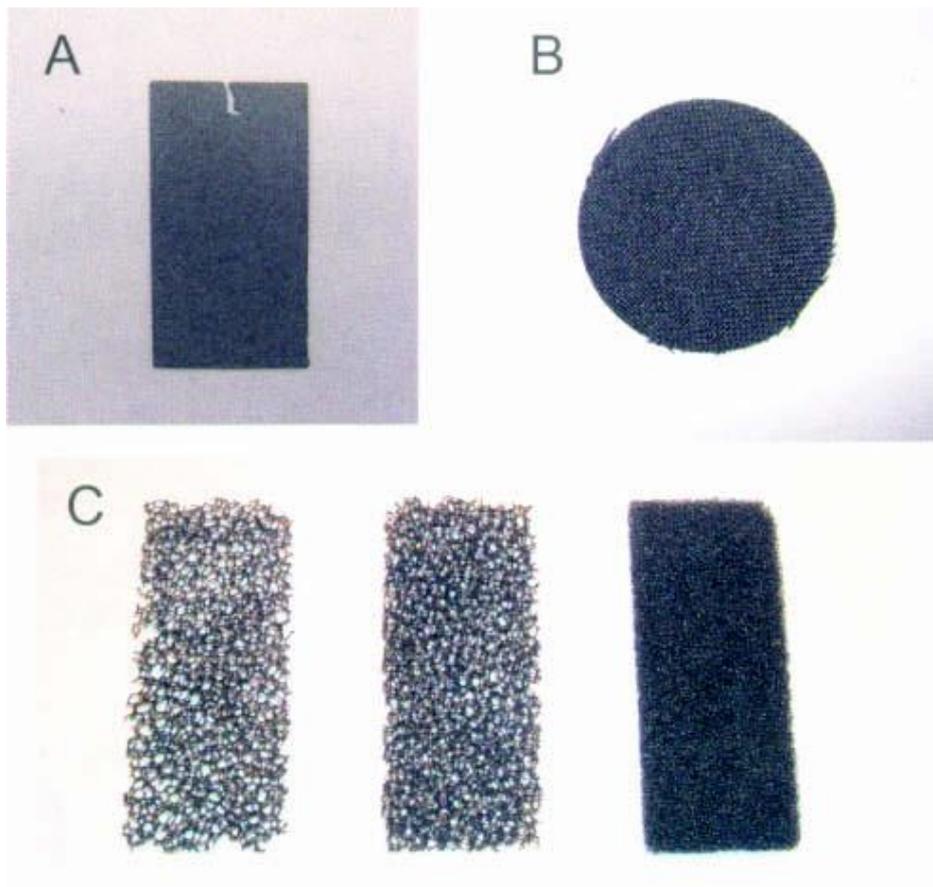


Figura 2. Fotografias de materiais de carbono usados para ânodos de CCMs: (A) papel carbono (E-TEK); (B) tecido de carbono (E-TEK); (C) três diferentes tipos de carbono vítreo reticulado (RVC) com diferentes tamanhos de poros (10, 20 e 45 poros por polegada).
Fonte: Logan (2008).

Para a construção de cátodos são comumente usados os mesmos materiais que foram descritos no uso de ânodos. O que mais os difere é que nos materiais para cátodos, geralmente se faz necessário o uso de catalisadores, (como a platina, por exemplo, para catalisar a redução do oxigênio), mas nem sempre estes são indispensáveis (LOGAN, 2008).

Embora seu uso resulte em perda de geração de energia, em razão do aumento da resistência interna que acarreta (DU; LI; GU, 2007), membranas trocadoras de prótons são utilizadas em CCMs de duas câmaras para impedir a difusão de oxigênio para a câmara anódica, a fim de se evitar a perda de substrato por meio da oxidação aeróbica por bactérias (LIU; LOGAN, 2004). Esta escolha se explica pelo fato de que

uma CCM sem membrana apresenta uma eficiência de 20% de uma CCM com MTP (LEONG, 2013).

Uma das MTPs mais comumente utilizadas em CCMs é a Nafion 117 (Dupont Corp.), em virtude de sua alta seletividade de permeabilidade de prótons (DU; LI; GU, 2007). Na figura 3 é apresentada a estrutura básica da membrana Nafion. Um dos entraves da maioria dessas MTPs é o seu custo elevado, o que dificulta a sua utilização em larga escala (LOGAN, 2008).

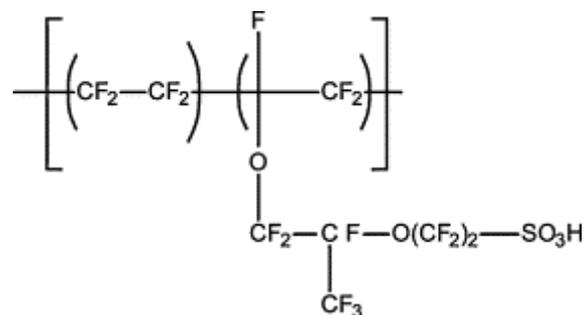


Figura 3. Estrutura básica da membrana trocadora de prótons Nafion.
Fonte: Logan (2008).

4.1.2 Tipos de Células Combustíveis Microbianas (CCMs)

Muitos tipos de configurações de CCMs são possíveis, sendo a CCM de duas câmaras a mais utilizada, em função de seu baixo custo de construção (LOGAN et al., 2006). A seguir, serão apresentadas algumas configurações que vêm sendo utilizadas.

4.1.2.1 CCM de Duas Câmaras

CCMs de duas câmaras (Figura 4) são normalmente operadas em bateladas em escala de laboratório, utilizando meios quimicamente definidos tal como solução de acetato ou glicose (DU; LI; GU, 2007). Sua arquitetura básica consiste de dois frascos conectados por um tubo contendo um separador, o qual normalmente é uma

membrana trocadora de prótons, mas que também pode ser uma ponte salina (LOGAN et al., 2006).

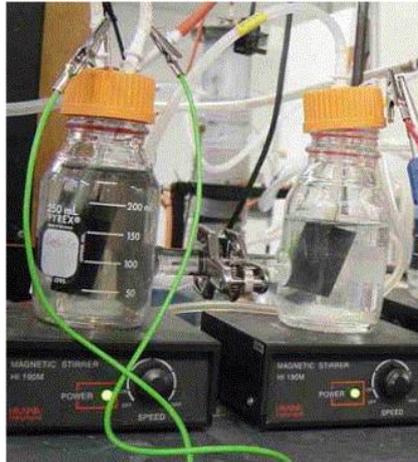


Figura 4. Típica CCM de duas câmaras.
Fonte: Logan et al. (2005).

4.1.2.2 CCM de Uma Câmara

CCMs de uma câmara tipicamente possuem apenas a câmara anódica, onde o cátodo é exposto diretamente ao ar atmosférico, tornando, assim, desnecessário a aeração do meio, o que a torna mais atrativa, tanto economicamente como operacionalmente (AKTAN, 2011). Na figura 5 pode-se observar em detalhes a sua arquitetura: os eletrodos se situam nos extremos da câmara, estando o cátodo separado do meio por uma membrana Nafion ligada diretamente em sua face interna, ao mesmo tempo em que sua face externa fica exposta ao ar atmosférico.

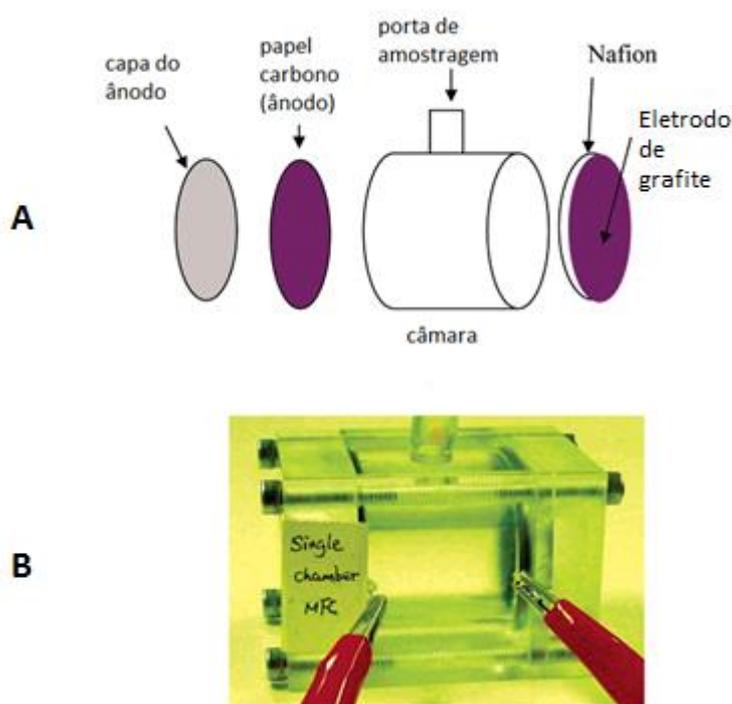


Figura 5. (A) Esquemático da CCM; (B) protótipo de uma CCM de uma câmara em escala de laboratório usada para gerar eletricidade a partir de esgoto e glicose.
Fonte: Adaptado de Liu; Logan (2004).

4.1.3 Aplicações de CCMs

Dispositivo bastante versátil, a CCM se apresenta como uma tecnologia de diversas aplicações:

- Biossensores: Sob condições constantes, as CCMs geram uma corrente de saída constante, de modo que, sob condições de stress, como a presença de um composto tóxico (STEIN et al., 2012), inibidores, alteração de pH, temperatura e concentração de matéria orgânica, vem a ocorrer uma redução e variação na geração de energia; podendo, assim, serem empregadas como sensores de diversos parâmetros. Atualmente, várias pesquisas vêm sendo feitas nesse sentido (YANG et al., 2015).

As CCMs apresentam grande potencial para o monitoramento da qualidade da água, visto que um grande número de compostos tóxicos pode inibir a atividade metabólica dos microrganismos. Além disso, apresentam muitas vantagens, quando comparadas às técnicas convencionais de monitoramento: podem operar de modo *online* por longo período; não requerem equipamentos transdutores e fonte de

energia, pois a corrente gerada pela CCM pode ser usada como indicador da presença de substâncias tóxicas; as bactérias têm resposta rápida à presença de elementos tóxicos; e tanto a sua construção quanto a sua operação são de baixo custo (YANG et al., 2015).

- Geração de eletricidade: CCMs podem converter a energia química contida na biomassa em energia elétrica pelo uso de microrganismos. Como a energia química das moléculas são convertidas diretamente em eletricidade ao invés de calor, é evitada a limitação da eficiência térmica do ciclo de Carnot, podendo teoricamente obter eficiências muito maiores (DU; LI; GU, 2007).

- Geração de hidrogênio: CCMs podem ser alteradas para produzirem hidrogênio. Para isso, o oxigênio da câmara catódica é removido e uma pequena voltagem é aplicada. Como a geração de hidrogênio a partir dos elétrons e prótons produzidos pelo metabolismo dos microrganismos é desfavorável termodinamicamente em uma CCM, o emprego de um potencial externo para incrementar o potencial da CCM permite superar a barreira termodinâmica. O potencial externo demandado para uma CCM é de 110mV, muito abaixo dos 1210mV requeridos para a eletrolise direta da água (FALCÓN; LOZANO; JUÁREZ, 2009; DU; LI; GU, 2007).

- Tratamento de águas residuárias: Os microrganismos eletroquimicamente ativos funcionam como catalisadores para a oxidação da matéria orgânica presente nas águas residuárias, ao mesmo tempo em que transferem elétrons extracelularmente para eletrodos, promovendo o tratamento do efluente com recuperação de energia (FALCÓN; LOZANO; JUÁREZ, 2009).

4.2 MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS

Eletrodos são corpos sólidos que não podem penetrar a célula bacteriana, sendo necessário que os elétrons sejam transferidos do interior da membrana celular para o seu exterior, podendo ser por transferência física de compostos reduzidos, ou por transporte de elétrons usando enzimas redox ligadas à membrana (SCHRÖDER, 2007).

Existem bactérias ativas eletroquimicamente que são capazes de transferir elétrons ao ânodo por meio de proteínas da membrana como os citocromos do tipo c.

Outras bactérias, não eletroquimicamente ativas, demandam mediadores de elétrons exógenos ou endógenos (REVELO; HURTADO; RUIZ, 2013). Os mediadores são reduzidos durante a oxidação metabólica da matéria orgânica, sendo reoxidados ao transportar os elétrons ao ânodo, o que mantém um alto potencial elétrico (CHANG et al., 2006).

4.2.1 Transferência Direta de Elétrons (TDE)

A transferência direta de elétrons ocorre por contato físico entre a membrana celular e o eletrodo, sem envolver nenhum tipo de espécie redox. Para isso, os microrganismos devem possuir proteínas transportadoras de elétrons ligadas à membrana que realizam este transporte de dentro da célula até um aceptor de elétrons externo sólido, este podendo ser um óxido metálico ou o ânodo da CCM (SCHRÖDER, 2007). Busalmen et al. (2008), em um estudo de abordagem combinada que inclui eletroquímica de corrente direta e espectroscopia de absorção no infravermelho melhorada, analisaram *in vivo* a interface de contato entre a bactéria *Geobacter sulfurreducens* produzindo eletricidade e um eletrodo de ouro em escala manométrica, constatando, pelas alterações reversíveis nos espectros produzidos, que os citocromos do tipo C são responsáveis pela transferência direta de elétrons ao eletrodo, por meio de sua oxidação e redução. Na figura 6 é apresentada uma proposta do mecanismo de transferência de elétrons direta por meio dos citocromos do tipo C.

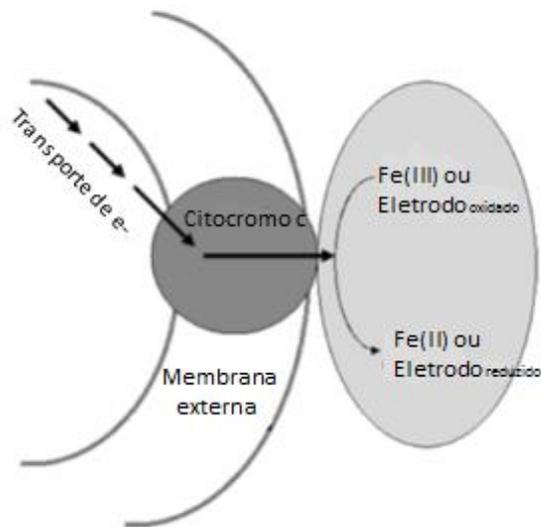


Figura 6. Proposta de mecanismo de transferência de elétrons direta por meio de citocromos da membrana externa.
Fonte: Chang et al. (2006).

4.2.2 Transferência de Elétrons Mediada (TEM)

Mediadores são compostos capazes de interagir com a célula (GARCÍA-VILLARRUBIA, 2015), reduzindo-se durante a oxidação metabólica de matéria orgânica, sendo logo reoxidados ao transportar os elétrons até o ânodo (REVELO; HURTADO; RUIZ, 2013), como é demonstrado na figura 7. Eles desempenham um papel essencial na transferência de elétrons naqueles microrganismos que não são capazes de realizar a transferência direta de elétrons (GARCÍA-VILLARRUBIA, 2015).

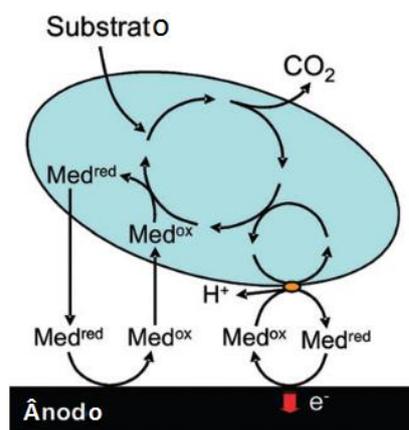


Figura 7. Ilustração esquemática simplificada da transferência de elétrons mediada.
Fonte: SCHRÖDER (2007).

Alguns microrganismos, tais como *Geothrix fermentans* *Pseudomonas* sp., são capazes de produzir seu próprio mediador, o que torna desnecessário a adição de mediadores artificiais ao meio. A *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, produz fenazina, substância que desempenha o papel de mediador (LOVLEY, 2006).

No caso dos microrganismos incapazes de produzir seu próprio mediador, e que não possuem mecanismos de transferência direta de elétrons, faz-se necessário a adição de mediadores exógenos, os quais são capazes de atravessar as paredes da célula, capturar os elétrons e levá-los para fora da célula, onde os cederão ao eletrodo (GARCÍA-VILLARRUBIA, 2015). Alguns mediadores que são comumente usados são a tionina, azul de metileno, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona e outros compostos hidrofóbicos (CHANG et al., 2006).

4.3 DESEMPENHO ELÉTRICO DAS CCMS

4.3.1 Geração de Tensão

A tensão máxima (força eletromotriz máxima) produzida por uma CCM, em volts (V), pode ser calculada pela equação de Nernst (LOGAN, 2008):

$$\Delta E = E^0 - (RT/nF) \ln(Q) \quad (1)$$

Onde E^0 é a força eletromotriz padrão da célula, R é a constante dos gases (8,31447 J/mol. K), T é a temperatura absoluta (K), n é o número de elétrons transferidos, F é constante de Faraday (96.485 C/mol), e Q é o quociente da reação, que é a razão das atividades dos produtos dividido pelos reagentes elevados aos seus respectivos coeficientes estequiométricos.

Porém, esta equação prediz a tensão de saída em uma CCM ideal. Na prática, a tensão de saída será sempre menor do que a predita. Isto ocorre devido a perdas de ativação, perdas ôhmicas e perdas de transporte de massa. Estas perdas são

definidas como a tensão requerida para compensar a corrente perdida devido a reações eletroquímicas, de transporte de carga e processos de transferência de massa que acontecem em ambos os compartimentos da CCM. Estas perdas variam de um sistema para outro. A verdadeira tensão de saída operacional (V_s) de uma CCM pode ser determinada subtraindo-se as perdas de tensão associadas com cada compartimento a partir da tensão prevista termodinamicamente (RISMANI-YAZDI et al., 2008):

$$V_s = E_{\text{termo}} - [(\eta_{\text{at}} + \eta_{\text{oh}} + \eta_{\text{conc}})_{\text{cátodo}} + (\eta_{\text{at}} + \eta_{\text{oh}} + \eta_{\text{conc}})_{\text{ânodo}}] \quad (2)$$

Onde E_{termo} é a tensão predita termodinamicamente, η_{at} é a perda de ativação, η_{oh} é a perda ôhmica e η_{conc} é a perda de concentração devido as limitações de transporte de massa.

4.3.2 Geração de Potência

Para se calcular a potência de saída de uma CCM, podem-se utilizar as três equações (HALLIDAY; RESNICK; WALKER; 2009):

$$P = iV \quad (3)$$

$$P = i^2R \quad (4)$$

$$P = V^2/R \quad (5)$$

Onde P é potência em Watt (W), i é a corrente em Ampère (A), e R é a resistência externa da CCM.

No entanto, o que se mede em uma CCM é a sua densidade de potência (DP), isto é, a potência por unidade de eletrodo anódico ou a potência por unidade de volume do substrato. Para isso, basta dividir as equações acima pela área do eletrodo ou pelo volume de substrato, obtendo-se então as seguintes equações (REVELO; HURTADO; RUIZ, 2013; LOGAN, 2008):

$$P = iV/A_{\text{eletrodo}} \quad (6)$$

$$P = iV/v_{\text{ccm}} \quad (7)$$

$$P = i^2R/A_{\text{eletrodo}} \quad (8)$$

$$P = i^2R/v_{\text{ccm}} \quad (9)$$

$$P = (V^2/R)/A_{\text{eletrodo}} \quad (10)$$

$$P = V^2/R/v_{\text{ccm}} \quad (11)$$

Onde A_{eletrodo} é a área do eletrodo anódico, e v_{ccm} é o volume de substrato da CCM.

4.6 MICRORGANISMOS

4.6.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Em 1835, *Vibrio subtilis* foi descrita por Ehrenberg, sendo renomeada para *Bacillus subtilis* (Figura 8) por Cohn, em 1872. Este microrganismo foi o fundador de um diversificado gênero pertencente à família *Bacillaceae*, a qual tem por característica distintiva a formação de endósporos, que podem ser ovais, redondos ou cilíndricos (SLEPECKY; HEMPHILL, 2006).

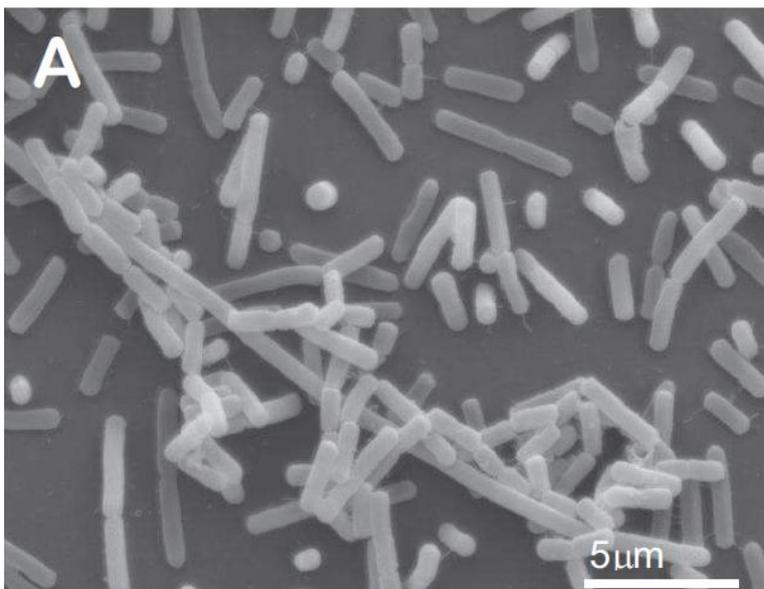


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura de *Bacillus subtilis*.
Fonte: JIMAT, 2011.

Bacillus subtilis são bactérias Gram positivas, não patogênicas, formadoras de endósporos, não colonizadoras de tecidos, facilmente encontradas no solo (PACCEZ, 2007). Podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas, com capacidade de crescer em uma vasta gama de temperaturas (VOSS, 2013).

De grande utilização na indústria na produção de proteases (PACCEZ, 2007), a *B. subtilis* também vem sendo utilizada atualmente em pesquisas de CCMs, devido a sua habilidade de transferir elétrons a um eletrodo sem a utilização de um mediador artificial (ISMAIL; JAEEL, 2013). Nimje et al. (2009), em um estudo de CCM utilizando *B. subtilis*, obtiveram um pico de geração de energia de 400 mV. Ismail e Jaeel (2013), operando uma CCM inoculada com *B. subtilis*, obtiveram uma eficiência de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) de 90% e um pico de geração de potência de 270 mW/m².

4.6.2 *Pseudomonas aeruginosa* PSPA7_5686

Pseudomonas aeruginosa (Figura 9) é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, presente nos mais diversos ambientes, incluindo solo, água, plantas, animais e humanos. Microrganismo metabolicamente versátil, com poucas exigências nutricionais e tolerante a diversas condições físicas, como temperatura (>42°C), altas

concentrações de sais e antimicrobianos, atua com sucesso como patógeno oportunista (KUS, 2008).

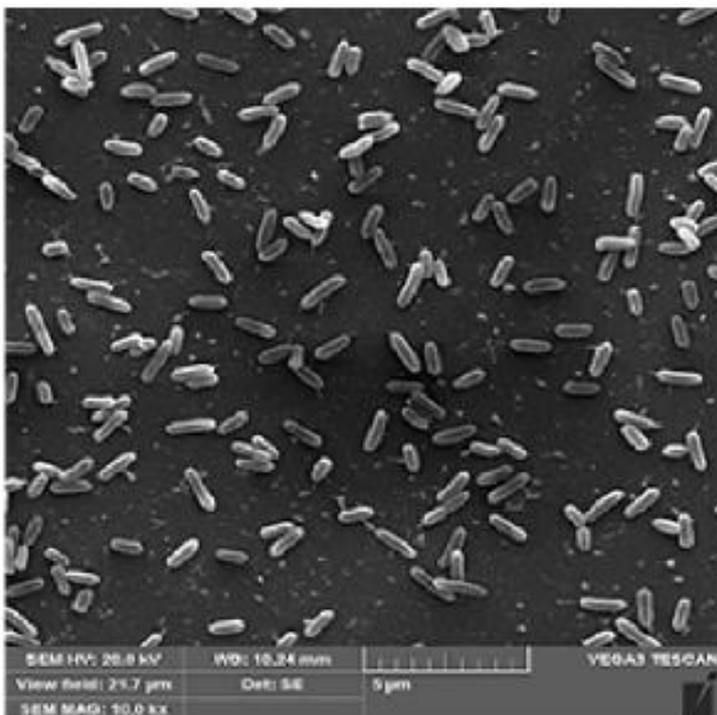


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura de *Pseudomonas aeruginosa*.
Fonte: LUO et al., 2016.

P. aeruginosa pode produzir metabólitos secundários, como a piocianina (PYO) e a 1-hidroxifenazina (OHPHZ), que funcionam como mediadores de elétrons entre a célula e o eletrodo da CCM, o que a torna uma bactéria de interesse na aplicação em CCMs; muito embora a sua geração de DPE seja bastante baixa. Devido a este fato, a eficiência global da transferência de elétrons de *P. aeruginosa* para ânodos precisa de ser melhorada (QIAO et al., 2014).

Em um estudo sobre a formação de biofilme em CCMs, Read et al. obtiveram apenas 0,5 mA/m² de corrente gerada com CCM operada com *P. aeruginosa*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MICRORGANISMOS

No presente trabalho foram utilizadas as bactérias *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Pseudomonas aeruginosa* CCBH 5686 (cepa isolada pela Fiocruz e recebida pela UTFPR em 2010), ambas pertencentes ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UTFPR - Sede Ecoville, Câmpus Curitiba.

A bactéria *B. subtilis* foi ativada em meio Caldo Mueller-Hinton sob incubação a 30°C, em seguida foi repicada em ágar Mueller-Hinton e incubada por 24h a 30°C, para ser armazenada sob refrigeração de 2°C a 8°C de acordo com as recomendações do site ATCC®, alterando apenas os meios de cultivo. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi ativada em meio Caldo Triptona de Soja sob incubação de 37°C, em seguida foi repicada em ágar Triptona de Soja e incubada por 24h a 37°C, para ser armazenada sob refrigeração de 2°C a 8°C de acordo com as recomendações do site ATCC®.

O método de esgotamento com estrias foi utilizado para obtenção de colônias isoladas que foram utilizadas como inóculo para os experimentos, sendo realizada nova ativação para cada inóculo.

5.1.1 Inóculo

O inóculo utilizado nas CCMs foi estandardizado empregando o padrão McFarland 0,5 (correspondente a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL), de acordo com o inóculo utilizado no trabalho de Ramalakshmi, Akila e Sharief (2013), no qual empregaram 1% de inóculo em relação ao volume de substrato. Para a padronização do inóculo seguiu-se o protocolo de Wiegand, Hilpert e Hancock (2008).

5.2 CONFECÇÃO DAS CCMS

Foram construídas três pares de CCMs com arquiteturas diferentes: CCMs de duas câmaras com volume de 350 mL, em sistema de batelada, CCMs de duas câmaras com volume de 350 mL, em sistema de alimentação intermitente, e CCMs de duas câmaras com volume de 90 mL, em sistema de batelada.

- Primeira Arquitetura:

As CCMs de duas câmaras com volume de 350 mL, em sistema de batelada, foram confeccionadas com dois potes plásticos comerciais herméticos (marca Sanremo, 312 mL) e uma conexão de PVC de 40 mm (marca Tigre, modelo curvar), na qual se fixou uma membrana Nafion 117 (Dupont Corp.). Como eletrodos, utilizou-se placas de grafite (Sisfix Sistemas de Fixação Ltda.), de dimensões 49 mm x 29 mm x 3 mm, conectados a uma resistência externa de 1000 Ω por meio de um fio duplo de cobre (0,5mm). A distância entre os eletrodos foi de 14 cm, estando eles situados a 7 cm da MTP em seu ponto central.

A câmara catódica recebeu aeração forçada, através de um compressor de aquário conectado a um difusor de ar por meio de uma mangueira de silicone. A figura 10 apresenta um desenho esquemático da CCM.

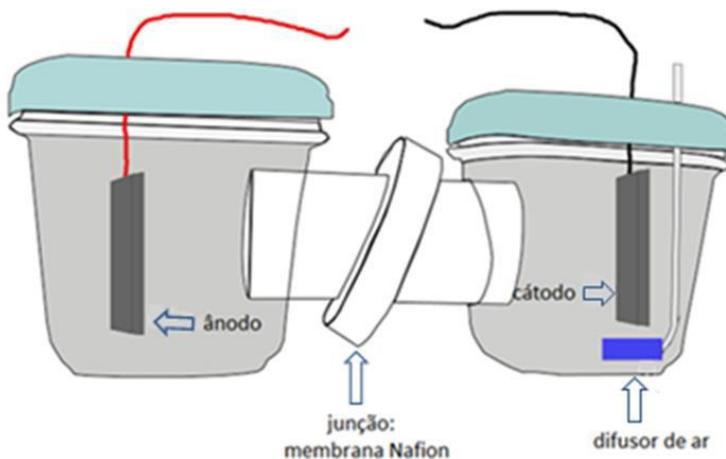


Figura 10. Desenho esquemático da CCM de 350 mL em sistema de batelada.

- Segunda Arquitetura:

Para a construção das CCMs de duas câmaras com volume de 350 mL, em sistema de alimentação intermitente, procedeu-se como descrito para a CCM anterior, tendo por diferença fundamental o acréscimo de mangueiras de silicone para compor o sistema de alimentação e o sistema de saída, além do uso de uma bomba peristáltica e um timer. Na figura 11 é apresentada uma foto do sistema montado e operando.



Figura 11. CCMs em sistema de alimentação intermitente de 350 mL em operação.

No primeiro protótipo, a alimentação era feita pela parte inferior da CCM e o descarte do meio pela parte superior. Porém, nesta configuração, ocorria a contaminação do reservatório do meio pela mangueira de silicone. Para sanar esta situação, inverteu-se o sistema de operação. A alimentação passou a ser executada por cima, sem contato entre a mangueira e o meio da CCM; e o descarte foi realizado

por baixo. Para manter o nível de meio da CCM na marca desejada, apenas foi regulada a altura do reservatório de descarte.

-Terceira Arquitetura:

Para a confecção das CCMs de 90mL foram utilizados uma conexão de PVC de 40 mm (modelo curvar 45°, marca Tigre) em cuja junção foi fixada uma membrana Nafion 117 (Dupont Corp.); uma luva de correr de PVC de 40 mm; cano de PVC de 40 mm; dois caps de PVC de 40mm; e anéis de vedação. Como eletrodos, foram utilizadas placas de grafite (Sisfix Sistemas de Fixação Ltda.), de dimensões 30mm x 20 mm x 3 mm, conectados a uma resistência externa de 1000 Ω por meio de um fio duplo de cobre (0,5mm). A distância entre os eletrodos foi de 6,6 cm, estando eles situados a 3,3 cm da MTP em seu ponto central.

A câmara catódica recebeu aeração forçada, através de um compressor de aquário conectado a um difusor de ar por meio de uma mangueira de silicone. A figura 12a apresenta a CCM em vista explodida, em 12b a CCM montada e operando, e em 12c o desenho esquemático da CCM.

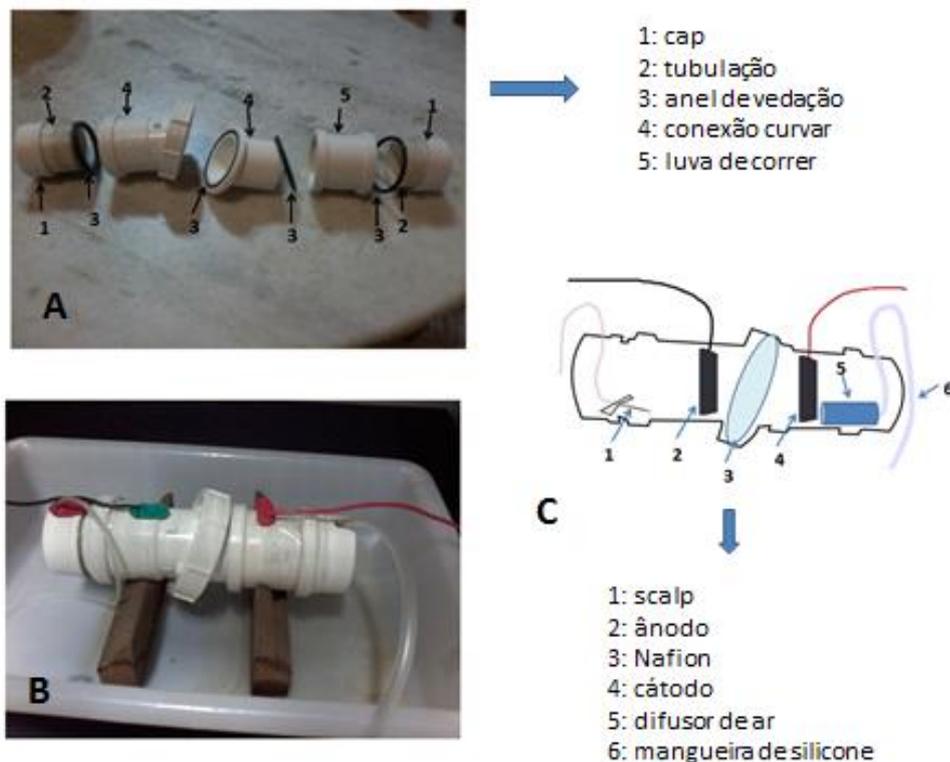


Figura 12. A: CCM em vista explodida; B: CCM montada e em operação; C: desenho esquemático da CCM.

5.3 OPERAÇÃO DAS CCMs

5.3.1 CCMs em Batelada de 350 mL e 90 mL

As CCMs em batelada de 350 mL e 90 mL, seguindo a metodologia utilizada por Nimje et al. (2009) para CCMs inoculadas com *B. subtilis*, utilizaram como substrato para a câmara anódica o meio M9 (1 g/L NH₄Cl, 3 g/L KH₂PO₄, 6 g/L Na₂HPO₄, 5 g/L NaCl, 1mmol/L MgSO₄, e 0.1 mmol/L CaCl₂) acrescido de 0,2% de glicose para o crescimento de *B. subtilis*, sendo o seu pH ajustado para 7 (\pm 0,1) com o uso de NaOH na concentração de 0,5 mol/L. Na câmara catódica utilizou-se o meio M9 sem glicose. As CCMs foram operadas em estufa a 30°C.

5.3.2 CCMs em Alimentação Intermitente de 350 mL

As CCMs alimentação intermitente de 350mL, seguindo a metodologia utilizada por Nimje et al. (2009) para CCMs inoculadas com *B. subtilis*, utilizaram como substrato para a câmara anódica o meio M9 (1 g/L NH₄Cl, 3 g/L KH₂PO₄, 6 g/L Na₂HPO₄, 5 g/L NaCl, 1mmol/L MgSO₄, e 0.1 mmol/L CaCl₂) acrescido de 0,2% de glicose para o crescimento de *B. subtilis*, sendo o seu pH ajustado para 7 (\pm 0,1) com o uso de NaOH na concentração de 0,5 mol/L. Na câmara catódica utilizou-se o meio M9 sem glicose. Para as CCMs inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa*, seguiu-se a metodologia de Young et al. (2011), utilizaram como substrato para a câmara anódica o meio M9 acrescido de 0,4% de glicose, sendo o seu pH ajustado para 7 (\pm 0,1) com o uso de NaOH na concentração de 0,5 mol/L. Na câmara catódica utilizou-se o meio M9 sem glicose. As CCMs foram operadas a temperatura ambiente, em razão do espaço insuficiente para montá-las em estufa.

A alimentação foi feita por meio de uma bomba peristáltica de vazão média de 45mL/min para cada CCM e um *timer*, sendo a mesma acionada pelo *timer* de seis em seis horas por um minuto, dando um total de quatro alimentações diárias. A alimentação total foi de 180mL/d para cada CCM. As CCMs foram operadas em

batelada por 49h e 70h, para a formação do biofilme, inoculadas com *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, respectivamente, para então se iniciar a alimentação intermitente.

A coleta de amostras, para medição de pH e realização de análise de açúcares redutores, foram feitas por meio de uma seringa conectada a um scalp alojado na câmara anódica, numa alíquota de 3 mL. Verificado o pH, as amostras foram acondicionadas em eppendorfs e congeladas em freezer para posterior análise de açúcares redutores.

5.4 CURVA DE POLARIZAÇÃO

Para caracterizar a corrente elétrica em função da voltagem, de modo a permitir a comparação com diferentes trabalhos (LOGAN, 2008; LOGAN et al., 2006), realizou-se uma curva de polarização para as CCMs de 90 mL (com o uso de azul de metileno como mediador de elétrons). Para isso, foram utilizados uma série de resistores, variando de 56 Ω a 16040 Ω , como resistência externa do circuito, no período em que a CCM esteve operando em condições de estabilidade, como é descrito por Logan et al. (2006).

Para a realização da CP, utilizou-se uma concentração inicial de glicose de 0,2%, e uma segunda adição de glicose de 1% no terceiro dia de funcionamento, para que a CCM operasse de modo estável por maior tempo.

Os resistores foram conectados em série com um amperímetro aos terminais da CCM, e em paralelo com um voltímetro, para monitorar corrente e tensão em função da resistência externa empregada. O que permitiu construir a curva de polarização da CCM e encontrar o seu valor da resistência interna, de modo a poder operá-la em seu nível de maior rendimento de potência, que é quando a resistência interna e externa são iguais, de acordo com Teorema da máxima transferência de potência (IRWIN, 2008).

5.5 MONITORAMENTO DAS CCMs

5.5.1 Diferença de Potencial Elétrico (DPE)

A DPE foi monitorada de 1 em 1 minuto por meio do multímetro digital RMS (marca Radioshack) ligado a um computador, utilizando o programa Meter View.

5.5.2 pH

O pH das CCMs de 350 mL foi monitorado diariamente por meio de pHmetro calibrado (marca Micronal, modelo B474) pertencente ao laboratório de Microbiologia da UTFPR - Sede Ecoville, Câmpus Curitiba. Para a medição de pH das CCMs de 90 mL utilizou-se fita indicadora de pH (pH-fix 0-14, Macherey-Nagel), em virtude do volume reduzido das CCMs.

5.5.3 Análise de Açúcares Redutores

A análise de açúcares redutores foi realizada conforme o Método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS), de Miller (1959), o qual se fundamenta na redução do ácido 3,5 – dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

Para análise foram preparados duas soluções em separado, a solução reagente ácido dinitrosalicílico de 1%, preparada em balão volumétrico de 1L com 10g de ácido dinitrosalicílico, 0,5g de sulfato de sódio e 10g de hidróxido de sódio, sendo o seu volume completado com água deionizada até a marca de 1L; e a solução de tartarato de sódio e potássio de 40%, preparada em balão volumétrico de 100mL com 40g de tartarato de sódio e potássio e o volume completado com água deionizada até a marca de 100mL.

Para a análise, em um tubo de ensaio são adicionados 3mL da amostra e 3mL da solução reagente DNS, os tubos são tampados com parafilme e submetidos a aquecimento em banho-maria a 90°C por quinze minutos. Após isto, é adicionado 1mL da solução de tartarato de sódio e potássio e o tubo é posto em resfriamento em banho de gelo. A análise é realizada em espectrofotômetro a 575nm.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OPERAÇÃO DAS CCMs

6.1.1 Comparação Entre CCMs de 350mL Operadas em Batelada Com e Sem Oxidação dos Terminais de fixação dos Eletrodos, Inoculadas com *B. subtilis*

Em um primeiro estágio, foi operada uma CCM de 350 mL (CCM 1), seguindo a metodologia de Nimje et al. (2009), onde os autores apenas prendem o fio de cobre ao eletrodo sem nenhum tipo de isolamento do metal (somente transpassam o fio em um orifício no eletrodo e o torcem), modificando apenas o modo de fixação, que neste trabalho foram utilizados jacarés para a fixação. Como era de se esperar, houve oxidação dos jacarés, como pode ser notado na figura 13 (fotografia feita após 237 h de operação da CCM).



Figura 13. Oxidação dos jacarés de fixação dos eletrodos.

Neste ensaio, à semelhança do resultado obtido por Nimje et al. (2009), no qual obtiveram tensão inicial de 93 mV, a tensão inicial obtida foi de aproximadamente 130 mV. Sem dúvida, uma tensão bastante alta para a partida de uma CCM que acabou

de ser inoculada e o inóculo ainda está em um período de adaptação e nem teve tempo de colonizar o ânodo. Nimje et al. (2009) observam que esta tensão inicial poderia estar relacionada a fatores químicos e biológicos entre as duas câmaras.

Com o intuito de se investigar as causas disto, seguindo as recomendações de Logan (2008) de isolar o fio condutor que prende o eletrodo, desta vez foi operada outra CCM sob as mesmas condições que a primeira, com a diferença que desta vez o fio condutor foi isolado com tinta condutiva. Na figura 14 (fotografia realizada após 143 h de operação da CCM) é mostrada a foto dos eletrodos isolados sem a presença de oxidação.

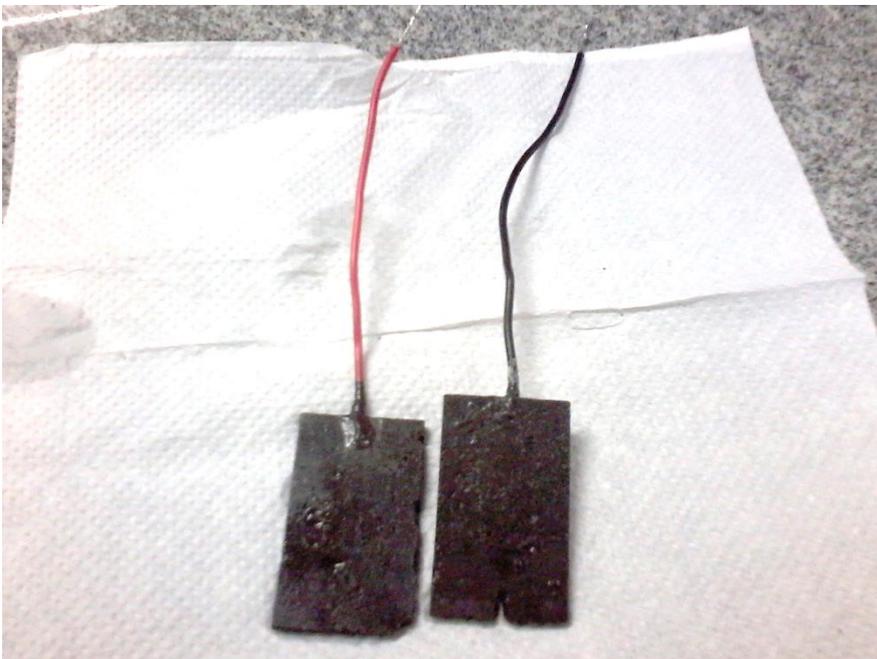


Figura 14. Eletrodos com os fios de cobre isolados com tinta condutiva, sem a presença de oxidação.

Com este segundo ensaio, foi possível atestar o grande efeito da oxidação na geração de DPE, como pode ser observado no gráfico 2.

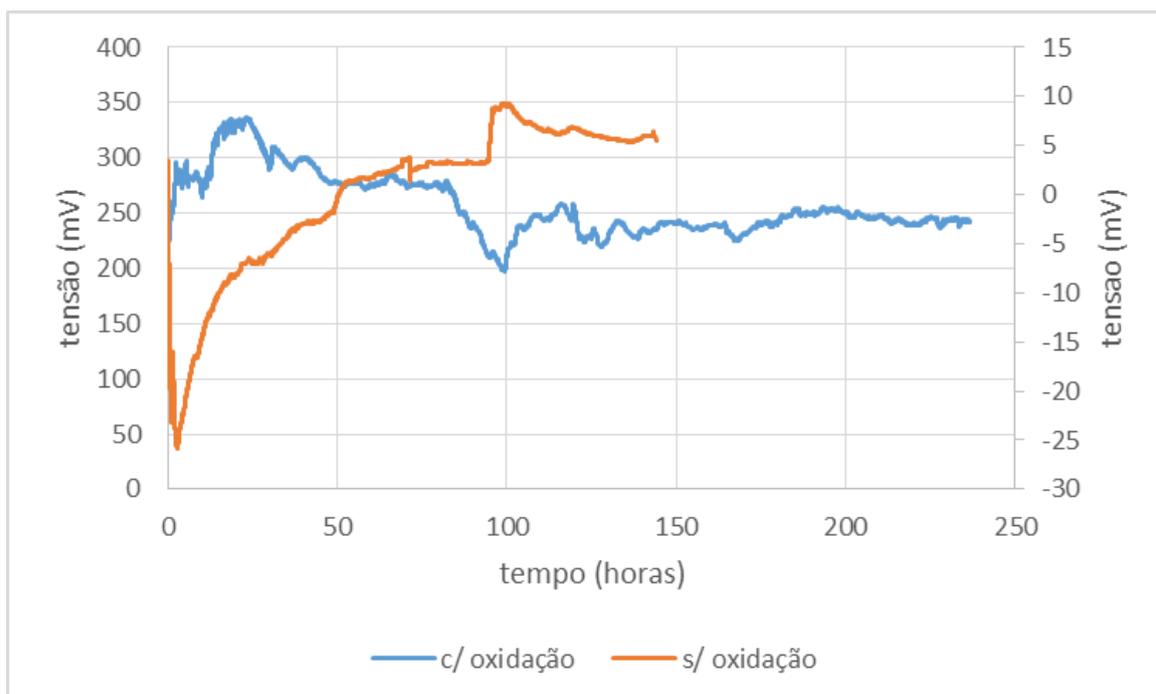


Gráfico 1. Geração de DPE por CCMs inoculadas com *B. subtilis* com e sem oxidação do fio condutor (eixo principal: com oxidação do fio condutor (azul); eixo secundário: sem oxidação do fio condutor (laranja)).

Como é demonstrado no gráfico 1, a DPE gerada pela CCM sem oxidação do fio condutor foi significativamente inferior, apresentando um pico de 10 mV, ao passo que a com oxidação do fio condutor teve um pico de 334 mV. Normalizando a DPE pela área do eletrodo, obtém-se 0,33 mV/cm² e 11,1 mV/cm², respectivamente. Nimje et al. (2009) obtiveram uma DPE de 16,4 mV/cm². Assim, pode-se dizer que, provavelmente, a grande DPE gerada, tanto neste trabalho quanto no de Nimje et al. (2009), é resultante da oxidação dos fios condutores, e não da atividade metabólica da bactéria *B. subtilis*. Provavelmente, sob essas condições, a CCM estava funcionando como uma pilha química, em uma reação de oxirredução. Quanto a geração de DPE produzida pela *B. subtilis*, mais adiante isto será abordado novamente.

Ainda tratando do efeito de oxirredução do metal nas CCMs, John e Lopes (2013), em um trabalho sobre a geração de energia em CCMs utilizando diferentes microrganismos e materiais para eletrodos, ao fazer o branco da CCM (sem inóculo) obtiveram DPE de 0,3549 V para eletrodo de grafite (não sendo especificado como o mesmo foi fixado) e 0,3422 V para eletrodo de ferro fundido, deixando claro o efeito de oxirredução na geração de DPE.

Por outro lado, também é importante salientar que no trabalho de Nimje et al. (2009) havia uma variável que deve ser levada em conta e que não estava presente neste trabalho: a dopagem de platina do eletrodo de grafite do cátodo, o qual é utilizado como catalisador para a reação do oxigênio com os prótons H^+ (LOGAN, 2008). Sem dúvida, a utilização de catalisador no ânodo deve também ter contribuído para o aumento da eficiência de geração de DPE.

6.1.2 Comparação Entre CCMs de 90mL Operadas em Batelada Com e Sem Mediador de Elétrons, Inoculadas Com *B. Subtilis*

Em uma segunda etapa, realizou-se experimentos com CCMs de 90mL inoculadas com *B. Subtilis*, procurando estabelecer o efeito do uso do mediador azul de metileno na geração de DPE.

As CCMs foram iniciadas com uma concentração de glicose de 0,2%. Após as CCMs operarem por 75 h, quando a DPE chegou a zero, injetou-se novamente glicose e esperou-se estabilizar a geração de DPE, para então injetar 1,5 g/L de azul de metileno por meio de uma membrana de 0,22 μm na câmara anódica, no tempo de 141 h.

Como pode ser observado no gráfico 2, sem a presença de mediador as CCMs apresentaram picos de DPE de 7,2 e 7 mV. Após a injeção de mediador, a CCM apresentou um pico de 25,1 mV, ao passo que a CCM sem mediador manteve-se estável na faixa de 5 mV. Sem dúvida o ganho obtido pela presença de mediador é significativo, um aumento de quase de 250%.

Este efeito do uso de mediadores é constatado em vários estudos. Hosseini e Ahadzadeh (2013), em um estudo que explorava o efeito de diversos mediadores em uma CCM inoculada com lodo de esgoto urbano, obtiveram potência de 83,5 $\mu W/cm^2$, 150 $\mu W/cm^2$ e 202 $\mu W/cm^2$ para experimento sem mediador, com alaranjado de metila e vermelho de metila, respectivamente. Em outro estudo, Mokhtarian et al. (2012), em um estudo utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo, obtiveram uma potência de 190 mW/m² com o uso de 200 $\mu mol/L$ de vermelho neutro, ao passo que

a potência gerada sem o uso de mediador foi de 4mW/m^2 , demonstrando assim, o grande efeito produzido pelo uso de mediadores.

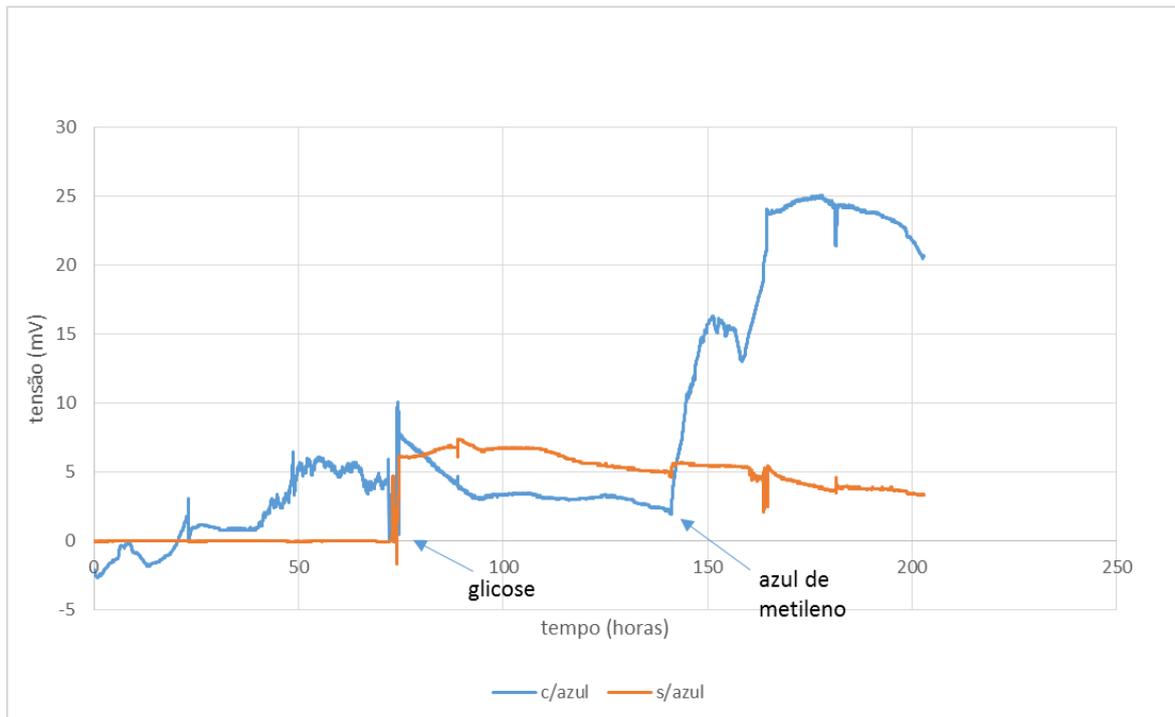


Gráfico 2. Comparação de DPE gerada por CCMs com e sem a presença do mediador azul de metileno. As flechas no gráfico indicam os pontos de injeção de glicose e mediador.

Ainda neste experimento, avaliou-se a estabilidade de funcionamento da CCM e a reprodutibilidade de suas curvas de DPE frente a adição de glicose administrada. Para isso, o início de operação da CCM partiu com uma carga de glicose de 0,05% - uma concentração bastante baixa foi utilizada para que o tempo de cada curva não ultrapassasse 50h. Quando o potencial elétrico chegasse próximo de 0V, outra carga de glicose de 0,5% era injetada por meio de uma membrana de $0,22\mu\text{m}$. Repetindo-se este procedimento por três vezes. No gráfico 5 é apresentado os resultados deste experimento.

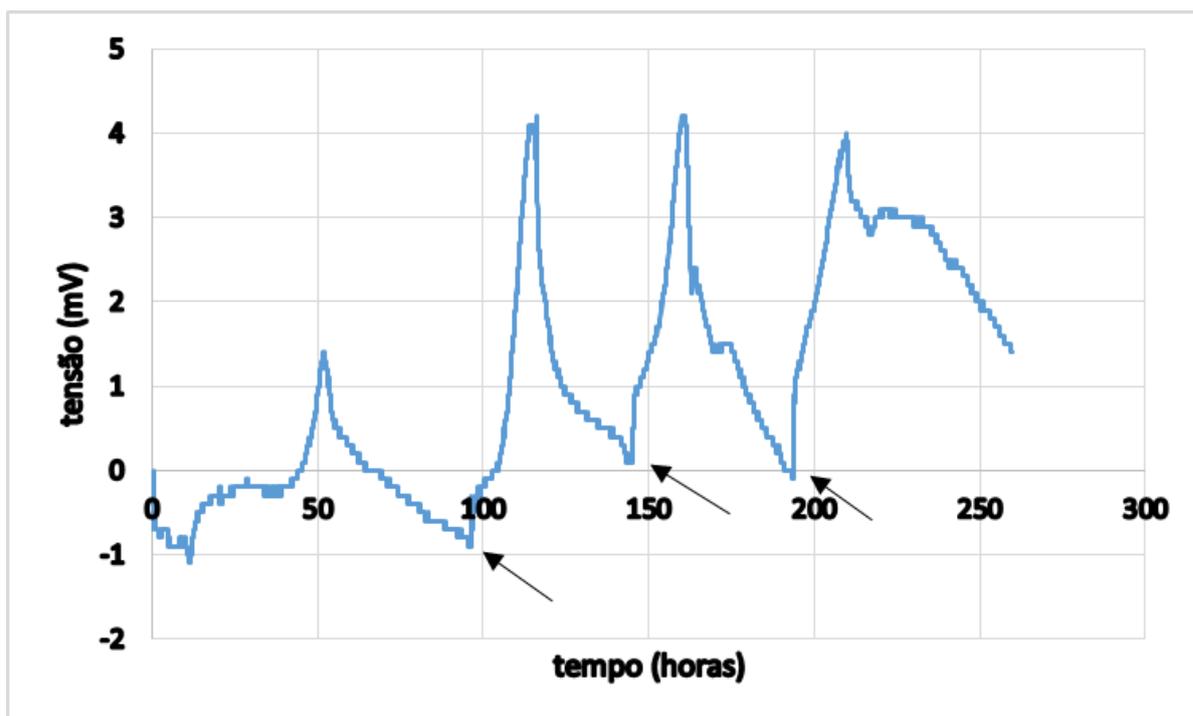


Gráfico 3. Teste de estabilidade de resposta. As flechas marcam os pontos de injeção de glicose.

Como pode ser observado no gráfico 3, as curvas apresentam respostas bastante semelhantes, denotando a estabilidade da CCM e demonstrando que é a oxidação da glicose, realizada pelo metabolismo da bactéria, a responsável pela geração de DPE, e não devido a qualquer outro fator. Nota-se com clareza que a cada injeção de glicose (apontadas por flechas pretas no gráfico) a DPE sobe instantaneamente. Isto também pode ser observado em Aktan (2011) e Wu et al. (2014).

Embora a primeira curva pareça ser diferente das demais, ela é bastante semelhante, diferindo apenas o seu pico de resposta, o que pode ser explicado pela formação do biofilme: o biofilme ainda não está formado, de modo que ainda não há uma interação entre as bactérias e o eletrodo. Neste período, as bactérias consumiram boa parte da glicose na formação do biofilme, para então começar a gerar a DPE. Assim, quando do início da transferência de elétrons, pouca glicose terá restado para ser consumida, refletindo no pico de DP.

6.1.3 CCMs Em Alimentação Intermitente

Nos gráficos 4 e 5 são apresentados os resultados das CCMs inoculadas com *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, respectivamente. As CCMs inoculadas com *B. subtilis* apresentaram picos de DPE de 7,2 mV e 9 mV, ao passo que as inoculadas com *P. aeruginosa* tiveram picos de DPE de 12,5 mV e 8,5 mV.

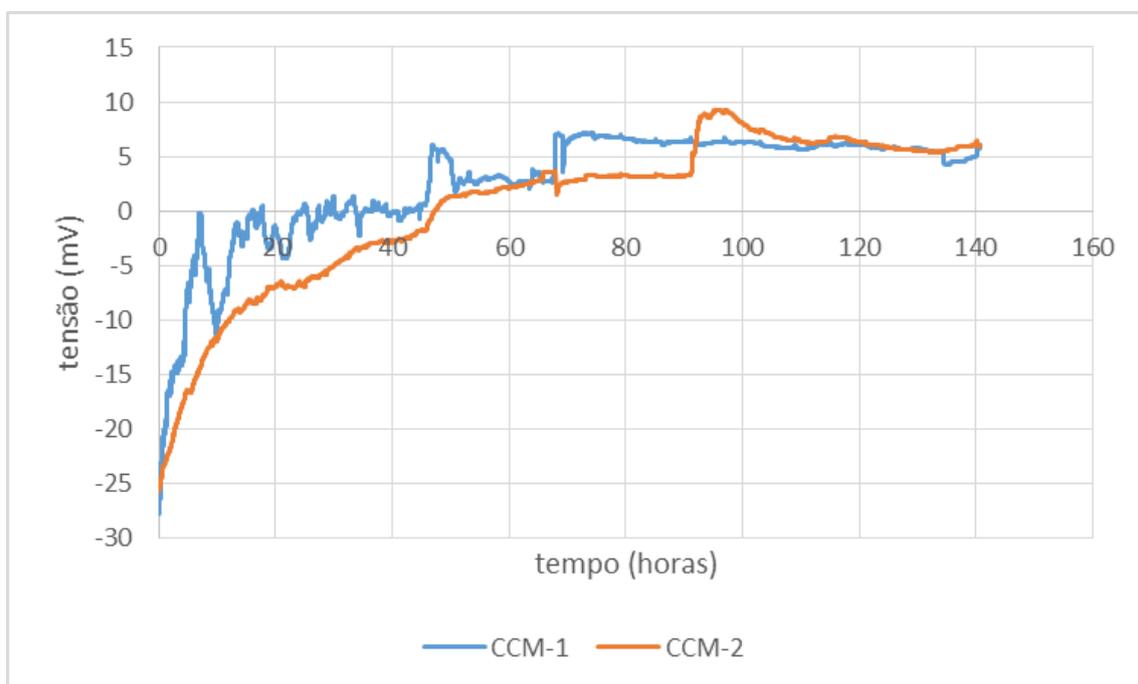


Gráfico 4. Geração de diferença de potencial elétrico por CCM de alimentação intermitente, inoculadas com *B. subtilis*.

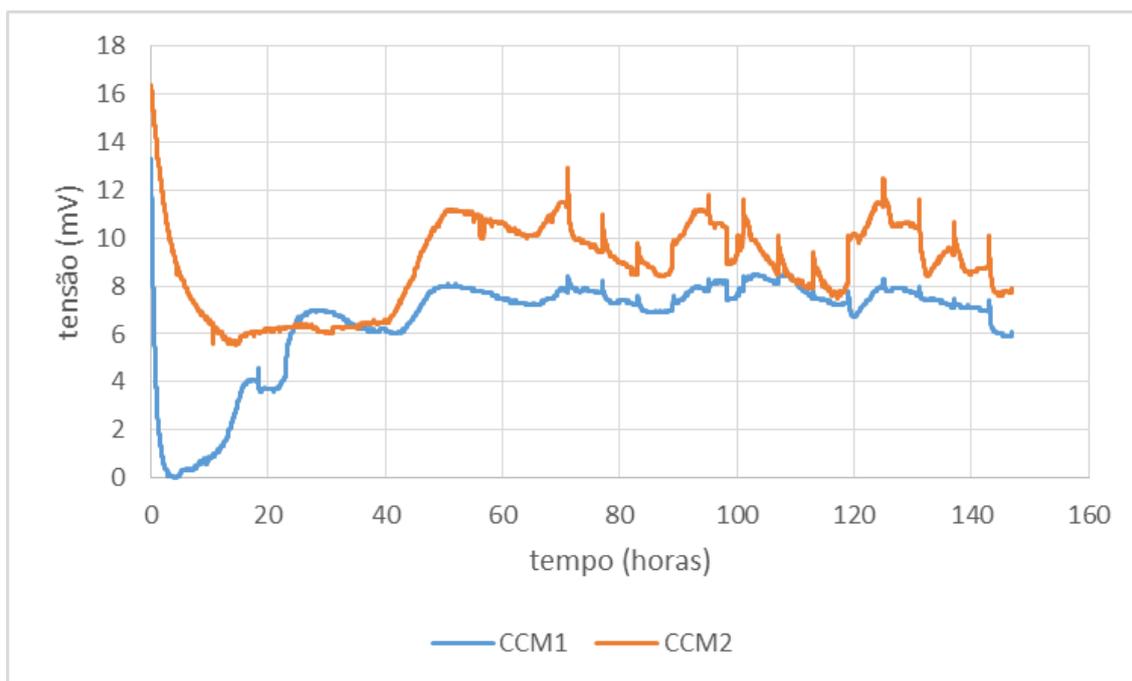


Gráfico 5. Geração de diferença de potencial elétrico por CCM de alimentação intermitente, inoculadas com *P. aeruginosa*.

É interessante notar que, nos pontos onde ocorrem a alimentação, instantaneamente há picos de DPE que em pouco tempo retornam ao seu patamar normal, como pode ser observado nos gráficos 4 e 5. Nota-se, ainda, que eles são mais pronunciados nas CCMs inoculadas com *P. aeruginosa* do que com *B. subtilis*, o que pode ser atribuído a maior concentração de glicose injetada naquela.

Também é importante salientar que as duplicatas apresentaram comportamentos semelhantes, atestando a fidedignidade dos resultados. Apenas ocorre, como é demonstrado nos gráficos 4 e 5, que uma das CCMs, tanto inoculada com *P. aeruginosa* como com *B. subtilis*, apresentam picos de instabilidade de DPE, ao passo que a outra opera de maneira mais estável e uniforme. Isso, provavelmente, pode ser resultado de pequenas diferenças construtivas, visto que são CCMs construídas de forma artesanal, sem grande nível de precisão entre as duplicatas. Mas, a despeito dessas diferenças, as CCMs mostram-se bastante satisfatórias quanto ao comportamento e reprodutibilidade, visto que em ambos os experimentos as curvas de DPE ocorrem quase que paralelo, salvo as oscilações mencionadas.

Quanto a relação de inóculo e geração de DPE, ambas as bactérias utilizadas apresentaram níveis baixos de geração DPE, tendo a *P. aeruginosa* exibido uma

geração um pouco mais alta, o que pode ser atribuído à concentração mais alta de glicose que foi administrada. No gráfico 6 esta relação pode ser observada com maior clareza.

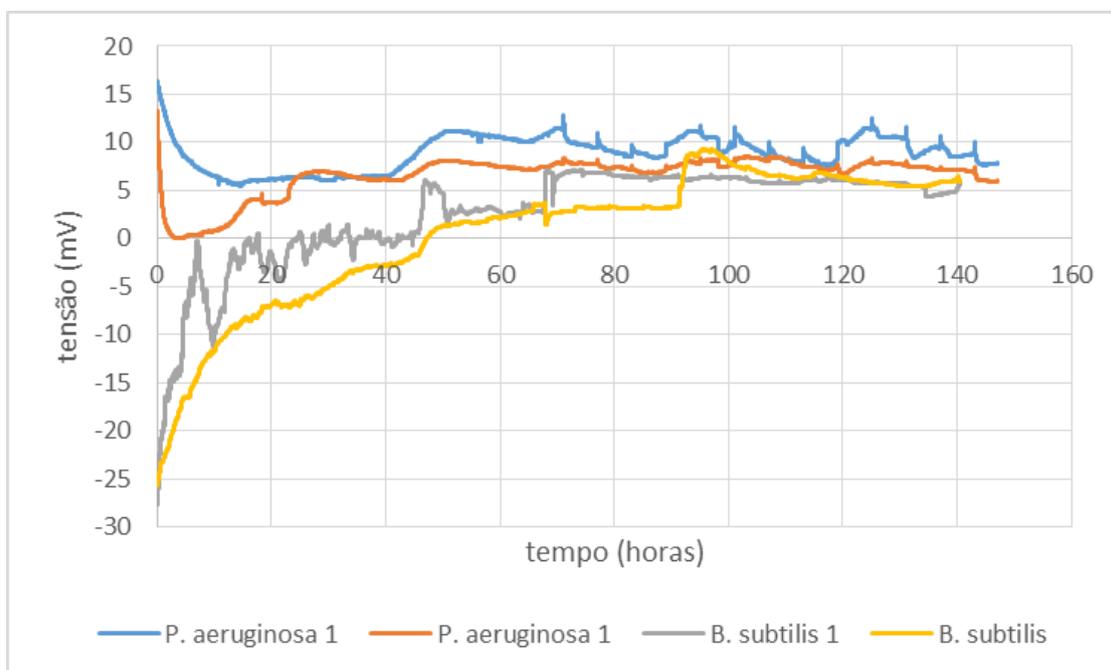


Gráfico 6. Comparação de geração de DPE entre CCMs inoculadas com *P. aeruginosa* e com *B. subtilis*.

A baixa DPE gerada pela *B. subtilis* já foi discutida no item 6.1.2. Quanto à baixa DPE apresentada pela *P. aeruginosa*, este é um fato esperado, já comentado por Qiao et al. (2014), sendo o seu maior atrativo a capacidade de produção de mediadores naturais, podendo ela ser empregada com sucesso em consórcios microbianos.

6.2 Curvas de Polarização

No experimento com CCMs de 90 mL, realizou-se as curvas de polarização (CPs) sem a presença de mediador de elétrons, utilizando uma série de resistores com valores variando entre 56 e 4000 Ω . Devido à baixa DPE gerada pela *B. subtilis*,

a CP não respondeu à Lei de Ohm, que afirma que a corrente em função da tensão é linear (HALLIDAY; RESNICK; WALKER; 2009). Como pode ser observado no gráfico 7, os valores de resposta foram espúrios de acordo com esta Lei.

De modo a possibilitar a realização da CP, no quinto dia foi injetado, com membrana de $0,22 \mu\text{m}$, $1,5 \text{ g/L}$ de azul de metileno, o qual funciona como mediador de elétrons, para aumentar a geração de DPE; e foi empregado uma série de resistores com valores variando entre 100 e 16040Ω . No gráfico 8 é apresentada a CP realizada. Pode se observar que sob estas condições torna-se possível a mesma, apresentando o coeficiente de regressão linear (R^2) o valor de $0,9871$. No gráfico 9 é exibida a CP plotada tensão e potência versus resistência, onde a linha tracejada marca o ponto de potência máxima, que é quando opera com uma resistência externa de 4000Ω , ou seja, o valor de resistência externa que se iguala com a o valor da resistência interna da CCM (IRWIN, 2008).

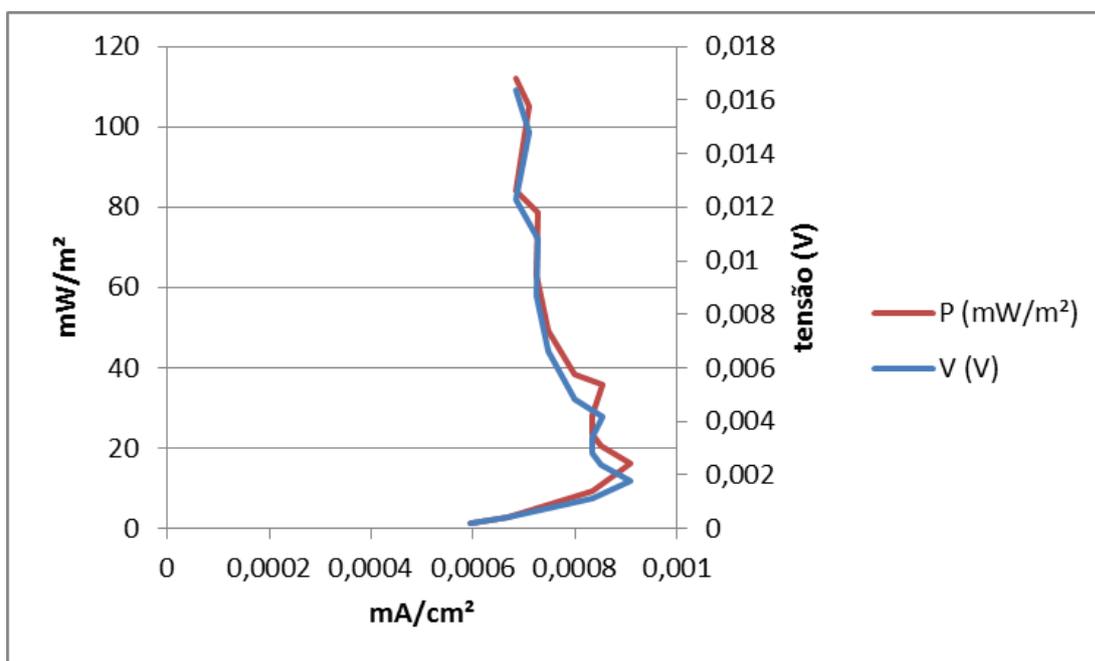


Gráfico 7. Curva de polarização sem a presença de mediador, plotada tensão e potência versus corrente.

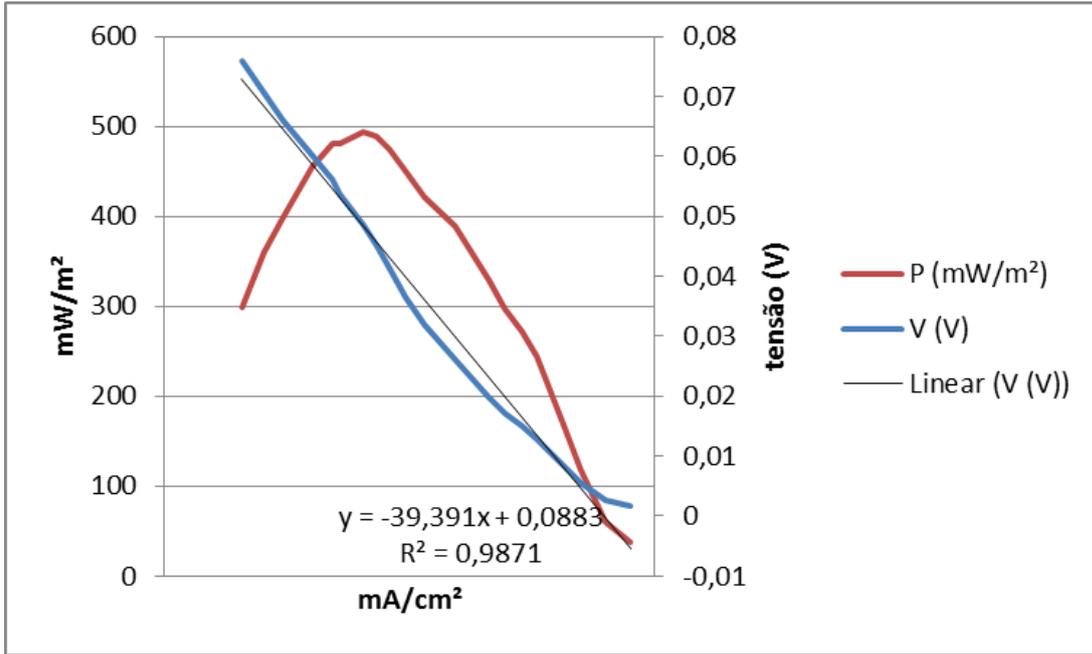


Gráfico 8. Curva de polarização com o uso de mediador, plotada tensão e potência versus corrente.

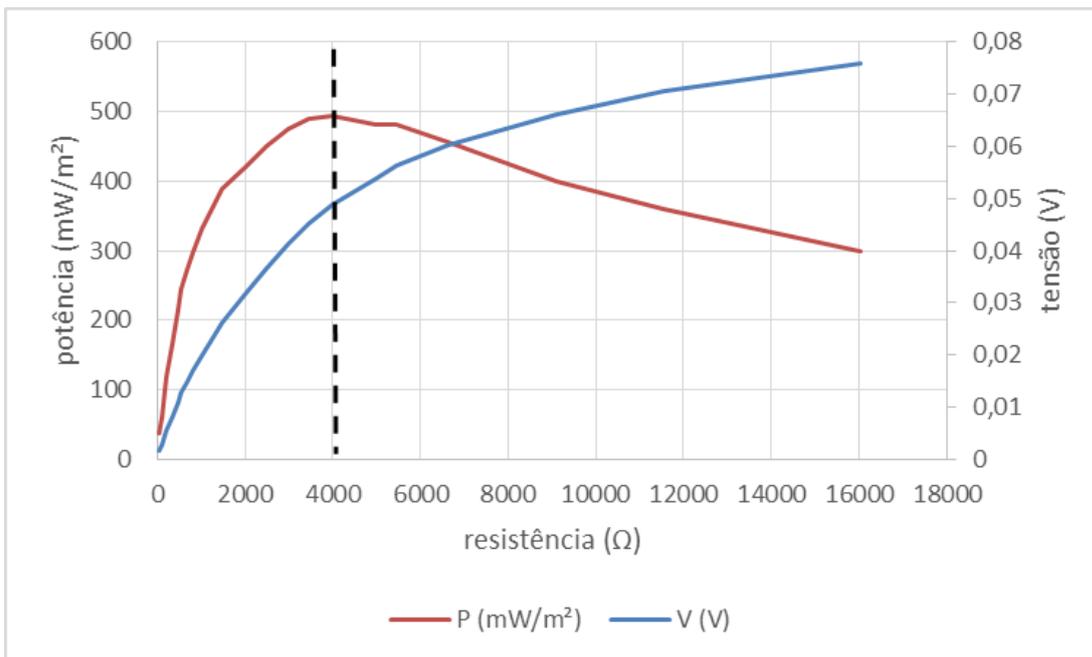


Gráfico 9. Curva de polarização com o uso de mediador, plotada tensão e potência versus resistência.

6.3 ANÁLISE DE AÇUCARES REDUTORES

6.3.1 Curva de Calibração

A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução estoque de glicose de 1g/L, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Preparo das diluições de glicose para a realização da curva de calibração para o teste de açúcares redutores.

Ponto da curva	Glicose 10g/L (ml)	Água (mL)	Concentração de glicose (g/L)
1	1	-	1,00
2	3	1	0,75
3	2	2	0,50
4	1	3	0,25
5	1	7	0,125
6	1	15	0,0625

No gráfico 10 é apresentada a curva de calibração da análise de açúcares redutores. O seu coeficiente de regressão linear (R^2) é de 0,9999.

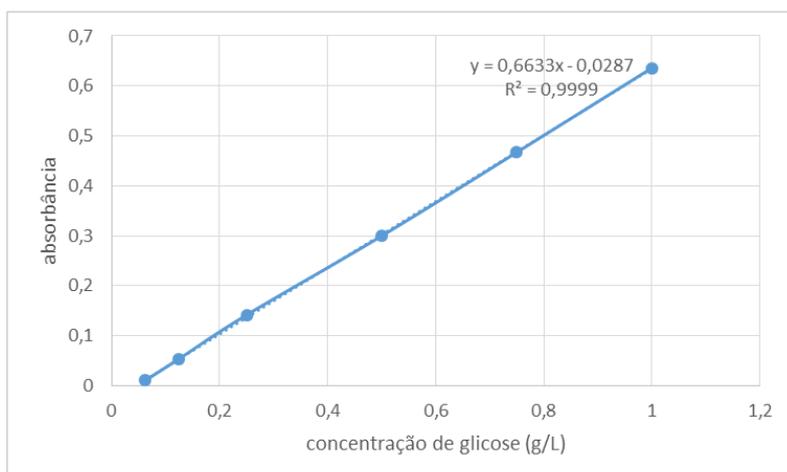


Gráfico 10. Curva de calibração da análise de açúcares redutores.

6.3.2 Análise de Açúcares Redutores das CCMs em Sistema de Alimentação Intermitente

No experimento com CCMs de alimentação intermitente (item 6.1.3), realizou-se o teste de açúcares redutores com o objetivo de se avaliar a geração de DPE e a eficiência na degradação de glicose. Diversos trabalhos (AHMED; ROZAIK; ABDEL-HALIM, 2015; WU et al., 2014; RABAEY et al., 2003) correlacionam estes fatores e encontram uma resposta instantânea entre a adição de glicose e o aumento de DPE. No presente tópico, porém, não se buscou esta relação direta. Como a intenção era desenvolver uma CCM de fluxo intermitente que apresentasse estabilidade de DPE, a relação encontrada entre estes fatores foi, até certo ponto, o nível remanescente de glicose estável e a geração constante de DPE. Nos gráficos 11 e 12, observa-se o aumento da DPE no início de operação das CCMs, e concomitante consumo da glicose.

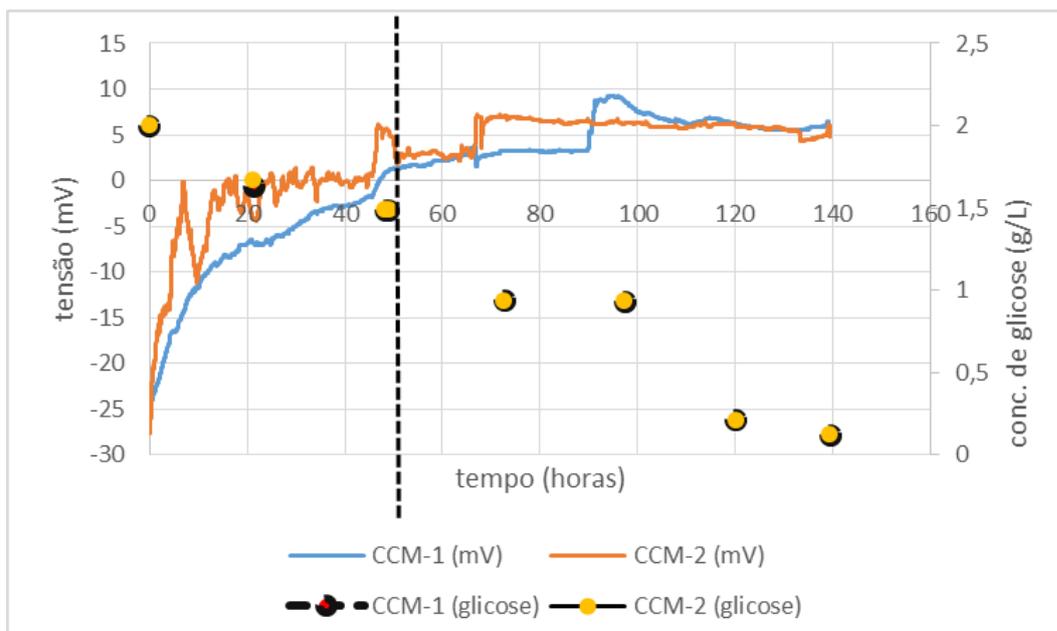


Gráfico 11. Geração de DPE versus consumo de glicose, por CCMs inoculadas por *B. subtilis*. Linha tracejada marca o início da alimentação da CCM.

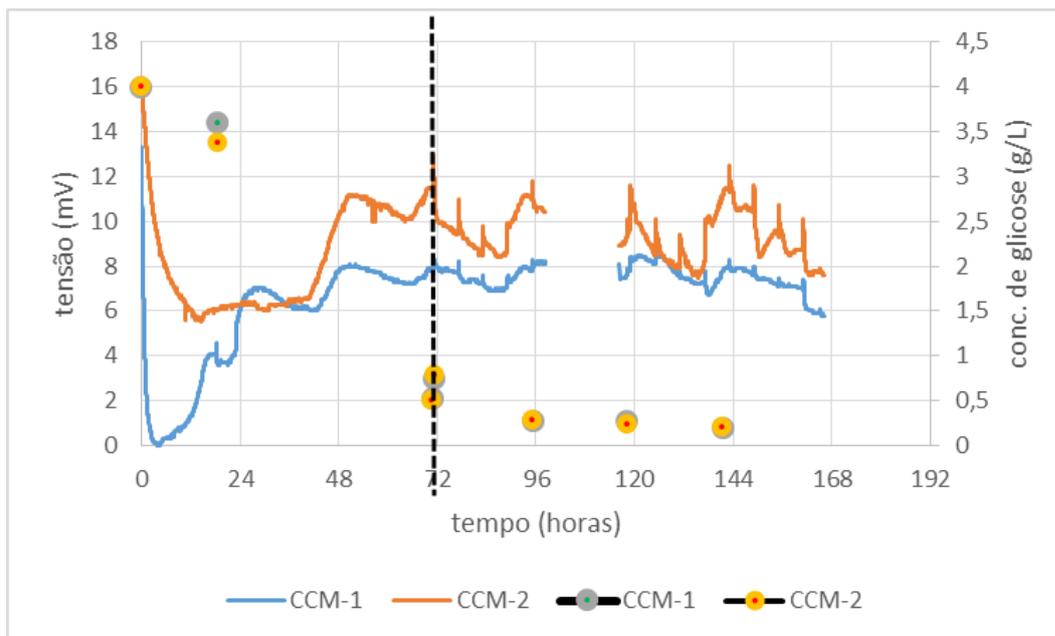


Gráfico 12. Geração de DPE versus consumo de glicose, por CCMs inoculadas com *P. aeruginosa*. A interrupção de DPE são dados perdidos. Linha tracejada marca o início da alimentação da CCM.

Nas CCMs inoculadas com *B. subtilis*, a exemplo das CCMs já estudadas com o mesmo inóculo, sua DPE inicia-se negativa, e passa a aumentar com o tempo, conforme a bactéria vai se multiplicando e formando o biofilme no ânodo. Isso, ao que parece, provavelmente, seja uma característica própria da *B. subtilis*. Por outro lado, as CCMs inoculadas com *P. aeruginosa* partem de uma DPE positiva e que, progressivamente, vai declinando, para então voltar a subir, conforme o biofilme vai sendo formado. Este comportamento sugere que a *P. aeruginosa* tenha maior facilidade de transferir o seu elétron ao eletrodo, em virtude desta ser capaz de produzir o seu próprio mediador de elétrons, no caso a piocianina (PYO) (QIAO et al., 2014).

As linhas tracejadas, nos gráficos 11 e 12, marcam o momento em que se inicia a alimentação das CCMs. Observa-se que, tanto nas CCMs inoculadas com *B. subtilis* quanto nas inoculadas com *P. aeruginosa*, passam a operar de maneira estável. Nestas, a DPE de uma das CCMs estabiliza-se numa faixa de 10mV (± 2 mV), e a outra numa faixa de 7mV (± 1 mV). Naquelas, em ambas, a DPE permanece na faixa de 6mV, sendo que uma (em laranja no gráfico 14) mostra-se mais constante que a sua duplicata, que apresenta uma maior oscilação (± 3 mV).

Importante notar que as CCMs operadas com *B. subtilis*, embora a sua concentração de glicose seja menor que a utilizada com *P. aeruginosa*, demore mais

tempo para consumir a glicose, levando em torno de 120h para estabilizar a sua concentração de glicose efluente; ao passo que a CCMs inoculadas com *P. aeruginosa* tem um consumo de glicose mais acelerado no início de sua partida, estabilizando a sua glicose efluente em torno de 96h. Isso provavelmente esteja relacionado ao tempo de geração das bactérias: *P. aeruginosa* apresenta tempo de duplicação de 30 minutos em condições aeróbias em meio rico nutriente e 50 minutos em condições anaeróbias (HASSETT et al., 2004), enquanto o tempo de duplicação de *B. subtilis* é em torno de 120 minutos (BURDETT; KIRKWOOD; WHALLEY, 1986).

Após a estabilização da DPE e da concentração de glicose, observa-se uma eficiência de degradação da glicose próxima de 90% e 92% para CCMs inoculadas com *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Uma eficiência de remoção bastante satisfatória para CCMs operadas com inóculos puros. Em um trabalho em que utilizam consórcios microbianos, como lodo anaeróbico, a eficiência de remoção pode chegar a 94,3% (AHMED; ROZAIK; ABDEL-HALIM, 2015).

6.4 MONITORAMENTO DO PH

No gráfico 13 são apresentadas as variações do pH das CCMs em função do tempo, do item 6.1.1.

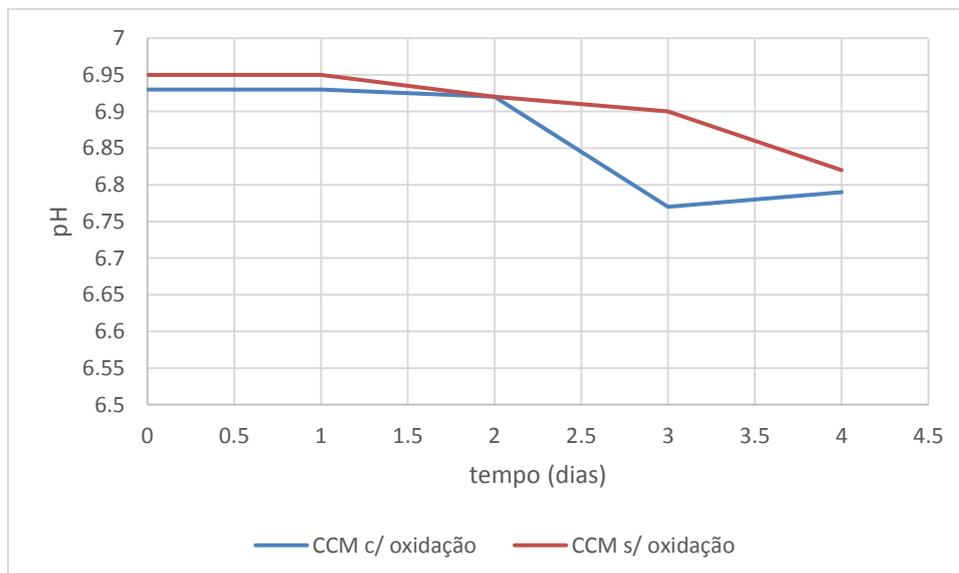


Gráfico 13. Acompanhamento do pH das CCMs ao longo do tempo do item 6.1.1

Em ambas as CCMs o pH apresentou baixa variação, não mais que 0,1. Isso decorre em razão de dois fatores: 1- o pH do meio é tamponado, e 2- a taxa de transferência de prótons H^+ da MTP é bastante eficiente, estando um pouco abaixo da taxa de produção de prótons pelas bactérias JADHAV; GHANGREKAR, 2009).

A baixa variação do pH, como o apresentado, é algo bastante desejável e de grande importância para o funcionamento ótimo das CCMs, visto que a maioria das bactérias apresentam crescimento melhor em pH próximo da neutralidade (TORTORA; FUNKE; CASE; 2010). O pH ótimo para a *P. aeruginosa* está situado entre 6,6 e 7,0 (WISE, 1994), e para *B. subtilis* entre 6,5 e 7,0 (YOUNIS et al., 2010).

Para as CCMs 6.1.2, devido aos seus reduzidos volumes (90mL), não foi possível a utilização de pHmetro. Assim sendo, utilizou-se para a medição de pH fita indicadora pH-fix 0-14, da marca Macherey-Nagel. Por este método foi possível constatar que o pH das CCMs manteve-se estável próximo de 7,0. Deste modo, o exposto para o experimento 6.1.1 é válido para este experimento.

Nos gráficos 14 e 15 são apresentadas as variações de pH para as CCMs de alimentação intermitente inoculadas com *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, respectivamente (item 6.1.3).

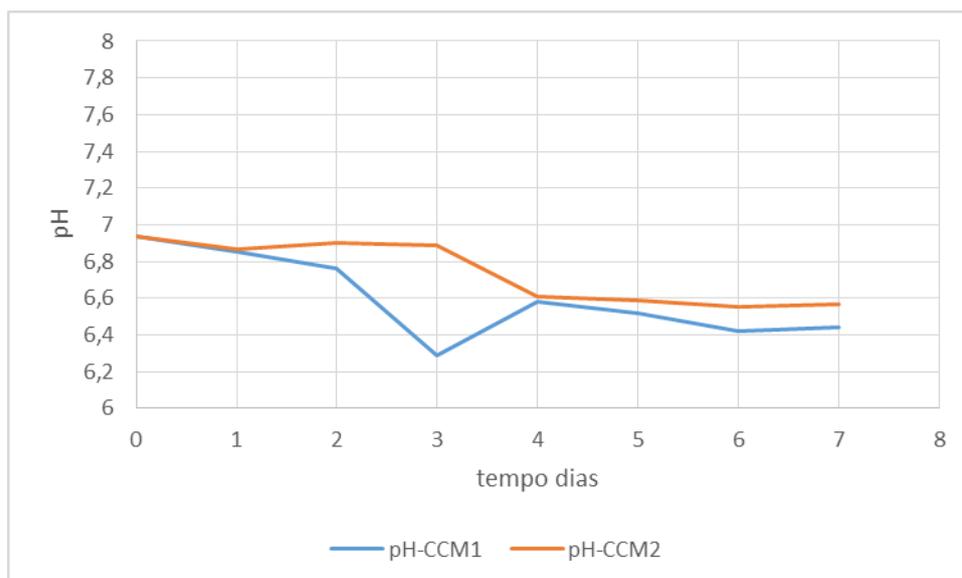


Gráfico 14. Acompanhamento do pH das CCMs inoculadas com *B. subtilis* ao longo do tempo do item 6.1.3.

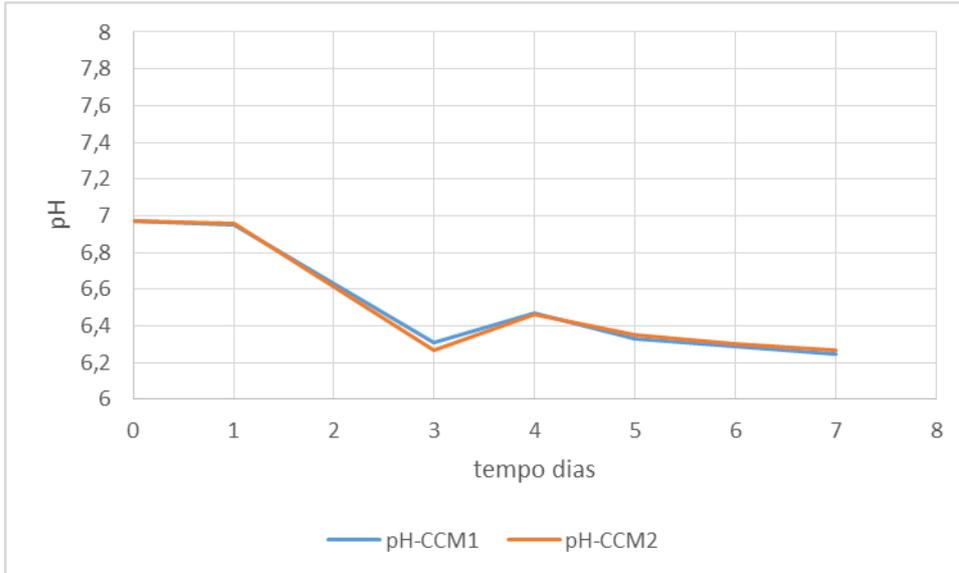


Gráfico 15. Acompanhamento do pH das CCMs inoculadas com *P. aeruginosa* ao longo do tempo do item 6.1.3.

Observa-se no gráfico 14 que o pH das CCMs inoculadas com *B. subtilis* mostraram leve divergência inicial de uma para outra. Enquanto uma apresentou pH mais constante próximo de 7,0, a outra exibiu uma queda de 0,6. Porém, após a alimentação, o pH de ambas veio a se estabilizar numa faixa perto de 6,5.

O pH das CCMs inoculadas com *P. aeruginosa* exibiram comportamentos bastante similares, com valores muito aproximados ao longo do tempo. De início, o pH mostra tendência para forte queda a partir do segundo dia, em comparação com as CCMs operadas com *B. subtilis*, chegando ambas a um valor perto de 6,3. Depois de iniciada a alimentação, o pH das CCMs ainda demonstra tendência a diminuir, com menor intensidade, porém. Isso ocorre porque, provavelmente, a taxa de produção de prótons desta bactéria é maior que a taxa de transferência de prótons pela MPT, evidenciando a importância da troca periódica de parte do meio por alimentação intermitente, como pode ser visto no gráfico 15.

7 CONCLUSÕES

A avaliação do efeito da oxidação dos cabos de fixação dos eletrodos na geração de DPE em CCMs possibilitou constatar que a ocorrência de oxidação promove alta taxa de DPE em um processo de oxirredução, e não devido à atividade eletrogênica da bactéria, o que pode falsear resultados e, conseqüentemente, pode levar a conclusões errôneas.

Foi verificado que a atividade eletrogênica das bactérias *B. subtilis* e *P. aeruginosa* é consideravelmente baixa. Assim sendo, *B. subtilis* não é uma bactéria muito indicada para ser empregada em CCMs. E quanto a *P. aeruginosa*, esta mostra-se atrativa quando empregado em consórcios microbianos, devido à sua capacidade de produzir mediadores naturais que poderão ser utilizados pelas bactérias do consorcio.

O uso de mediador em CCMs apresentou grande efeito na geração de DPE, dando um acréscimo de quase 250%. Apesar disso, o seu uso é pouco recomendado, tanto por questões de toxicidade como por razões econômicas.

As CCMs em alimentação intermitente se mostraram funcionais e apresentaram estabilidade na geração de DPE, consumo de glicose e pH do meio. O maior problema observado foi em relação as bactérias utilizados, que são muito pouco eletrogênicas.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar experimentos com bactérias altamente eletrogênicas como *Shewanella oniedensis* e *Geobacter sulfurreducens*.
- Utilizar consórcios microbianos ao invés de culturas puras, buscando obter maior eficiência das CCMs.
- Utilizar resíduos da indústria como fonte de carbono para o funcionamento das CCMs, objetivando estudar alternativas de tratamento dos mesmos com valor agregado pela recuperação de energia.
- Empregar bombas de alimentação mais refinadas no intuito de otimizar a estabilidade de geração de DPE e aumentar a eficiência de remoção de matéria orgânica.
- Construir CCMs de câmara única de fluxo contínuo.

REFERÊNCIAS

AHMED, Safwat; ROZAIK, Ehab; ABDEL-HALIM, Hisham. Performance of single-chamber microbial fuel cells using different carbohydrate-rich wastewaters and different inocula. **Pol. J. Environ. Stud**, v. 25, n. 2, p. 503-510, 2016.

AKTAN, Sevil. **Effects of antibiotics and hormones on electricity generation using microbial fuel cells**. 2011. 120 f. Tese (PhD em Biotecnologia Ambiental) – Department of Environmental Engineering, Istanbul Technical University, Haziran, 2011.

American Type Culture Collection. **Bacillus subtilis subsp. spizizenii Nakamura et al. (ATCC® 6633™)**. Disponível em <<http://www.atcc.org/Products/All/6633.aspx#generalinformation>>. Acesso em: 29 mai. 2016.

AN, Junyeong; SIM, Junyoung; LEE, Hyung-Sool. Control of voltage reversal in serially stacked microbial fuel cells through manipulating current: Significance of critical current density. **Journal of Power Sources**, v. 238, p. 19-23, jun. 2015.

ANGENENT, Largus T.; KARIM, Khursheed; AL-DAHAN, Muthanna H.; WRENN, Brian A.; DOMÍGUEZ-ESPINOSA, Rosa. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 477–485, set. 2004.

BURDETT, I. D. J.; KIRKWOOD, T. B. L.; WHALLEY, J. B. Growth kinetics of individual *Bacillus subtilis* cells and correlation with nucleoid extension. **Journal of Bacteriology**, v. 167, n. 1, p. 219-230, jul. 1986.

BUSALMEN, Juan P.; ESTEVE-NÚÑEZ A. BERNÁ A.; FELIU J.M. C-type cytochromes wire electricity-producing bacteria to electrodes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 26, p. 4874-4877, jun. 2008.

CHANG, I. S.; MOON, H.; BRETSCHGER, O.; JANG, J.K.; PARK, H. I.; NEALSON, K. H.; KIM, B. H. Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 163–177, mai. 2006.

DU, Zhuwei; LI, Haoran; GU, Tingyue. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 464-482, out. 2007.

FALCÓN, Axel; LOZANO, J. Esteban; JUÁREZ, Katy. Bioelectricidad. **BioTecnología**, v.13, n. 3, 2009.

GARCÍA-VILLARRUBIA, Araceli G. C. **Valorización energética y tratamiento de efluentes residuales mediante celdas de combustible microbiológicas**. 2015. 387 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Ambiental) – Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Castilla-la Mancha, Ciudad Real, 2015.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de Física**. Vol. 3. 8 ed. Rio de Janeiro, LTC, 2009.

HASSETT, Daniel J.; LYMAR, Sergei V.; ROWE, John J.; SCHURR, Michael J.; PASSADOR, Luciano; HERR, Andrew B.; WINSOR, Geoffrey L.; BRINKMAN, Fiona S. L.; YOON, Sang S.; LAU, Gee W.; HWANG, Sung H. Anaerobic metabolism by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airway biofilms: role of nitric oxide, quorum sensing, and alginate production. In: NAKANO, Michiko M.; ZUBE, Peter. **Strict and facultative anaerobes: medical and environmental aspects**. New York: CRC Press. 2004. p. 88-108.

HE, Zhen, ANGENENT, Largus T. Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. **Electroanalysis**, v. 18, n. 19-20, p. 2009-2015, out. 2006.

HEIJNEA, Annemiek ter; HAMELERSA, Hubertus V.M.; SAAKESB, Michel; BUISMAN; Cees J.N. Performance of non-porous graphite and titanium-based anodes in microbial fuel cells. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 18, p. 5697-5703, jul. 2008.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J.; RÍOS, A. Pérez de los.; Salar-García, M.J.; ORTIZ-MARTÍNEZA, V.M.; LOZANO-BLANCOA, L.J. GODÍNEZA, C.; TOMÁS-ALONSO, F.; QUESADA-MEDINA J. Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. **Fuel Processing Technology**, v. 138, p. 284-297, out. 2015.

HOSSEINI, Mir G.; AHADZADEH, Iraj. Electrochemical impedance study on methyl orange and methyl red as power enhancing electron mediators in glucose fed microbial fuel cell. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 4, p. 617-621, jul. 2013.

IEROPOULOS, Ioannis A.; LEDEZMA, Pablo; STINCHCOMBE, Andrew; PAPA HARALABOS, George; MELHUISHA, Chris; GREENMAN, John. Waste to real energy: the first MFC powered mobile phone. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, p. 15312-15316, jul. 2013.

IEROPOULOS, Ioannis A.; GREENMANA, John; MELHUISHA, Chris HART, John. Comparative study of three types of microbial fuel cell. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 238-245, jul. 2005.

IRWIN, J. D. **Basic engineering circuit analysis**. 9. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

ISMAIL, Zainab Z.; JAEEL, Ali J. Sustainable Power Generation in Continuous Flow Microbial Fuel Cell Treating Actual Wastewater: Influence of Biocatalyst Type on Electricity Production. **The Scientific World Journal**, v. 2013, dez. 2013.

JIMAT, Dzun N. **Bioprocess Intensification: Production of α -amylase by immobilised *Bacillus subtilis* in porous polymeric PolyHIPE**. 2011. 275f. Tese (PhD em Engenharia Química) – School of Chemical Engineering and Advanced Materials, Newcastle University, 2011.

KUS, Julianne V. **Diversity of pseudomonas aeruginosa type iv pilins and identification of a novel d-arabinofuranose post-translational modification**. 2008. 257 f. Tese (PhD em Odontologia) – Department of Dentistry, University of Toronto, Toronto, 2008.

LEONG, Jun X.; DAUD, Wan R. W.; GHASEMI, Mostafa; LIEW, Kien Ben; ISMAIL, Manal. Ion exchange membranes as separators in microbial fuel cells for bioenergy conversion: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 28, p. 575-587, dez. 2013.

LEWIS, kenneth. Symposium on Bioelectrochemistry of Microorganisms: IV. Biochemical Fuel Cells. **Bacteriological Reviews**, v. 30, n. 1, p. 101-113, mar. 1966.

LIU, Hong; Logan, Bruce E. Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. **Environ. Sci. Technol.**, v. 38, n. 14, p. 4040-4046, jun. 2004.

LOGAN, Bruce E.; MURANO, Cassandro; SCOTT, Keith; GRAY, Neil D.; HEAD, Ian M. Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell. **Water Research**, v. 39, n. 5, p. 942-952, mar. 2005.

LOGAN, Bruce E., **Microbial Fuel Cells**, 1 ed.; New York, Willey 2008.

LOGAN, Bruce E.; HAMELERS, Bert; ROZENDAL, René; SCHRÖDER, Uwe; KELLER, Jürg; FREGUIA, Stefano; AELTERMAN, Peter; VERSTRAETE, Willy; RABAEY, Korneel. Microbial Fuel Cells: Methodology and technology. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, n. 17, p. 5181-5192, jul. 2006.

LOVLEY, Derek R. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 497-508, Jul. 2006.

LUO, Jing; KONG, Jin-liang; DONG, Bi-ying; HUANG, Hong; WANG, Ke; WU, Li-hong; HOU, Chang-chun; LIANG, Yue; LI, Bing; CHEN, Yi-qiang. Baicalein attenuates the quorum sensing-controlled virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and relieves the inflammatory response in *P. aeruginosa*-infected macrophages by downregulating the MAPK and NF κ B signal-transduction pathways. **Drug Des Devel Ther**, v. 10, p. 183-203, jan. 2016.

MAHENDRA, B.G.; MAHAVARKAR, Shridhar. Treatment of wastewater and electricity generation using microbial fuel cell technology. **IJRET**, v. 2, n. 13, p. 277-282, nov. 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MOKHTARIAN, Nader; DAUD, Wan R. W.; RAHIMNEJAD, Mostafa; NAJAFPOUR, Ghasem D. Bioelectricity generation in biological fuel cell with and without mediators. **World Applied Sciences Journal**, v. 18, n. 4, p.559-567, Jan. 2012.

NIMJE, Vanita R.; CHEN, Chien-Yen; CHEN, Chien-Cheng; JEAN, Jiin-Shuh; REDDY, A. S.; FAN, Cheng-Wei; Pan, Kuan-Yeu; LIU, Hung-Tsan; CHEN, Jia-Lia. Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. **Journal of Power Sources**, v. 190, n. 2, p. 258–263, mai. 2009.

PACCEZ, Juliano D. **Aplicação de linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* no desenvolvimento de vacinas de mucosas contra patógenos entéricos.** 2007. 90f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

QIAO, Yan; QIAO, Ya-Juan; ZOU, Long; MA, Cai-Xia ; LIU, Jian-Hua. Real-time monitoring of phenazines excretion in *Pseudomonas aeruginosa* microbial fuel cell anode using cavity microelectrodes. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 1-6, dez. 2015.

RABAEY, Korneel; LISSENS, Geert; SICILIANO, Steven D.; VERSTRAETE, Willy. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. **Biotechnology Letters**, v. 25: p. 1531–1535, 2003.

RAMALAKSHMI, M.; AKILA, S.; SHARIEF, S. D. Generation of electricity from a low cost microbial fuel cell. **Nature Environment and Pollution Technology**, v.12, n. 2, p. 243-248, jun. 2013.

READ, Suzanne T.; DUTTA, Paritam; BOND, Phillip L.; KELLER, Jürg; RABAEY, Korneel. Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 98, abr. 2010.

REVELO, Dolly M.; HURTADO; Nelson H.; RUIZ; Jaime O. Celdas de combustible microbianas (ccms): un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. **Información Tecnológica**, v. 24, n. 6, p. 17-28, jun. 2013.

RISMANI-YAZDI, Hamid; CARVERB, Sarah M.; CHRISTYA, Ann D.; TUOVINENB, Olli H. Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview. **Journal of Power Sources**, v. 180, n. 2, p. 683–694, jun. 2008.

SCHRÖDER, Uwe. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 21, p. 2619-2629, mai. 2007.

SLEPECKY, R. A.; HEMPHILL, H. E. The Genus Bacillus-Nonmedical. **Prokaryotes**, v.4, p. 530-562. 2006.

STEIN, Nienke E.; HAMELERS, Hubertus M.V.; STRATEN; Gerrit van; KEESMAN, Karel J. On-line detection of toxic components using a microbial fuel cell-based biosensor. **Journal of Process Control**, v. 22, n. 9, p. 1755– 1761, out. 2012.

SUN, Min; ZHANG, Feng; TONG, Zhong-Hua; SHENG, Guo-Ping ; CHEN, Yong-Zhen; ZHAO, Yue; CHEN, You-Peng , ZHOU, Shi-Yue; LIU, Gang; TIAN, Yang-Chao; YU, Han-Qing. A gold-sputtered carbon paper as an anode for improved electricity generation from a microbial fuel cell inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 2, p. 338-343, out. 2010.

TARDAST, Ali; RAHIMNEJAD, Mostafa; NAJAFPOUR, Ghasem; GHOREYSHI, Ali A.; ZARE, Hossein. Fabrication and operation of a novel membrane-less microbial fuel cell as a bioelectricity generator. **Iranica Journal of Energy & Environment**, n. 3, p. 1-5, jan. 2012.

TEKLE, Yibrah; DEMEKE, Addisu. Review on microbial fuel cell. **Basic Research Journal of Microbiology**, v. 2, n.1, p. 05-17, ago. 2015.

TORTORA.G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **MICROBIOLOGIA**. 10 ed. São Paulo: Artmed, 2011.

VOSS, Glenise B. **Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores airlift e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro**. 2013. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

WIEGAND, Irith; HILPERT, Kai; HANCOCK, Robert E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163-175, jan. 2008.

WISE, Donald L.; TRANTOLO, DEBRA J. **Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils**. 1 ed. New York, CRC Press, 1994.

WU, Wenguo; LESNIK, Keaton L.; XU, Shoutao; WANG, Luguang; LIU, Hong. Impact of tobramycin on the performance of microbial fuel cell. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 91, jul. 2014.

YANG, Huijia, ZHOU, Minghua; LIU, Mengmeng; YANG, Weilu; GU, Tingyue. Microbial fuel cells for biosensor applications. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 12, p. 2357-2364, dez. 2015.

YOUNIS, Magdi A. M.; HEZAYEN, Francis F.; NOUR-ELDEIN, Moustafa A.; SHABEB, Mohamed S. A. Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. **Agric. & Environ. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 31-37, 2010.

ZHANG, Yifeng. **Energy recovery from waste streams with microbial fuel cell (MFC)-based technologies**. 2012. 65 f. Tese (PhD em Engenharia Ambiental) – Department of Environmental Engineering, Technical, University of Denmark, Kongens Lyngby, 2012.

ZHAO, Yu; WANG, Xiao B.; LI, Peng; SUN, Yan P. The Influence of Mediator Concentration on the Performance of Microbial Fuel Cell. **Advanced Materials Research**, v.512-515, p. 1520-1524, mai. 2012.

ZHOU, Minghua; CHI, Meiling; LUO, Jianmei; HE, Huanhuan; JIN, Tao. An overview of electrode materials in microbial fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 196, n. 10, p. 4427-4435, mai. 2011.