

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

**ANDRESSA MARIA SALLA JOHN
BRUNA CRISTINA VIEIRA LOPES**

**ACOMPANHAMENTO DA GERAÇÃO DE POTENCIAL ELÉTRICO
POR CELULA COMBUSTÍVEL MICROBIANA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2013**

ANDRESSA MARIA SALLA JOHN
BRUNA CRISTINA VIEIRA LOPES

ACOMPANHAMENTO DA GERAÇÃO DE POTENCIAL ELÉTRICO POR CELULA COMBUSTÍVEL MICROBIANA

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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlene Soares
Coorientadores: Prof. Dr Carlos M. G. S. Cruz
Tecn. Ambiental Andrew Fung

CURITIBA
2013

ANDRESSA MARIA SALLA JOHN
BRUNA CRISTINA VIEIRA LOPES

**ACOMPANHAMENTO DA GERAÇÃO DE POTENCIAL ELÉTRICO
POR CELULA COMBUSTÍVEL MICROBIANA**

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^a. Dr^a. Lucia Regina Rocha Martins
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – Prof^o. José Carlos Bianchi, Msc
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientadora – Prof^a. Dr^a. Marlene Soares
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenadora de Curso – Prof^a. Dr^a. Valma Martins Barbosa

Curitiba, 03 de maio de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos especialmente à Professora Doutora Marlene Soares, nossa orientadora, pela dedicação, atenção, apoio e paciência durante a elaboração e execução desse projeto.

Agradecemos ao Professor Doutor Carlos M. G. da Silva Cruz pela ajuda com o fornecimento de materiais.

Agradecemos ao Químico Ambiental Andrew Fung a atenção e ajuda com as pesquisas e materiais para a elaboração desse projeto.

Agradecemos principalmente aos nossos pais e amigos pela paciência, compreensão e apoio durante toda a realização do deste projeto.

RESUMO

JOHN, A.M.S.; LOPES, B.C.V. ACOMPANHAMENTO DA GERAÇÃO DE POTENCIAL ELÉTRICO POR CÉLULA COMBUSTÍVEL MICROBIANA. 2012. 72p. Trabalho de Conclusão (Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Curitiba. 2012.

A célula combustível microbiana (CCM) é um sistema que pode gerar energia elétrica ao mesmo tempo em que promove a biodegradação de matéria orgânica. O sistema se assemelha a uma pilha, sendo que os microrganismos ficam restritos ao ânodo. Durante o processo respiratório anaeróbico, no qual os nutrientes são mineralizados para geração de energia, o ânodo é utilizado como acceptor final dos elétrons, criando um fluxo ordenado pela célula até o catodo. O presente trabalho teve como objetivo montar células combustíveis microbianas e o acompanhar a geração de potencial elétrico, em experimentos em batelada com duração de 20 dias. Foram montadas CCM utilizando materiais de baixo custo, com compartimentos de 170 mL e com transferência dos prótons entre as câmaras anódica e catódica feita através de ponte salina. Foi realizado um delineamento experimental 2^3 , variando o microrganismo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), o substrato de cultivo (meio mineral e meio lactato) e o material do eletrodo (cobre-ferro e cobre – grafite). A diferença de potencial elétrico foi medida diariamente com multímetro. O experimento foi conduzido em duplicata, com temperatura mantida em 37°C. Os melhores resultados foram obtidos nas células com meio lactato e eletrodos de grafite (ânodo) e cobre (cátodo), para ambos os organismos. Nesta o potencial elétrico gerado diariamente atingiu 0,47 V para a célula inoculada com *E. coli* e 0,46 V com *P. aeruginosa*. A análise estatística ANOVA mostrou que o microrganismo e a interação entre o eletrodo e o substrato foram variáveis significativas na geração de potencial elétrico acumulado, sendo o maior valor observado com *P.aeruginosa*, cultivada em meio lactato e CCM tendo eletrodos de grafite-cobre (8,16 V).

Palavras-chave: Célula Combustível Microbiana. *Pseudomonas aeruginosa*. *Escherichia coli*. Bioconversão de Energia.

ABSTRACT

JOHN, A.M.S.; LOPES, B.C.V. MONITORING OF POTENCIAL GENERATION BY MICROBIAL FUEL CELLS. 2012. 72p. Completion of course work in Technology in Environmental Process, *Campus Curitiba* Federal Technological University of Parana. 2012.

The microbial fuel cell is a system which can generate electric power at the same time which degrades organic matter. The present work aims the installation and operation of microbial fuel cells and evaluation of electric power generation. The system is operated by the addition of a substrate to the cell. When substrate's nutrients are degraded occurs the conversion of the chemical bond energy into electrical energy by the process of respiration. The microbial fuel cells were made with ordinary materials, each chamber has 170mL of substrate and were connected by a salt bridge. Was realized a 2³ experiment, changing the microorganism (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), substrate (mineral and lactate) and the material of the electrode (copper – iron and copper – graphite). The experiment was made into duplicate, during 20 days with constant temperature of 37°C. The best results were obtained in cells with lactate medium and graphite (anode) and copper (cathode) electrodes. The MFC inoculated with *E. coli* peaked at 0.47 V and inoculated with *P. aeruginosa* reached 0.46 V on a daily measurement. The ANOVA statistical analysis showed that the microorganism and the interaction between the electrode and the substrate were significant variables in the generation of electric potential cumulative, with the highest value observed with *P. aeruginosa* grown in culture medium lactate and taking MFC copper-graphite electrodes (8, 16 V).

Keywords: Microbial fuel cells. *Pseudomonas aeruginosa*. *Escherichia coli*. Energy bioconversion.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 – Células combustíveis microbianas, implantadas em escala piloto, em cervejaria de Queensland, Austrália.....	22
Fotografia 2 - CCM composta por câmara anódica anaeróbica (esquerda), câmara catódica aerada (direita) e membrana de Nafion.	23
Fotografia 3 – Fotografia de sistema de acoplamento de CCM com geração de energia elétrica suficiente para mover um ventilador	24
Fotografia 4: <i>Escherichia coli</i> , microscopia eletrônica de varredura.....	31
Fotografia 5 – Fotografia de microscopia eletrônica de varredura da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Fotografia 6 - Biofilme formado pela bactéria <i>P. aeruginosa</i> , no eletrodo de grafite, com 72h de maturação. Com aumento de 3000x.....	33
Fotografia 7 – (a) Recipientes das câmaras anódica e catódica; (b) Eletrodo de cobre; (c) Eletrodo de grafite; (d) Eletrodo de ferro fundido; (e) Canudo Flexível; (f) Tampas dos recipientes.	34
Fotografia 8 – CCM montada utilizando eletrodos de ferro fundido e grafite e meio lactato.....	35
Fotografia 9 – (a) Cultivo de <i>E. coli</i> ATCC 8739 em ágar TSA, por 24h. (b) Cultivo de <i>E. coli</i> ATCC 8739 em ágar EMB, por 24h. (c) Lâmina de coloração de Gram da bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739. Aumento 1000x.	56
Fotografia 10 – Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 em ágar Cetrimide por 24h.....	56
Fotografia 11 – Resultado do plaqueamento da bactéria <i>E. coli</i> nas diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , respectivamente, em ágar TSA incubado por 24h.	57
Fotografia 12 – Resultado do plaqueamento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> nas diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} respectivamente, em ágar cetrimide incubado por 24h.....	57
Fotografia 13 – (a) Crescimento de <i>E. coli</i> MacConkey (b) – Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> em ágar Cetrimide	58
Fotografia 14 – (a) Presença de bactérias lactose positiva, colônias púrpuras, e negativa, colônias incolores, nas CCMs inoculadas com <i>E. coli</i> . (b) Presença de colônias rosas e incolores indicam contaminação, o crescimento foi semelhante em todas as CCMs contendo meio mineral e inoculadas com <i>E. coli</i> . (c) Presença de diversos tipos de colônias na CCM inoculada com <i>E. coli</i> em meio lactato com eletrodo de ferro.	58
Fotografia 15 – (a) Formação de biofilme na CCM contendo <i>E. coli</i> como inoculo, grafite como eletrodo e lactato como substrato, foi evidenciada após 72h de incubação à 37°C. (b) Formação de biofilme na CCM contendo <i>P. aeruginosa</i> como	

inoculo, grafite como eletrodo e lactato como substrato, foi evidenciada após 24h de incubação à 37°C. 60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Princípios operacionais da CCM. Bactérias no compartimento anódico transferem os elétrons obtidos do doador de elétrons (glicose) para o eletrodo. Durante a produção de elétrons, prótons também são produzidos em excesso, sendo transferidos para o compartimento catódico através da membrana de troca iônica (ponte salina). 18
- Figura 2 - Diagrama esquemático de uma CCM de cátodo aerado, com uma câmara. (a) lado do cátodo; (b) junta; (c) rede de titânio; (d) entradas; (e) lado do ânodo; (f) arame de conexão (titânio). 23
- Figura 3 - Ilustração dos processos de oxidação-redução que ocorrem na cadeia transportadora de elétrons. Os elétrons presentes em NADH e FADH₂ são transportados pela cadeia, composta de flavinamonucleotídeo (FMN), ubiquinona ou coenzima Q (Q), e por citocromos: citocromo b (Cyt b), citocromo c1 (Cyt c1), citocromo c (Cyt c), citocromo a (Cyt a), e citocromo a₃ (Cyt a₃). A transferência de elétrons ocorre porque o agrupamento seguinte sempre possui um potencial de redução maior do que o composto oxidado. O último citocromo passa o elétron para o acceptor final de elétrons. 25
- Figura 4 – Ilustração da Pilha de Daniell. 27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva padrão da análise de açúcares redutores (glicose), com $R^2 = 0,9971$	40
Gráfico 2: Relação entre Potencial Elétrico Acumulado em 15 dias com o substrato utilizado.....	43
Gráfico 3 - Subtração da diferença de potencial acumulada (V) nas CCM sem inóculo na diferença de potencial acumulada nas CCM inoculadas com <i>E. coli</i>	45
Gráfico 4: Subtração da diferença de potencial acumulada nas CCM sem inóculo na diferença de potencial acumulada nas CCM inoculadas com <i>P. aeruginosa</i>	45
Gráfico 5: Voltagem acumulada nas CCM inoculadas com <i>E. coli</i> 8739 em meio mineral e lactato, com eletrodos Cobre - Grafite e Cobre - Ferro. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.....	46
Gráfico 6: Voltagem acumulada nas CCM inoculadas com <i>P. aeruginosa</i> 27853 em meio mineral e lactato, com eletrodos Cobre - Grafite e Cobre - Ferro. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.....	47
Gráfico 7: Geração de Diferença de Potencial Elétrico nas CCMs inoculadas com <i>E. coli</i> 8739 em meio mineral e lactato, com eletrodos Cobre - Grafite e Cobre - Ferro. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.	48
Gráfico 8: Geração de Diferença de Potencial Elétrico nas CCM inoculadas com <i>P. aeruginosa</i> 27853 em meio mineral e lactato, com eletrodos Cobre - Grafite e Cobre - Ferro. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.	49
Gráfico 9 – Potencial elétrico x tempo e consumo de açúcares x tempo, das CCMs contendo meio mineral como substrato e <i>E. coli</i> 8739 como inóculo. As linhas verticais pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.....	50
Gráfico 10 – Potencial elétrico x tempo e consumo de açúcares x tempo, das CCMs contendo meio lactato como substrato e <i>E. coli</i> 8739 como inóculo. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.....	51
Gráfico 11 – Potencial elétrico x tempo e consumo de açúcares x tempo, das CCMs contendo meio mineral como substrato e <i>P.aeruginosa</i> 27853 como inóculo. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.	51
Gráfico 12 – Potencial elétrico x tempo e consumo de açúcares x tempo, das CCMs contendo meio lactato como substrato e <i>P.aeruginosa</i> 27853 como inóculo. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.....	52
Gráfico 13 – Monitoramento do pH na Câmara anódica das CCM, inoculas com <i>E. coli</i> e incubadas em 37°C.....	53
Gráfico 14: Monitoramento do pH na Câmara anódica das CCM, inoculas com <i>P.aeruginosa</i> e incubadas em 37°C.	54
Gráfico 15 – Diferença de pontencial elétrico utilizando $P= E^2/R$, ao longo de 30 dias nas CCMs inoculadas com <i>E. coli</i> . As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.	54

Gráfico 16 – Diferença de potencial elétrico calculado utilizando $P = E^2/R$, ao longo de 20 dias nas CCMs inoculadas com *P. aeruginosa*. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Potenciais de redução padrão da cadeia respiratório e dos transportadores de elétrons relacionados.	26
Tabela 2: Variáveis e níveis de estudo de geração de potencial elétrico em Célula de Combustível Microbiana.....	36
Tabela 3: Matriz padrão para o planejamento experimental 2^3	36
Tabela 4: Condições utilizadas no estabelecimento da curva de calibração de análise de açúcares redutores, pelo método DNS	40
Tabela 5: Resultado dos cálculos da Anova para a diferença de potencial elétrico medido, com $n = 2$	42
Tabela 6: Diferença de Potencial Acumulado em 20 dias (V)	44
Tabela 7: Pico de Diferença de Potencial (V).....	44
Tabela 8: Quantificação celular realizada ao final dos experimentos. Cultivos realizados em $37^{\circ}\text{C}/ 24\text{-}48\text{h}$	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	CÉLULAS COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS	18
3.1.1	Materiais utilizados para construir a CCM	19
3.1.1.1	Ânodo e cátodo	19
3.1.1.2	Membranas ou separadores.....	20
3.1.2	Exemplos de CCM.....	21
3.2	METABOLISMO CELULAR.....	24
3.3	FUNDAMENTOS DE ELETROQUÍMICA	26
3.3.1	Geração de Voltagem em CCM.....	28
3.3.2	Geração de potência	29
3.4	MICRORGANISMOS.....	30
3.4.1	<i>Escherichia coli</i>	30
3.4.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
3.4.3	Biofilme.....	32
4	MATERIAIS E METODOS	34
4.1	MONTAGEM DAS CÉLULAS COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS	34
4.2	EXPERIMENTO.....	36
4.2.1	Microrganismos	37
4.2.1.1	Ativação das cepas.....	38
4.2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i>	38
4.2.1.1.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
4.2.1.2	Inóculo.....	39
4.2.3	Análises de Monitoramento	39
4.2.3.1	Medição de potencial elétrico	39
4.2.3.2	Análise de Açúcares Redutores	39
4.2.3.3	pH.....	41
4.2.3.4	Microrganismos inoculados	41

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Geração de Potencial Elétrico	42
5.2	Degradação de Açúcares Redutores.....	49
5.3	MONITORAMENTO DO pH	52
5.4	MONITORAMENTO DA POTÊNCIA ELÉTRICA.....	54
5.5	INÓCULO	55
5.6	monitoramento dos Microrganismos inoculados.....	58
6	CONCLUSÕES	62
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

As principais fontes de energia mundiais utilizadas pela indústria são o petróleo, o gás natural e o carvão. Atualmente, 80% da energia elétrica do mundo provém dessas fontes, sendo 35,3% do petróleo, 23,2% do carvão e 21,2% do gás natural (CONSELHO NACIONAL DA INDÚSTRIA, 2007). O emprego de combustíveis fósseis apresenta diversas desvantagens, como o custo e o fator ambiental. Esses combustíveis emitem tanto dióxido de carbono, um dos gases que agravam o efeito estufa, quanto compostos com nitrogênio e enxofre, principais causadores da chuva ácida (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2008).

Nas últimas décadas tem-se buscado a exploração de fontes renováveis de energia, como a produção de biocombustíveis de segunda geração, por exemplo (MARCON, 2011). Entre as novas tecnologias para geração de energia pode-se mencionar a célula combustível microbiana (CCM), que utiliza microrganismos que transformam matéria orgânica em eletricidade (QIAO et al., 2009, 2010; XIANG et al., 2009; MOHAN et al., 2011; QIAO et al., 2011; WELD et al., 2011; ZHANG et al., 2011). Com a CCM é possível a conversão da energia química diretamente em eletricidade, (RABAEY et al., 2003).

Como exemplos de bactérias utilizadas em CCM pode-se citar: *Shewanella putrefaciens* (HERNANDES et al., 2001), *Clostridium* sp. (PARK, 2001), *Rhodospirillum rubrum* (CHAUDHURI et al., 2003), *Escherichia coli* (MCKINLAY et al., 2004) e *Pseudomonas aeruginosa* (RAGHAVULU; SARMA; MOHAN; 2011; ZHAN et al., 2009; GOMES, 2011).

Uma aplicação promissora da CCM é utilizá-la no tratamento de efluentes, porque a simultânea produção de energia elétrica pode tornar a operação do sistema sustentável (LOGAN et al., 2007). Observou-se redução da DQO de efluentes utilizados como substrato de CCMs entre 50-80% (KARGI, 2007; KATURI, 2010; ZHANG, 2011).

No Brasil são poucos os trabalhos que tratam sobre o assunto, destacando-se a tese de Marcon (2011), que abrange a possibilidade de tratar esgoto doméstico com esse sistema. Já o estudo de Gomes (2011) utiliza uma célula que possui uma solução de glicerol, para avaliar a atividade elétrica produzida pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Outros artigos apresentam revisões do que é feito no mundo (LOPES, 2006; RACHINSKI, 2010).

Considerando este pequeno número de publicações no Brasil, o presente trabalho objetiva explorar o assunto através de experimento em escala de bancada, auxiliando na implantação desta linha de pesquisa na UTFPR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Montar Células Combustíveis Microbianas e acompanhar a geração e variação de potencial elétrico, utilizando as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* inoculadas em câmaras contendo meio mineral e meio lactato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Montar Células Combustíveis Microbianas de baixo custo;
- Acompanhar a geração de potencial elétrico gerado durante o cultivo das bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, em um delineamento experimental;
- Avaliar o desempenho de cada bactéria nos diferentes meios.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CÉLULAS COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS

A primeira observação relativa à célula de combustível microbiana ocorreu em 1911, quando Michael Cresse Potter, professor de botânica na Universidade de Durham, na Inglaterra, demonstrou a liberação de energia elétrica quando bactérias *Escherichia coli* atuavam sobre substrato orgânico (GIL et al., 2003).

O funcionamento de uma CCM baseia-se na respiração celular: enquanto os microrganismos utilizam a energia química presente nos nutrientes do meio, os eletrodos da CCM atuam como aceptores finais de elétrons. A célula consiste em um ânodo e um cátodo separados por uma membrana de troca, podendo ser uma ponte salina, e um circuito elétrico fechado (Figura 1).

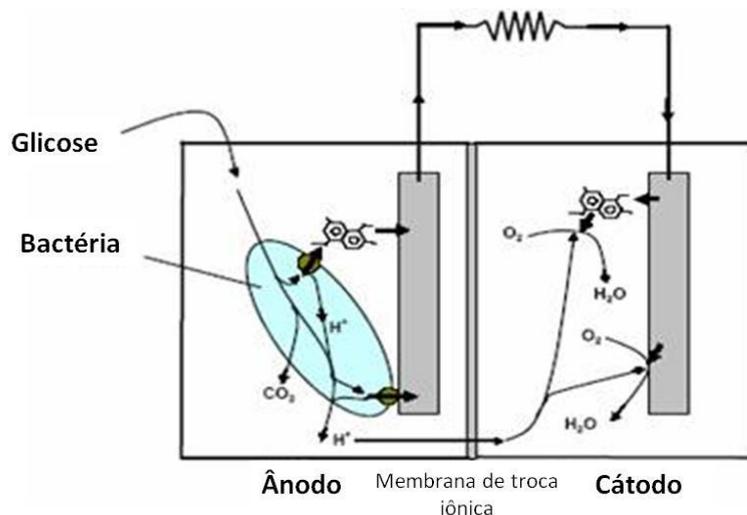


Figura 1 – Princípios operacionais da CCM. Bactérias no compartimento anódico transferem os elétrons obtidos do doador de elétrons (glicose) para o eletrodo. Durante a produção de elétrons, prótons também são produzidos em excesso, sendo transferidos para o compartimento catódico através da membrana de troca iônica (ponte salina).

Fonte: Rabaey et al. (2003).

Durante a respiração celular há liberação de elétrons do substrato. Em virtude de sua conformação, no ânodo da CCM não há oxigênio, forçando-as a encontrar outro receptor de elétrons, nesse caso um eletrodo ligado a um circuito elétrico. Os elétrons gerados a partir do metabolismo microbiano passam, então, para o eletrodo e seu movimento ordenado pelo circuito forma uma corrente elétrica. Essa corrente gera um potencial entre os dois eletrodos, que

pode ser convertido em energia elétrica.

Em condições aeróbicas, as bactérias convertem um substrato em água, dióxido de carbono, prótons e elétrons (RABAEY et al., 2003) utilizando o oxigênio como acceptor final de elétrons. No entanto, na câmara anódica, a condição do meio é anaeróbia, portanto a bactéria utiliza como acceptor final de elétrons o ânodo. O funcionamento da CCM é baseado nessa habilidade da bactéria de transferir elétrons, originados do metabolismo microbiano, a um acceptor insolúvel (RABAEY et al., 2005).

Os íons são conduzidos através de um circuito elétrico do ânodo para o cátodo. O tipo de substrato presente na CCM gera um impacto na estrutura e na composição da comunidade microbiana. Quanto mais reduzido for o substrato, mais energia estará disponível para os microrganismos, já que a corrente de íons será gerada a partir da oxidação desse meio (LIU et al., 2009).

3.1.1 Materiais utilizados para construir a CCM

3.1.1.1 Ânodo e cátodo

O material para a confecção do ânodo deve possuir as seguintes características: ser um bom condutor elétrico, não ser corrosivo, possuir uma grande área superficial, apresentar alta porosidade, ser um material no qual a bactéria possa se desenvolver e realizar conexões elétricas, viável economicamente e fácil de fazer ou obter em tamanhos industriais (LOGAN, 2008). Os ânodos utilizados em CCM podem ser compostos de inúmeros materiais, dentre eles os de carbono e em menor quantidade metais. Os materiais de carbono como papel carbono (ZHANG, 2012), malha de carbono (CATAL et al., 2008; REZAEI et al., 2007; LIU et al., 2012), espumas de carbono (LEPAGE et al., 2012a) e carbono vítreo reticulado (LEPAGE et al., 2012b) são considerados materiais de alta condutividade e um bom local para o crescimento de bactérias.

Materiais como espuma de grafite (KRAMER, 2012), feltro de grafite (ZHANG et al., 2012) e barras de grafite (CAI et al., 2013) foram utilizados e comparados no estudo de Chaudhuri e Lovley (2003), no qual se verificou que a eficiência do ânodo

está diretamente ligada à área superficial do material. Nesses trabalhos, o feltro de grafite apresentou maior geração de corrente devido à sua porosidade e à acomodação de bactérias em seu interior.

Apesar da alta condutividade elétrica, não é comum utilizar metais no ânodo, pois pode ocorrer corrosão em função da ação bacteriana, aumentando a toxicidade do meio. O aço inoxidável utilizado por Dumas et al. (2007) e Erable e Bergel (2009) apresentou resultados diferentes: no primeiro foi mais eficiente do que o eletrodo de grafite e no segundo, menos. Além do aço inoxidável, foi utilizado também o titânio (WEI, 2011), que apenas gerou corrente quando revestido por platina. O ouro também já foi utilizado como eletrodo, fornecendo bom resultado quando utilizado com a bactéria *Geobacter sulfurreducens*, desenvolvendo correntes próximas a de eletrodos de grafite (RITCHER et al., 2008).

O material para o cátodo deve possuir as mesmas características do ânodo, com exceção da acomodação bacteriana, uma vez que raramente utiliza-se bactérias no cátodo. A diferença é que no cátodo pode-se utilizar um catalisador como a platina ou apenas adicionar ferricianeto na câmara catódica, que desempenhará um papel semelhante ao do catalisador (CHENG; LIU; LOGAN; 2006).

3.1.1.2 Membranas ou separadores

Membranas, ou separadores, são utilizados em CCMs de duas câmaras, como método para separação de líquidos. Elas precisam ser permeáveis a prótons, de modo que os aqueles produzidos no ânodo possam migrar para o cátodo, como pontes salinas e materiais ultrafiltrantes. Porém, elas possuem desvantagens como o seu alto custo e a geração de resistência interna, o que diminui o potencial gerado pela CCM (LOGAN, 2008).

Há três tipos de membranas: de troca de cátions (CMI-7000), troca de ânions (AMI-7001) e bipolares, que consistem em uma membrana de troca de cátions e outra de troca de ânions. Outros materiais utilizados são o Nafion, considerado uma membrana de troca de cátions, materiais de ultrafiltração e, como alternativa mais simples e econômica, pode-se utilizar como separador o ágar sal (LOGAN, 2008).

3.1.2 Exemplos de CCM

Na década de 60 a NASA (*National American Spacial Agency*) demonstrou interesse pelas CCMs, porque seria vantajosa a geração de energia elétrica e degradação de resíduos orgânicos produzidos durante as viagens espaciais. As CCM foram empregadas, então, para a produção de energia elétrica e de água potável no programa espacial, porém era necessária a utilização de hidrogênio e oxigênio puríssimos, o que inviabilizou a continuidade da aplicação dessa tecnologia (LOGAN, 2008).

O experimento de Kim et al. (2002) mostrou uma relação direta entre geração de potencial elétrico e a concentração de bactérias eletroquimicamente ativas. Utilizou-se nesse estudo *Escherichia coli* e *Shewanella putrefaciens*, na quantidade de 0,36 g em peso seco/L. Outro ponto importante observado nesse estudo foi a relação direta entre o contato bactéria-eletrodo e a geração de potencial. O eletrodo utilizado foi feltro de carbono, com dimensões de 50 x 50 x 3 mm, e com fio de platina acoplado aos feltros de carbono, nas duas câmaras, com resina epóxi. Foi utilizado compartimentos de 20 mL: no ânodo, utilizou-se uma suspensão da bactéria, com a adição de tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7) e 0,1 M de cloreto de sódio. Nesse estudo observou-se uma geração e potencial entre 0,5 e 0,6 V.

Em Queensland, Austrália, uma CCM em escala piloto foi construída e é alimentada pelo efluente de cervejaria. Em 2008, doze módulos já haviam sido construídos, usando como ânodo e cátodo fibras de carbono (Fotografia 1).



Fotografia 1 – Células combustíveis microbianas, implantadas em escala piloto, em cervejaria de Queensland, Austrália.

Fonte: microbialfuelcell.org

Nos EUA, um grupo de cientistas de *Harvard School of Engineering and Applied Sciences* (SEAS) está desenvolvendo um carregador de celulares baseado nas CCMs; porém, ao invés de utilizar efluente industrial ou esgoto sanitário, o grupo utilizará microrganismos presentes no solo, pois o projeto visa levar energia para telefones na África subsaariana, assim a população teria o acesso facilitado aos serviços de saúde. O projeto recebeu um fundo de 100 mil dólares em 2010 (EDDY, 2011).

No Brasil, Marcon (2011) construiu uma CCM para gerar energia elétrica a partir de esgoto sanitário. A CCM atingiu dois picos de potencial 112,5 mV e 409 mV, na quarta e nona semana, respectivamente, do experimento.

Um exemplo semelhante ao utilizado no presente trabalho se encontra na pesquisa de Nimjeet al. (2012). Nesse caso, foi utilizada uma CCM de câmara única sem a aeração do cátodo. Foram utilizados como ânodo e cátodo malha de carbono, e foi avaliada a presença de carbono e nitrogênio e sua interação com a geração de energia pela bactéria *B. subtilis*. O potencial encontrado para essa conformação foi entre 300 e 400 mV.

É comum o cátodo da CCM ser aerado, já que essa configuração aumenta a eficiência do equipamento. Essa conformação é encontrada em CCM de uma câmara (Figura 2) (DI LORENZO et al., 2010; WEN et al., 2011) e de duas câmaras (ANGENENT, 2004).

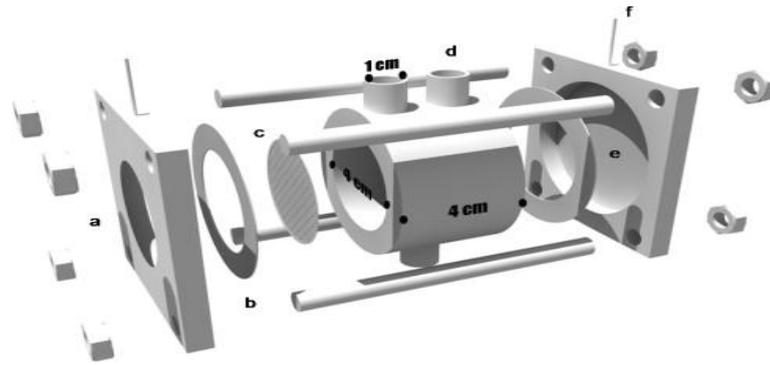


Figura 2 - Diagrama esquemático de uma CCM de cátodo aerado, com uma câmara. (a) lado do cátodo; (b) junta; (c) rede de titânio; (d) entradas; (e) lado do ânodo; (f) arame de conexão (titânio).
Fonte: DI LORENZO et al. (2010).

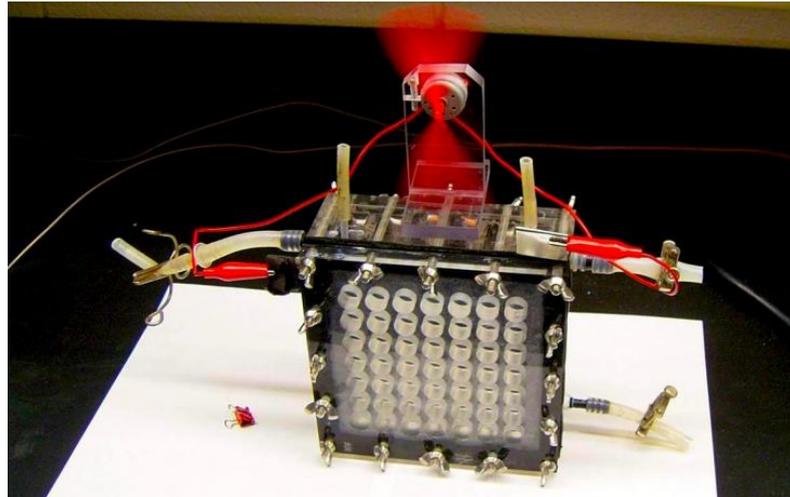
A figura 2 demonstra que o lado do cátodo é aberto para a entrada de ar e o ânodo é fechado. As entradas servem para a adição do substrato e são fechadas durante a operação da célula. A conformação de Di Lorenzo et al. (2010), com 50cm³ de capacidade, com eletrodos no anodo de *pellets* de carbono, com diâmetros de 0,2 cm a 0,6 cm, empacotados em uma malha de titânio, e no cátodo de papel carbono impermeabilizado e tratado superficialmente com platina produziu 1,3 W/m³. Utilizou-se como substrato uma água residuária artificial, com os seguintes componentes (mg/L): NH₄Cl, 40; MgCl₂, 10; CuSO₄, 0,1; CaCl₂, 5; MnSO₄, 0,1; ZnCl₂ 0,1; tampão fosfato (1 mol/L, pH 7). Como inóculo foi utilizado lodo anaeróbico da planta de tratamento de Cramlington, no Reino Unido.

No exemplo da Fotografia 2, a CCM é composta por dois compartimentos: a câmara anódica e a câmara catódica. A câmara catódica é aerada, por meio de um pequeno compressor.



Fotografia 2 - CCM composta por câmara anódica anaeróbica (esquerda), câmara catódica aerada (direita) e membrana de Nafion.
Fonte: Min et al. (2005).

O acoplamento de várias CCM em um único reator faz com que a potência gerada seja maior. O trabalho de LIU et al. (2007) mostra que células conectadas podem gerar energia suficiente para ligar um pequeno reator (Fotografia 3). Nesse trabalho obteve-se um máximo de 22 W/m^3 de potência por volume de substrato (solução de acetato).



Fotografia 3 – Fotografia de sistema de acoplamento de CCM com geração de energia elétrica suficiente para mover um ventilador

Fonte: Penn State (2013).

3.2 METABOLISMO CELULAR

As células de combustível microbianas baseiam-se no metabolismo de microrganismos. São duas vias metabólicas: as catabólicas e as anabólicas. Nas primeiras ocorre a degradação de moléculas disponibilizando a energia química das ligações. As vias anabólicas são responsáveis pela síntese de moléculas complexas a partir de moléculas simples (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). A quebra de moléculas sempre liberará energia, pois a energia está nas ligações entre os átomos (TALARO, 2012).

A escolha da rota metabólica catabólica mais interessante pelo microrganismo é feita segundo a disponibilidade de aceptores finais de elétrons no meio e depende da genética microbiana. Dentre a fermentação e a respiração, a primeira só será escolhida caso não hajaceptor de elétrons capaz de conduzir à respiração aeróbica ou anaeróbica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Entre outras diferenças, na fermentação o microrganismo utiliza como aceptor final de elétrons uma molécula

orgânica oriunda do próprio processo de catálise em andamento, levando à formação de uma substância ainda bastante reduzida; na respiração o microrganismo utiliza oxigênio (respiração aeróbica) ou outros aceptores de elétrons inorgânicos (respiração anaeróbica), levando à mineralização do substrato (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TALARO, 2012). Na respiração os transportadores de elétrons são os nucleotídeos NAD^+ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e FAD^+ (Flavina Adenina Dinucleotídeo), que são moléculas de nucleotídeos capazes de agir como transportadores de hidrogênios (LEHNINGER, 2006). São elas as responsáveis por carregar os elétrons até a cadeia transportadora de elétrons (Figura 3).

A etapa responsável pela maior geração de energia na célula corresponde à cadeia transportadora de elétrons da respiração e é nela que se baseia a CCM.

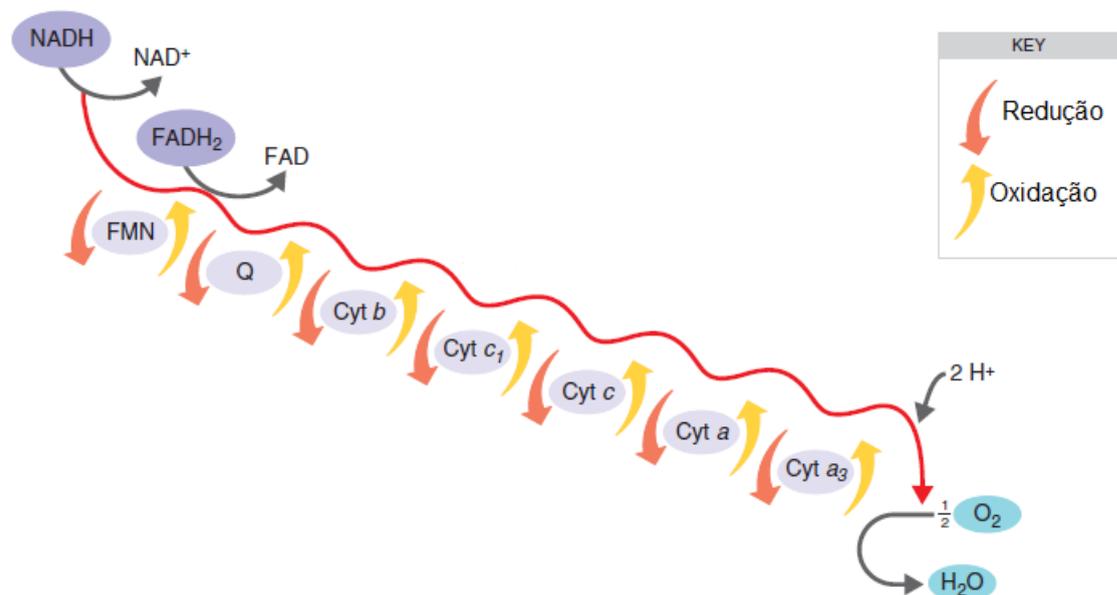


Figura 3 - Ilustração dos processos de oxidação-redução que ocorrem na cadeia transportadora de elétrons. Os elétrons presentes em NADH e FADH_2 são transportados pela cadeia, composta de flavinamonucleotídeo (FMN), ubiquinona ou coenzima Q (Q), e por citocromos: citocromo b (Cyt b), citocromo c1 (Cyt c1), citocromo c (Cyt c), citocromo a (Cyt a), e citocromo a_3 (Cyt a_3). A transferência de elétrons ocorre porque o agrupamento seguinte sempre possui um potencial de redução maior do que o composto oxidado. O último citocromo passa o elétron para o aceptor final de elétrons.

Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE (2005).

Na cadeia transportadora de elétrons elétrons passam por uma sequência de oxi-redução, onde ocorre uma gradual liberação de energia, utilizada na geração de ATP. A oxidação final é irreversível (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011).

A Tabela 1 lista alguns valores de potenciais de redução padrões da cadeia respiratória e dos transportadores de elétrons relacionados.

Tabela 1: Potenciais de redução padrão da cadeia respiratório e dos transportadores de elétrons relacionados.

Reação redox (meia-reação)	E° (V)
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$	-0,414
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH}$	-0,320
$\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADPH}$	-0,324
$\text{NADH desidrogenase (FMN)} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH desidrogenase (FMNH}_2\text{)}$	-0,30
$\text{Ubiquinona} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ubiquinol}$	0,045
$\text{Citocromo } b \text{ (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citocromo } b \text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	0,077
$\text{Citocromo } c_1 \text{ (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citocromo } c_1 \text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	0,22
$\text{Citocromo } c \text{ (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citocromo } c \text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	0,254
$\text{Citocromo } a \text{ (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citocromo } a \text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	0,29
$\text{Citocromo } a_3 \text{ (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citocromo } a_3 \text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	0,55
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	0,816

Fonte: LEHNINGER (2006).

A cadeia respiratória da bactéria *Escherichia coli* consiste em uma série de desidrogenases, seguidas de redutases ou oxidases que são vinculadas por quinonas, um substrato para ambas enzimas (UNDEN; BONGAERTS; 1997).

A glicose é degradada pela enzima glicose-hidrogenase e fornece um potencial de reação de -0,14 V. A lactose é degradada pelas enzimas D-lactato DH e L-lactato DH e fornece um potencial de reação de -0,19 V (UNDEN; BONGAERTS; 1997). Nesses exemplos o potencial é dado para uma respiração aeróbica. A diferença de potencial aumenta quanto maior for a eletropositividade do acceptor de elétrons. A lactose, porém, só será degradada após a utilização da glicose no meio. Esse componente atua como inibidor de enzimas que degradam a lactose (OZBUDAK, 2004).

3.3 FUNDAMENTOS DE ELETROQUÍMICA

A eletroquímica se divide em duas grandes áreas: a pilha e a eletrólise. A primeira se baseia na produção de eletricidade a partir de reações espontâneas e a segunda em, a partir de eletricidade, conseguir reações não espontâneas (ATKINS, 2008).

A célula galvânica consiste em dois eletrodos em contato com um eletrólito, e com o conteúdo da célula. Nessa célula, a oxidação ocorre em um dos eletrodos,

resultando na perda de elétrons de um eletrodo e no ganho de elétrons pelo outro eletrodo. O eletrodo onde ocorre a oxidação é chamado de ânodo e o eletrodo onde ocorre a redução é chamado de cátodo (ATKINS, 2008).

Nesse sentido a CCM é bastante parecida com a pilha de Daniell (Figura 4), consiste em duas meias-pilhas, ou dois sistemas de eletrodos, separados por uma ponte salina, que impede a mistura das duas soluções, mas que permite a passagem de íons.

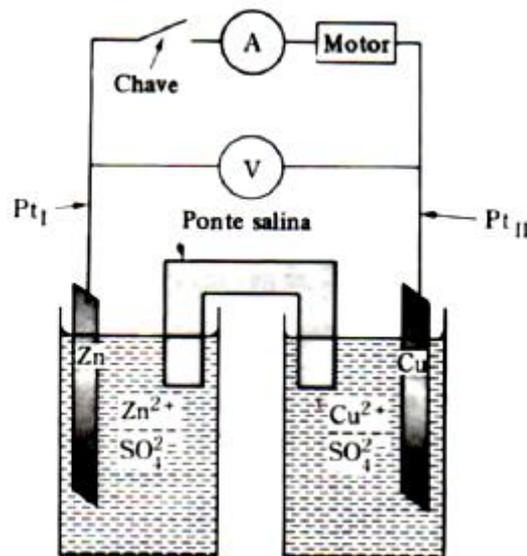


Figura 4 – Ilustração da Pilha de Daniell.
Fonte: CASTELLAN (1991).

Na pilha de Daniell (Figura 4), a meia pilha consiste em um metal, zinco ou cobre, mergulhado em uma solução salina altamente solúvel, como uma solução de $ZnSO_4$ ou $CuSO_4$ respectivamente. Para que os elétrons passem do zinco para os íons de Cu^{2+} , o sistema deve ser fechado. A movimentação ordenada dos elétrons é a definição de corrente elétrica e pode realizar trabalho elétrico. Em um dos compartimentos, portanto, o Cu^{2+} é reduzido a Cu^0 e no outro, o Zn^0 é oxidado para Zn^{2+} , atraindo ânions (CASTELLAN, 1991).

A força eletromotriz de uma célula, ou simplesmente sua voltagem, é uma medida da facilidade da movimentação de elétrons no sistema. Quanto maior a facilidade de locomoção de elétrons, maior é a voltagem do sistema. O instrumento de medição dessa grandeza é o potenciômetro e sua unidade no Sistema Internacional é o Volt (V) que corresponde à energia de 1 Joule liberada por uma carga de 1 Coulomb (CASTELLAN, 1991).

3.3.1 Geração de Voltagem em CCM

Em uma CCM a geração de voltagem não é previsível. Isso ocorre porque as bactérias demoram certo tempo para colonizar o eletrodo e sintetizar enzimas que auxiliem no processo da transferência de elétrons (LOGAN, 2008).

Baseado em relações termodinâmicas, existe uma voltagem máxima $E_{m\acute{a}x}$ que pode ser desenvolvida por uma CCM. Essa relação é dada pela equação de Nernst, a equação (1):

$$E_{m\acute{a}x} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln(Q) \quad (1)$$

Onde E^0 é a voltagem padrão(V), R é a constante de gases (8,31447 J/mol.K), T é a temperatura (K), n é o número de elétrons transferidos, F é a constante de Faraday (96485,3399 C/mol) e Q é a relação entre as atividades dos produtos pelas atividades dos reagentes elevados a seus respectivos coeficientes estequiométricos (CASTELLAN, 1991).

Pode-se escrever a voltagem em função da Energia Livre de Gibbs. Valores positivos de Gibbs denotam uma reação não espontânea e negativos, espontânea. A voltagem, em função de Gibbs é representada pela equação (2) (ATKINS, 2008):

$$E^0 = -\frac{\Delta G_r^0}{nF} \quad (2)$$

Na qual G_r^0 representa a energia de Gibbs.

Pode-se calcular também o potencial total de uma célula: isto é, a diferença entre os potenciais do ânodo e do cátodo, como na equação (3) (LOGAN, 2008):

$$E_{m\acute{a}x}^{pot} = E_{C\acute{a}t\acute{o}d\acute{o}}^0 - E_{\acute{A}n\acute{o}d\acute{o}}^0 \quad (3)$$

3.3.2 Geração de potência

O cálculo da potência (P) de um sistema pode ser efetuado de 3 formas. Pode ser efetuada pela multiplicação da voltagem pela corrente (I) (equação 4) (HALLIDAY; RESNICK; WALKER; 2009):

$$P = I E_{CCM} \quad (4)$$

Onde P é a potência gerada, I é a corrente e E_{CCM} é o potencial gerado pela CCM. A potência medida no laboratório pode ser calculada pela adição ao sistema de uma resistência externa, sabendo que a corrente obtida é resultado da divisão entre voltagem e resistência. Deste modo, obtém-se a equação (5) (HALLIDAY; RESNICK; WALKER; 2009):

$$P = \frac{E_{CCM}^2}{R_{ext}} \quad (5)$$

Onde R_{ext} é a resistência externa do sistema. Pode-se, também, calcular a geração de potência a partir de uma função da corrente medida, conforme a equação (6) (HALLIDAY; RESNICK; WALKER; 2009):

$$P = I^2 R_{ext} \quad (6)$$

Deve-se, no entanto, relacionar, ou normalizar a potência em função da área do eletrodo. É necessário fazer esse cálculo para determinar o quão eficiente é o eletrodo e a geração de potência no modelo utilizado de CCM. Desde modo, obtém-se a equação (7) (LOGAN, 2008):

$$P_{eletrodo} = \frac{E_{CCM}^2}{A_{eletrodo} R_{ext}} \quad (7)$$

Onde $A_{eletrodo}$ corresponde à área superficial do eletrodo. Picot et al. (2011) estudaram a relação entre a área de superfície do ânodo, de carbono, e a geração de potencial. Uma célula de duas câmaras separadas por uma membrana de troca

de cátions foi utilizada com eletrodos de placas de grafite (6 x 2 x 0,5 cm). A CCM foi inoculada com esgoto doméstico.

Pode-se, também, normalizar a geração da potência em relação ao volume total da CCM (equação 8) (LOGAN, 2008):

$$P_V = \frac{E_{CCM}^2}{V_{CCM} R_{ext}} \quad (8)$$

Onde V_{CCM} corresponde ao volume da câmara da CCM. A voltagem da célula está diretamente ligada à concentração de substrato que ela possui, de acordo com a equação de Nernst. Nota-se isso no trabalho de Kim et al. (2011). A CCM montada é de duas câmaras, 200 mL cada, separadas por uma membrana de troca de elétrons, com ânodo de feltro de carbono e cátodo de titânio revestido por platina. Foi utilizado como inóculo o lodo de um digestor anaeróbico de uma estação de tratamento esgoto (20% v/v). Algumas horas após a adição de açúcar, a tensão da célula apresentava um pico.

A potência depende também da resistência interna do sistema. Se uma CCM possui uma resistência interna muito elevada, sua potência será menor. A potência máxima que pode ser gerada relaciona-se com a voltagem do circuito- aberto (VCO) de acordo com a equação (9) (LOGAN, 2008):

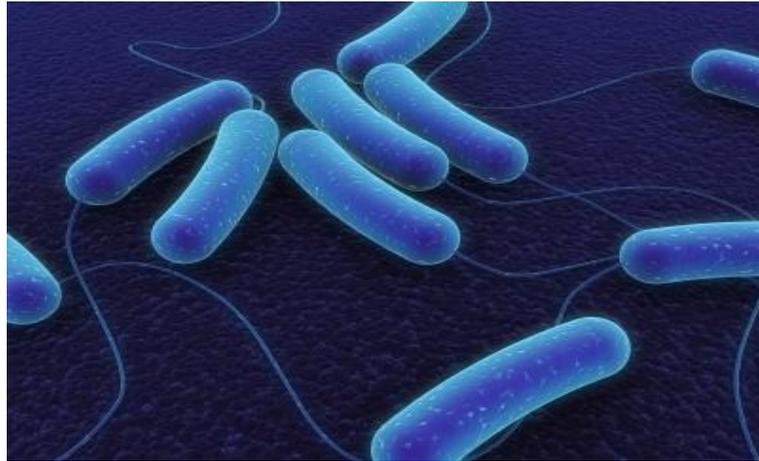
$$P_{m\acute{a}x} = \frac{VCO^2 R_{ext}}{(R_{int} + R_{ext})^2} \quad (9)$$

3.4 MICRORGANISMOS

3.4.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (Fotografia 4) é uma eubactéria gram-negativa, aeróbica facultativa, bacilar e flagelada. É encontrada naturalmente no trato digestivo de animais homeotérmicos e geralmente está associada à intoxicação alimentar por coliformes termotolerantes presentes em alimentos e bebidas (BIOULTRA, 2011).

As principais fontes de carbono para *E. coli* são os açúcares, principalmente lactose (BELLÃO,2008).



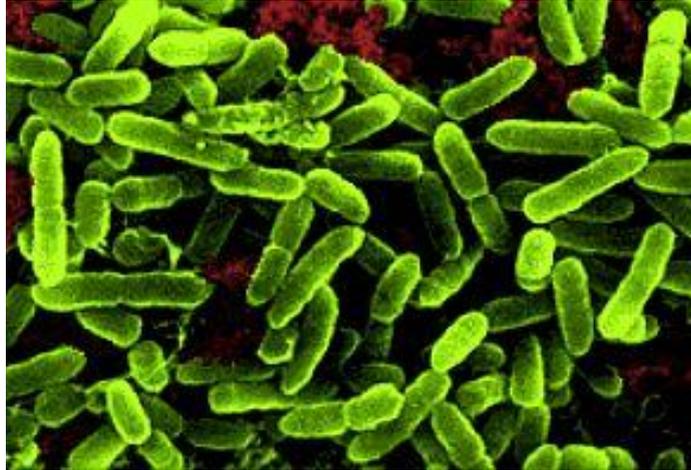
Fotografia 4: *Escherichia coli*,microscopia eletrônica de varredura.
Fonte: bioultra.com (2011)

A *E. coli* possui 167 sorogrupos, destes 60 existem em humanos, sendo 25 normais e 35 patogênicas. As patogênicas podem causar meningite e infecção urinária e são divididas em 5 grupos: enteropatogênica clássica, toxigênica, invasiva, hemorrágica e aderente (MONTEIRO, 2009).

A maioria das estirpes de *E. coli* possui a temperatura ótima para crescimento a 37°C e pH ótimo de 6,5 a 7,5 (CARNEIRO, 2008).

3.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* (Fotografia 5) é uma bactéria gram-negativa, com formato de bastonete, aeróbia não fermentadora, que deriva sua energia de processos oxidativos de carboidratos ao invés de fermentação (SIQUEIRA, 2002). Sua temperatura ótima de crescimento é 37°C (ATCC, 2013), podendo crescer em até 42°C (TODAR, 2013).



Fotografia 5 – Fotografia de microscopia eletrônica de varredura da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: cellsalive.com (2012)

O ambiente natural do desenvolvimento da *P. aeruginosa* é o solo, porém é considerada um patógeno oportunista, ou seja, quando o sistema imunológico está comprometido, a *P. aeruginosa* pode causar infecções (MONTEIRO, 2009).

A *P. aeruginosa* produz piocianina (PYO), uma fenazina solúvel em bases do metabólito redox, com a função de mediador para a transferência de elétrons entre a bactéria e o ânodo em CCM (LIU et al., 2012). A *Pseudomonas* sp. produz outros tipos de fenazinas que possuem o mesmo efeito de mediador na transferência de elétrons (RABAEY et al., 2005; PHAM et al., 2008a).

3.4.3 Biofilme

Em ambientes naturais, grande parte dos microrganismos sobrevive aderidos às superfícies, inseridos na estrutura de biofilmes (DONLAN, 2002). O desenvolvimento de um biofilme em uma determinada superfície depende de vários fatores, como: temperatura, pH, características do substrato, quantidade de inóculo, disponibilidade de nutrientes e oxigênio (NAVES et al., 2008).

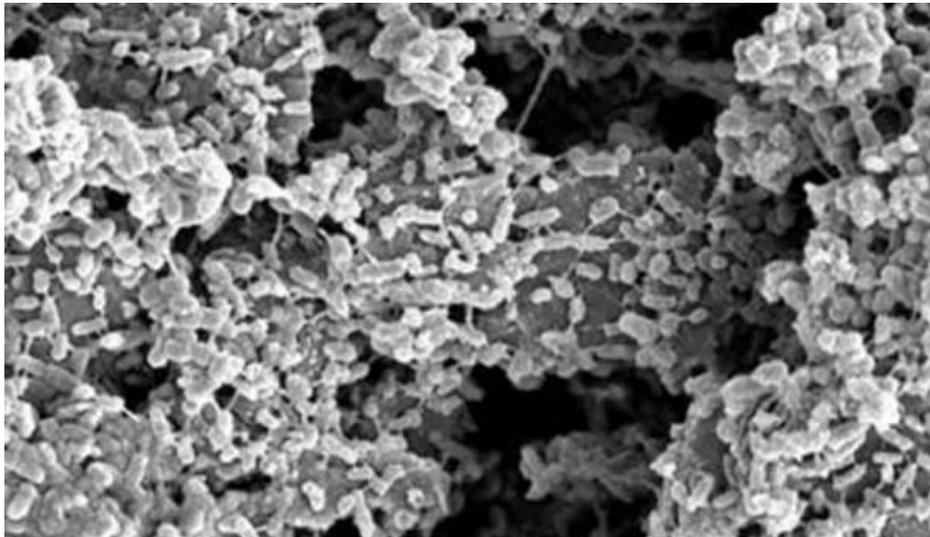
A formação de biofilme em superfície metálica inicia-se quando a mesma é imersa em meio aquoso. Pode ocorrer nas etapas a seguir: compostos orgânicos dissolvidos na água são adsorvidos iniciando a formação do biofilme; bactérias da fase aquosa se depositam na superfície; as bactérias sésseis, que fazem parte do biofilme, através da elaboração de polímeros extracelulares formam o biofilme ou

após a fixação, quando as bactérias se multiplicam e o biofilme cresce, ficando disponível para outros microrganismos aderir-lo (GENTIL,1996).

Como exemplo de formação de biofilme me CCM, tem-se o trabalho de Futamata et al. (2013) no qual foi utilizada uma amostra de solo com a adição de lactato para se preparar o substrato. Como eletrodos foram utilizados feltros de grafite, após alguns dias de experimento foi evidenciado a formação de biofilme no compartimento aniônico.

No estudo de Zhao et al. (2012) houve o crescimento de biofilme no ânodo, feito de papel carbono, quando utilizado glicose como substrato o microrganismos *E. coli* como inóculo. A formação do biofilme demorou 5 dias.

READ et al. (2010) comparou o potencial elétrico e a formação de biofilme utilizando cinco cultura puras de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Shewanella oneidensis*, *Geobacter sulfurreducens* e *Clostridium acetobutylicum*). O biofilme formado pela *P. aeruginosa* (Fotografia 6) cobriu totalmente o eletrodo de grafite dentro de um período de 3 dias. Então o biofilme ficou menos denso e começou a desprender da superfície do eletrodo, mostrando a maturação do mesmo.



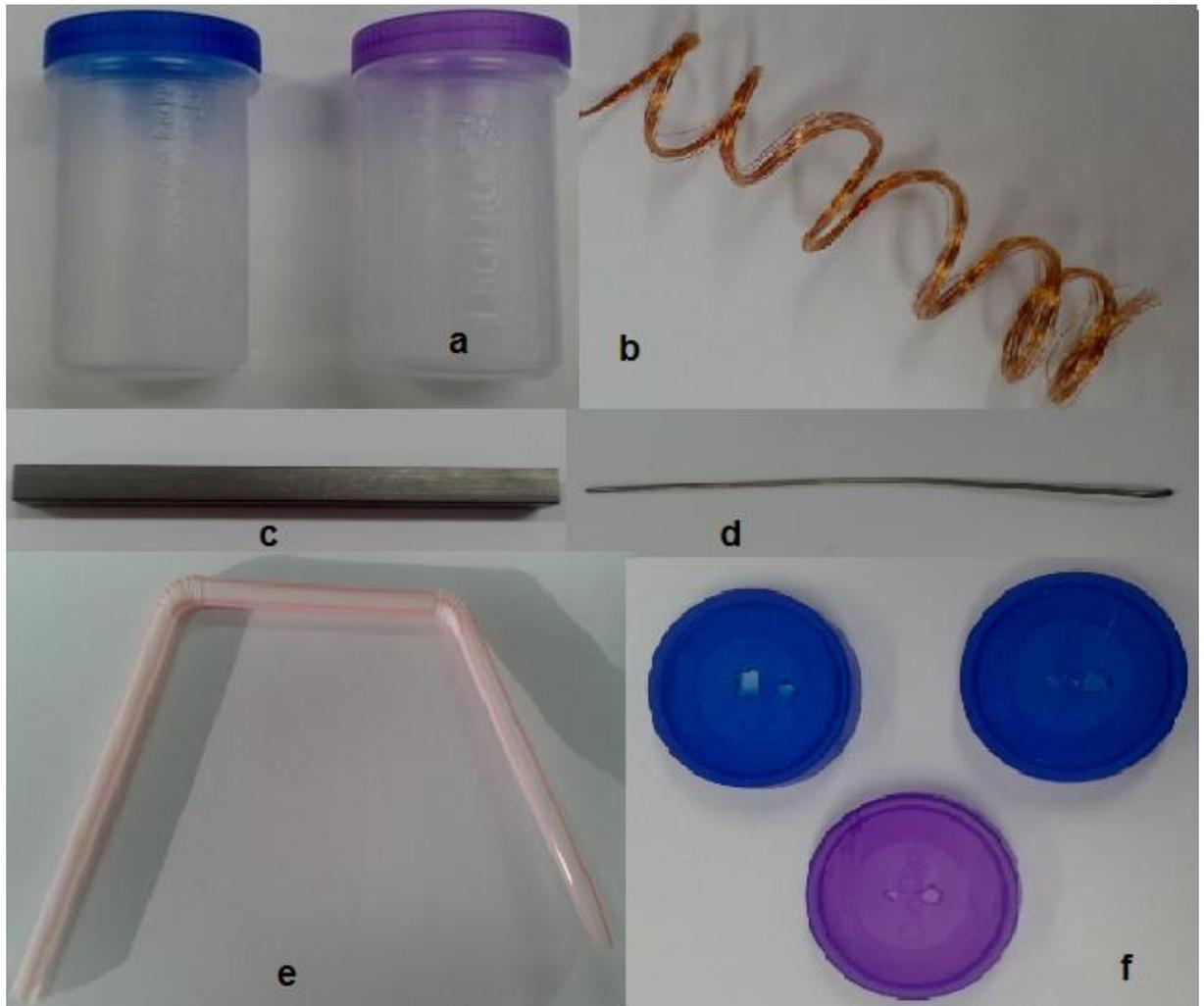
Fotografia 6 - Biofilme formado pela bactéria *P. aeruginosa*, no eletrodo de grafite, com 72h de maturação. Com aumento de 3000x.

Fonte: READ et al., 2010

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 MONTAGEM DAS CÉLULAS COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS

As CCMs foram montadas a partir dos materiais mostrados na Fotografia 7.



Fotografia 7 – (a) Recipientes das câmaras anódica e catódica; (b) Eletrodo de cobre; (c) Eletrodo de grafite; (d) Eletrodo de ferro fundido; (e) Canudo Flexível; (f) Tampas dos recipientes.

Os recipientes plásticos (Fotografia 7a) possuem capacidade para 170 mL. Cada CCM foi montada com dois recipientes, um contendo substrato, a partir do qual a bactéria geraria energia, e o outro contendo solução salina de NaCl 10% (LEFEBVRE, 2012). A seguir, foram feitos dois furos em cada tampa (Fotografia 7f): um deles para acomodar o eletrodo e o outro para dar espaço à ponte salina.

Foram utilizados dois substratos diferentes para comparação. O primeiro foi chamado de meio mineral (RABAEY et al., 2003) e o segundo de meio lactato (KIM, 1999). Foram escolhidos esses meios já que já tinham sido utilizados em estudos com *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, nesses estudos. Eles foram colocados no compartimento que representa o ânodo da célula, onde ficam as bactérias. Eles têm como principal objetivo o fornecimento de nutrientes para os microrganismos.

O meio mineral era formado por Ferricianeto de Potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) 50 mM e Fosfato Monopotássico (KH_2PO_4) 100 mM, apresentando um aspecto límpido e amarelo, sem precipitados. Já o meio lactato era composto de Lactato de Cálcio ($C_6H_{10}CaO_6$) 10 mM e Cloreto Férrico ($FeCl_3$) 250 mM e apresentava tonalidade alaranjada, com formação de precipitado.

Foi colocado 1 g de glicose por dia por litro de substrato, nos 3 primeiros dias (RABAEY, 2003) seguidos de análise de DNS para avaliar a degradação de açúcares redutores (RAHIMNEJAD et al., 2009).

A ponte salina foi feita a partir da montagem de dois canudos dobráveis (Fotografia 7e), vedados com fita veda-rosca preenchidos com ágar-sal. O ágar-sal foi composto de 5% de ágar e 10% de NaCl, conforme recomendado por Sveda (2012).

As CCMs montadas (Fotografia 8) eram compostas de eletrodo de cobre de 90 cm de comprimento, moldado em formato helicoidal (Fotografia 7b), para que houvesse o aumento da área de contato entre a solução contida na CCM e o eletrodo, promovendo uma maior diferença de potencial.

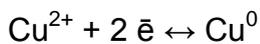


Fotografia 8 – CCM montada utilizando eletrodos de ferro fundido e grafite e meio lactato.

Como eletrodo de grafite foi utilizado uma barra de grafite (Fotografia 7c) da marca CRETACOLOR 405044B com dimensões 7,15 cm de altura, 0,59 cm de largura, 0,59 cm de profundidade e área superficial submersa de 4 cm². A utilização de um eletrodo de grafite se baseia na não toxicidade desse material para as bactérias, já que esse será submerso na câmara anódica.

O eletrodo de ferro fundido (utilizado para fazer a solda de materiais - Fotografia 7d) possui 0,25 cm de diâmetro e 18 cm de comprimento, sendo que 1,9cm² ficam submersos no substrato.

As reações na câmara catódica e câmara anódica são descritas a partir das reações:



4.2 EXPERIMENTO

O experimento consistiu de um estudo fatorial 2³, sendo que nas Tabelas 2 e 3 estão indicadas as variáveis e a matriz padrão deste delineamento experimental.

Tabela 2 – Variáveis e níveis de estudo de geração de potencial elétrico em Célula de Combustível Microbiana

Variáveis	Nível (-)	Nível (+)
Bactéria	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonasaeruginosa</i>
Eletrodo	Cobre- Grafite	Cobre – Ferro fundido
Substrato	Meio Mineral	Meio Lactato

Tabela 3 – Matriz padrão para o planejamento experimental 2³

Níveis/ ensaios	Bactéria	Eletrodo	Substrato	Resposta
1	-	-	-	Variação do potencial elétrico
2	+	-	-	
3	-	+	-	
4	+	+	-	
5	-	-	+	
6	+	-	+	
7	-	+	+	
8	+	+	+	

Todos os experimentos foram realizados em duplicata, em estufa 37°C. A análise estatística dos dados foi feita por ANOVA, utilizando o software *Statgraphics Centurium XVI*, com a supervisão de um profissional da área de estatística.

O experimento foi iniciado com as células inoculadas com *E. coli* previsto para durar 20 dias (YONG et al, 2012). O mesmo não ocorreu com as CCM inoculadas com *P. aeruginosa*, pois foi evidenciada a contaminação da cepa existente no banco de cepas do laboratório de microbiologia da UTFPR, com isso houve a necessidade de comprar uma nova cepa. Os experimentos com *P. aeruginosa* só começaram 10 dias depois, tempo para a bactéria ser adquirida da empresa Newprov e ativada, mas também com objetivo de ser analisada por 20 dias (LIU et al, 2012). Com o objetivo de obter mais dados, mesmo ao término do experimento, a análise de diferença de potencial em CCM inoculadas com *E. coli* continuou por 10 dias, o tempo necessário para as CCM inoculadas com *P. aeruginosa* atingissem 20 dias.

Na CCM inoculada com *E. coli*, a glicose 1g/L foi adicionada nos primeiros três dias de operação e as análises de sua degradação se iniciaram no terceiro dia. Como forma de teste foi adicionado novamente 1g/L de glicose no 16º dia de experimento, apenas na CCM de substrato lactato com eletrodo de grafite, já que até aquele momento, era a CCM com melhor rendimento, para avaliar a resposta da voltagem em relação ao tempo relacionada com o acréscimo de açúcar (Adaptado KIM et al., 2011). Como a resposta foi positiva, adicionou-se 1 g/L de glicose no dia 21º dia nas outras CCM inoculadas com *E. coli* para a verificação do pico de diferença de potencial.

As CCMs inoculadas com *P. aeruginosa*, sofreram adição de glicose nos primeiros 3 dias de experimento (Adaptado KIM et al., 2011), e as análises pelo método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) se iniciaram no 2º dia.

Para a análise estatística, utilizou-se como tempo o total dos primeiros 20 dias, para fins de comparação, mesmo que as CCM inoculadas com *E. coli* tenham sido operadas por 30 dias.

4.2.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados fazem parte do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia, da UTFPR- Câmpus Curitiba. Foram utilizadas *Escherichia coli*

ATCC 8739 (nível de biossegurança 1) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (nível de biossegurança 2).

Como houve problemas durante o isolamento da cepa *P. aeruginosa* da Universidade, foi necessário comprar uma nova cepa da empresa NEWPROV.

Durante toda a realização do experimento procedeu-se a manipulação das amostras e células considerando as recomendações necessárias para o nível de biossegurança mais restritivo (nível 2). Todos os meios de cultivo utilizados na pesquisa foram autoclavados em 1,1 atm, 121°C por 15 min antes do uso.

4.2.1.1 Ativação das cepas

4.2.1.1.1 *Escherichia coli*

A partir de cultura já existente em estoque, a bactéria foi ativada em caldo BHI (infusão de cérebro e coração – *brain heart infusion*) e incubada a 37°C. Após 24h a bactéria foi repicada e cultivada em ágar TSA (Agar triptona de soja – *trypticase soy agar*) e ágar EMB (agar eosina azul de metileno – *eosine methylene blue agar*) a 37°C durante 24h.

Como a cepa é utilizada frequentemente em aulas e outros experimentos, foi realizada coloração de Gram do cultivo em EMB, para confirmar o isolamento da *E. coli*.

4.2.1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

O cultivo da cepa de *P. aeruginosa* do banco de cepas do laboratório identificou a ausência do crescimento, sendo necessária a compra da cepa liofilizada, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Um disco da bactéria liofilizada foi ativado em 10mL de caldo BHI, posteriormente incubado na estufa a 37°C durante 24h. Após este período foi observada a turvação do meio, indicando o crescimento microbiano. O cultivo foi repicado em meio seletivo ágar Cetrimide e cultivado a 37°C durante 24h na estufa. O crescimento foi abundante e a coloração amarela fluorescente, era característica do pigmento fluoresceína, produzido por esta cepa (HIMEDIA, 2003).

4.2.1.2 Inóculo

Para fazer a estimativa da quantificação da suspensão bacteriana a ser inoculada nas CCMs Preparou-se a diluição 4 da escala de MacFarland, correspondente a $1,210^9$ UFC/mL (FERRONATO; SALMASSO, 2010).

As colônias cultivadas no ágar TSA (*E. coli*) e Cetrimide (*P. aeruginosa*) foram diluídas em 10 mL de solução salina 0,85% (v/v) até que fosse obtida uma turvação semelhante ao tubo 4 da escala de MacFarland (FERRONATO; SALMASSO; 2010).

Para confirmar se a concentração de células na suspensão bacteriana era coerente com o valor estimado na escala de MacFarland, no momento da inoculação dos microrganismos nas CCMs procedeu-se a contagem em placas contendo ágar TSA (*Escherichia coli*) e ágar Cetrimide (*Pseudomonas aeruginosa*), pela técnica do espalhamento (com auxílio de alça de Drigalski) (APHA, 1980), as placas receberam diluições de 10^{-1} a 10^{-8} . As placas foram incubadas por 24h a 37°C.

4.2.3 Análises de Monitoramento

4.2.3.1 Medição de potencial elétrico

A medição diária do potencial elétrico foi feita com uso de um multímetro, modelo Digital Multimeter DT830B, marca MXT. No momento da análise cada terminal dos com cabos jacaré era conectado a cada um dos eletrodos da célula e ao multímetro.

4.2.3.2 Análise de Açúcares Redutores

A análise de açúcares redutores foi feita de acordo com o Método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS), de Miller (1959). Esse método baseia-se na redução do ácido 3,5 – dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um complexo de coloração laranja. A análise de açúcares redutores pelo método do DNS teve como objetivo inicial avaliar a quantidade de glicose adicionada ao meio e sua degradação ao longo do tempo (KETHEESAN; NIRMALAKHANDAN; 2011).

O reagente DNS foi preparado pela dissolução de 15g de tartarato duplo de sódio e potássio em 25g de água. Em outro frasco, diluiu-se 0,5g do ácido 3,5-

dinitrosalicílico em 10 mL de uma solução de 2 mol/L de NaOH. Misturou-se, então, as duas soluções e aferiu-se o volume para 50 mL. Esse procedimento deve ser executado com cuidado, pois o ácido 3,5-dinitrosalicílico é extremamente instável quando exposto a luz e na presença de CO₂ (MILLER, 1959).

A curva de calibração foi feita a partir de uma solução de 10 g/L de glicose. A Tabela 4 mostra a condição dos pontos da curva.

Tabela 4 – Condições utilizadas no estabelecimento da curva de calibração de análise de açúcares redutores, pelo método DNS

Ponto	Glicose 10 g/L (mL)	Água (mL)	DNS mL)	Concentração de glicose (g/L)
1	0,2	1,3	1	0,2
2	0,4	1,1	1	0,4
3	0,6	0,9	1	0,6
4	0,8	0,7	1	0,8
5	1	0,5	1	1,0

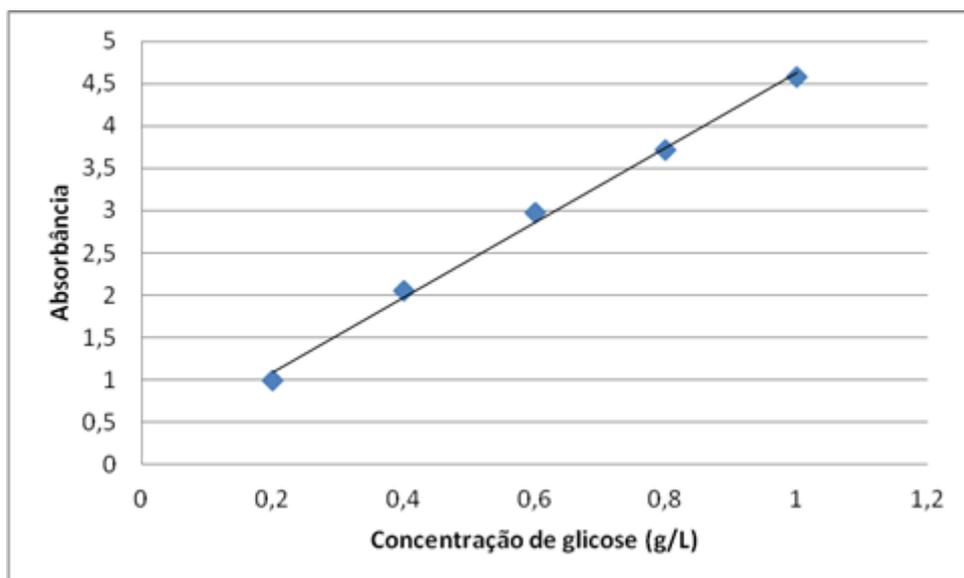


Gráfico 1: Curva padrão da análise de açúcares redutores (glicose), com $R^2 = 0,9971$.

Esses componentes foram colocados em tubos de ensaio, que é fechado e levado para aquecimento em banho-maria 100°C por 5 minutos. Ao término do tempo e resfriamento das amostras foi adicionado 8,5 mL de água destilada seguindo-se a leitura no espectrofotômetro Varian®, utilizando $\lambda = 540\text{nm}$.

A análise de açúcares redutores foi diária, aquecendo em tubo de rosca (fechado) com 1mL da amostra, 1mL de DNS e 0,5 mL de água, sendo o volume

completado para 10mL com adição de água destilada, seguindo procedimento descrito no parágrafo anterior.

O Gráfico 1 representa a curva de calibração da análise de açúcares redutores. O coeficiente de regressão linear (R^2) obtido foi 0,9971.

4.2.3.3 pH

O pH foi monitorado diariamente utilizando o pHmetro, calibrado, marca Micronal, modelo B474, disponível no laboratório de microbiologia da UTFPR.

4.2.3.4 Microrganismos inoculados

Durante o experimento foi feito um monitoramento qualitativo dos microrganismos inoculados nas CCMs, para averiguar se eles se mantinham ativos. A cada 72h foram retiradas amostras do ânodo das CCMs, com auxílio de alça de inoculação. A alíquota era assepticamente transferida para placas de petri contendo meio ágar MacConkey (*E. coli*) e ágar Cetrimide (*P. aeruginosa*), cultivadas a 37°C durante 24h.

Para quantificar o número de células presentes nas CCM, ao final dos experimentos procedeu-se a contagem em placas através de inoculação, das diluições de 10^{-1} a 10^{-8} de 1mL de substrato retirado e cada câmara, em meios diferenciais (Cetrimide e MacConkey) e em meio PCA, pela técnica do espalhamento (com auxílio de alça de Drigalski) (APHA, 1980). As placas foram incubadas por 24h a 37°C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As CCMs foram inoculadas com 1mL/L da suspensão do inóculo de *E. coli* e de *P. aeruginosa*, resultando na quantidade inicial de microrganismos de $1,4 \cdot 10^9$ UFC/mL e $7 \cdot 10^8$ UFC/mL, respectivamente. Este valor está de acordo com o usado no estudo de Rabaey et al. (2004), que utilizou $1 \cdot 10^9$ UFC/mL.

Esta quantidade de células inoculadas representou o peso seco de 3,2 g/L para as duas bactérias. O valor de peso seco do inóculo mencionado na literatura varia de 1,2 g/L (IEREPOULOS et al., 2005) a 40 g/L (BILITEWSKI et al., 1993).

5.1 GERAÇÃO DE POTENCIAL ELÉTRICO

A análise estatística considerou um nível de confiabilidade de 95%, ou em outras palavras, um nível de significância de 0,05. A Tabela 05 mostra os resultados da Anova para o experimento.

Tabela 05: Resultado dos cálculos da Anova para a diferença de potencial elétrico medido, com $n = 2$.

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	Estatística F	Valor de P
Bactéria	10,7810	1	10,7810	6,7500	0,0355
Eletrodo	35,0709	1	35,0709	21,9500	0,0022
Substrato	4,1605	1	4,1605	2,6000	0,1506
Bactéria x Eletrodo	1,2207	1	1,2207	0,7600	0,4110
Bactéria x Substrato	1,6188	1	1,6188	1,0100	0,3476
Eletrodo x Substrato	24,4731	1	24,4731	15,3200	0,0058
Resíduos	11,1830	7	1,5976		
Total	96,3842	13			

Pelo resultado mostrado na Tabela 05 é possível observar que o microrganismo foi uma variável significativa no resultado, pois o valor de P está abaixo de 0,05. Também a interação entre Eletrodo e Substrato mostrou-se significativa, por isso não faz sentido a análise destas variáveis separadamente.

Para efeito de comparação entre as CCM foi utilizado a variável Potencial Elétrico Acumulado. Essa variável corresponde à soma diária do valor de diferença de potencial elétrico medido.

A interação entre eletrodo-substrato no resultado torna-se mais evidente no gráfico 02, indicada por linhas não paralelas. Nota-se como o eletrodo Cobre-Grafite tem maior valor de potencial acumulado no substrato Lactato, enquanto que Cobre-Ferro tem maior valor no substrato Meio mineral.

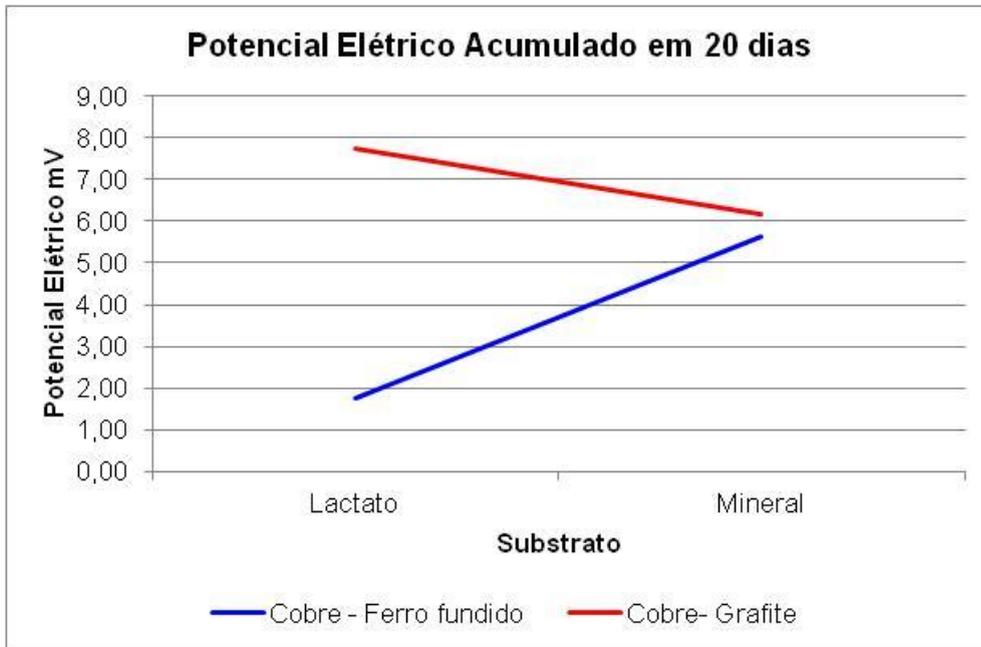


Gráfico 02: Relação entre Potencial Elétrico Acumulado em 15 dias com o substrato utilizado.

Fazendo a análise considerando os efeitos significativos, temos que o maior valor de potencial elétrico acumulado foi para *Pseudomonas aeruginosa*, eletrodo Cobre-Grafite e substrato Lactato, que teve uma média de 8,75 V. A menor média foi da bactéria *Escherichia coli*, eletrodo Cobre-Ferro Fundido e substrato Lactato.

Nas tabelas 06 e 07 estão expressos os valores de diferença de potencial acumulado e de pico de potencial respectivamente. Foi considerado que o valor da CCM sem inóculo manteve-se constante durante todo o experimento.

A partir da tabela 06, é possível observar que os melhores resultados de diferença de potencial acumulado ocorreram na conformação de meio lactato com eletrodo de grafite. A única conformação na qual a *E. coli* foi mais eficiente do que a *P. aeruginosa* foi com meio lactato e eletrodo de ferro.

Tabela 06: Diferença de Potencial Acumulado em 20 dias (V)

		Branco (V)	<i>E. coli</i> (V)	<i>P. aeruginosa</i> (V)
Meio Mineral	Grafite	7,097 ± 0,001	5,02 ± 0,07	7,70 ± 0,03
	Ferro	6,843 ± 0,001	4,80 ± 0,09	7,45 ± 0,08
Meio Lactato	Grafite	8,981 ± 0,001	7,12 ± 0,07	8,75 ± 0,01
	Ferro	0,758 ± 0,001	1,97 ± 0,03	1,86 ± 0,02

Na tabela 07, observa-se que os maiores picos de diferença de potencial também foram provocados em meio lactato com eletrodo de grafite. No meio mineral é possível observar uma diferença maior entre os picos de CCM inoculadas com *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 07: Pico de Diferença de Potencial (V)

		Branco (V)	<i>E. coli</i> (V)	<i>P. aeruginosa</i> (V)
Meio Mineral	Grafite	0,3549 ± 0,001	0,36 ± 0,07	0,43 ± 0,03
	Ferro	0,3422 ± 0,001	0,35 ± 0,09	0,44 ± 0,08
Meio Lactato	Grafite	0,4490 ± 0,001	0,47 ± 0,07	0,46 ± 0,01
	Ferro	0,0379 ± 0,001	0,14 ± 0,03	0,11 ± 0,02

Os gráficos 3 e 4 mostram a subtração da diferença de potencial acumulada nas CCM sem inóculo na diferença de potencial acumulada nas CCM inoculadas (*E. coli* e *P. aeruginosa* respectivamente).

O gráfico 3 indica que a *E. coli* teve uma função predominante de inibição na diferença de potencial do que de geração dessa grandeza. Apenas na CCM do meio lactato com eletrodo de ferro ocorreu uma geração de potencial. Além disso, observa-se que dentre os dois eletrodos, a *E. coli* se adaptou melhor ao de ferro, já que nos dois meios ela apresentou melhores resultados: no meio mineral, uma inibição mais branda até o 13º dia do que com o eletrodo de grafite (mineral-ferro: 0,151 V; mineral-grafite: 0,156 V) e no meio lactato uma geração de diferença de potencial.

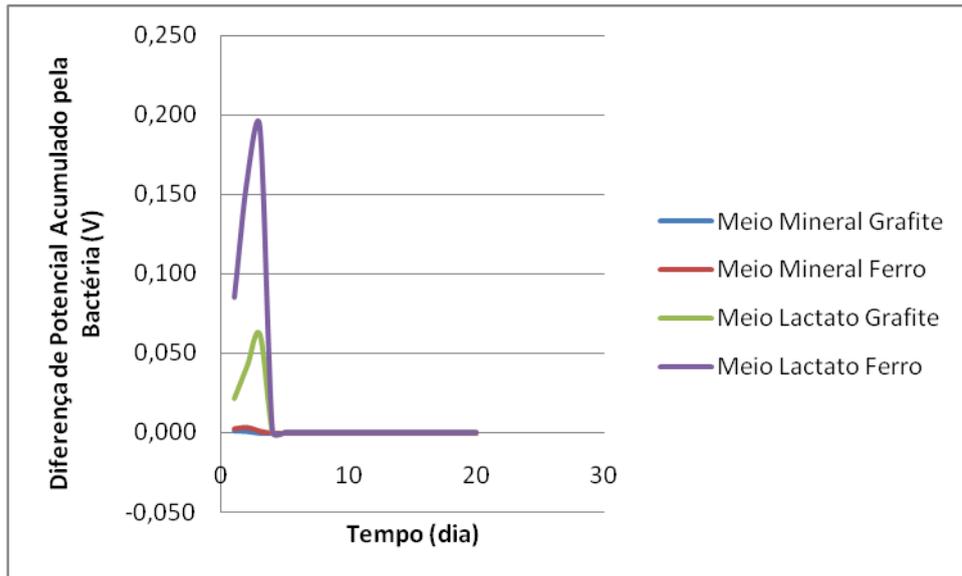


Gráfico 3 - Subtração da diferença de potencial acumulada (V) nas CCM sem inóculo na diferença de potencial acumulada nas CCM inoculadas com *E. coli*.

No caso das CCM inoculadas com *P. aeruginosa*, foi possível observar geração de diferença de potencial elétrico naquelas com meio mineral, e na de lactato com eletrodo de ferro. Na CCM com meio lactato e eletrodo de grafite, observou-se uma inibição na geração de diferença de potencial. O melhor desempenho de produção de potencial pelos microrganismos foi notado na célula de meio lactato com eletrodo de ferro.

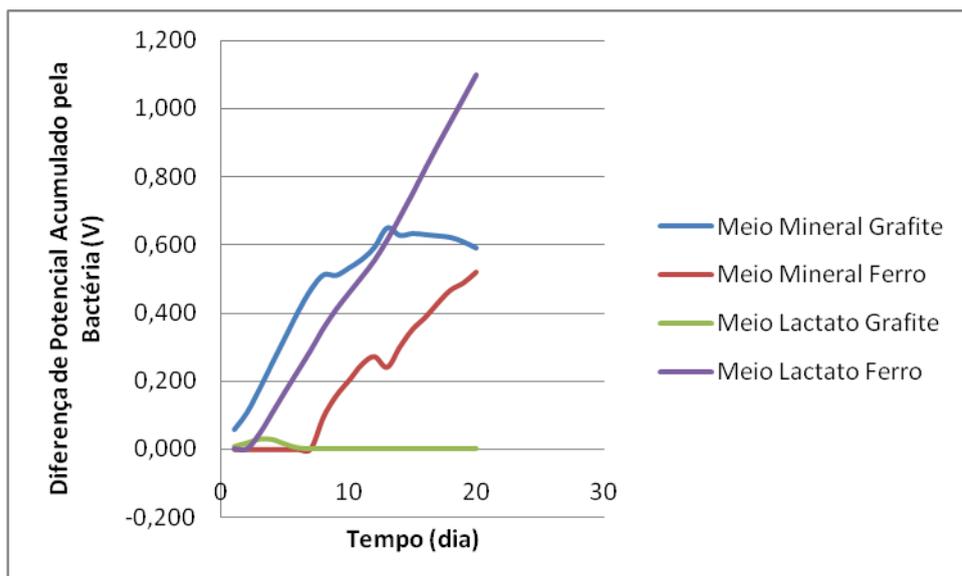


Gráfico 4: Subtração da diferença de potencial acumulada nas CCM sem inóculo na diferença de potencial acumulada nas CCM inoculadas com *P. aeruginosa*.

Os gráficos 5 e 6 representam a diferença de potencial acumulada total de cada CCM inoculadas com *E. coli* ou *P. aeruginosa*. A partir desses gráficos, é possível observar que a diferença de potencial relativa à produção do microrganismo é maior para *P. aeruginosa* do que para *E. coli*. Enquanto na primeira, 3 conformações apresentaram geração de diferença de potencial, nas CCM inoculadas com *E. coli* apenas uma conformação apresentou resultado positivo, como observado em Raghavulu (2011).

Os melhores resultados de potencial acumulado, para as duas bactérias (7,123 V para a *E. coli* e 8,751 V para a *P. aeruginosa*), foram obtidos no experimento com meio lactato e eletrodo de grafite, mas isso deve-se apenas à estrutura química da CCM. Apesar da estrutura com meio lactato e eletrodo de ferro também possuir o menor valor acumulado (para as duas bactérias), é nessa conformação que há maior atividade bioeletroquímica.

A inibição da geração de voltagem ocorrida pode ser atribuída a três fatores: aumento de toxicidade do meio lactato e conseqüente mortandade de microrganismos; diminuição do pH para um pH diferente do ótimo para a bactéria devido à fermentação e a diminuição no teor de açúcares, causado pelo seu consumo.

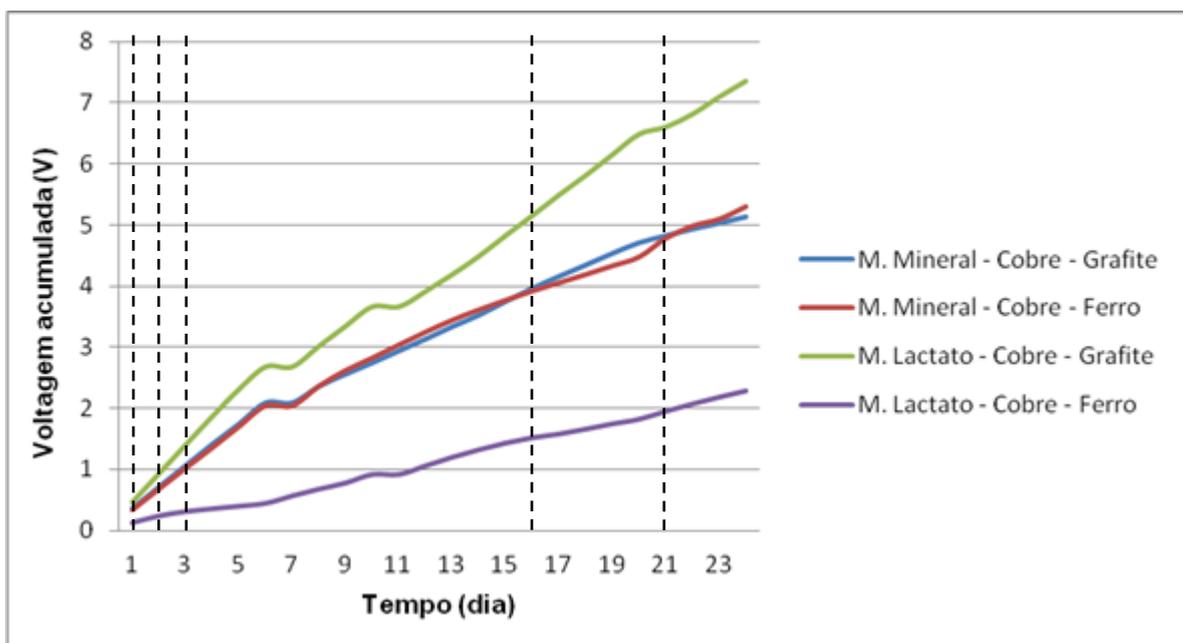


Gráfico 5: Voltagem acumulada nas CCM inoculadas com *E. coli* 8739 em meio mineral e lactato, com eletrodos Cobre - Grafite e Cobre - Ferro. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

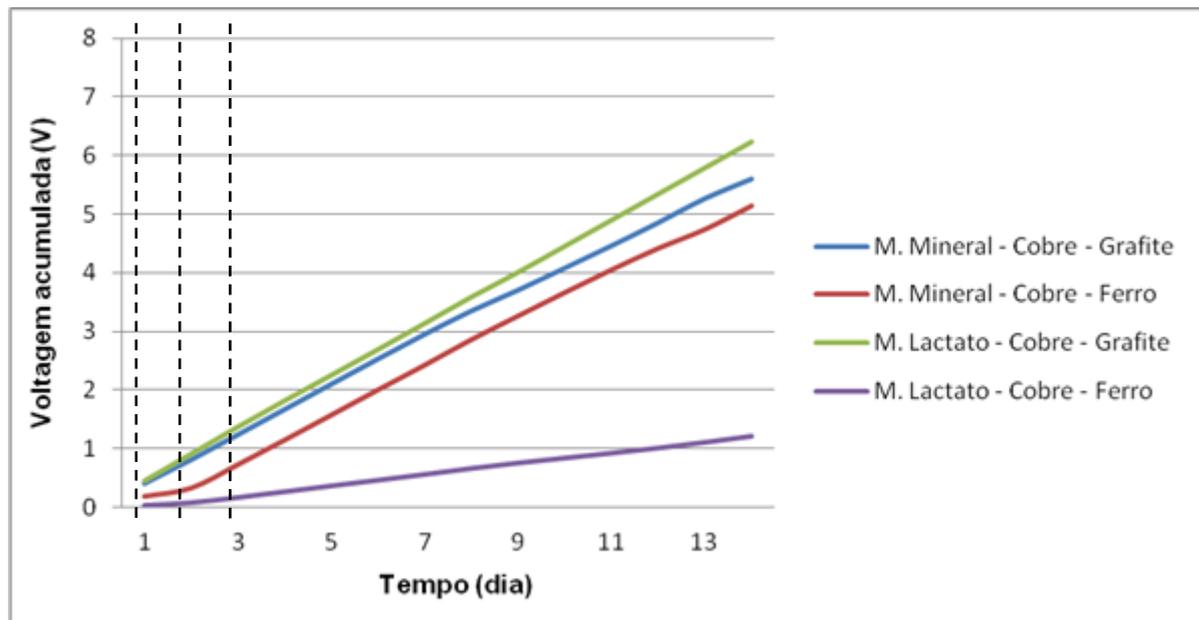


Gráfico 6 – Voltagem acumulada nas CCM inoculadas com *P. aeruginosa* 27853 em meio mineral e lactato, com eletrodos Cobre - Grafite e Cobre - Ferro. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

Os gráficos 7 e 8 mostram a medição da diferença de potencial ao longo do tempo de experimento para CCM inoculadas com *E. coli* e *P. aeruginosa* respectivamente.

Percebe-se que nas CCMs contendo meio mineral nos oito primeiros dias (eletrodo de grafite) e dez primeiros dias (eletrodo de ferro) o valor observado manteve-se mais alto e estável. Isto ocorreu, muito provavelmente, devido à adição de glicose nos três primeiros dias.

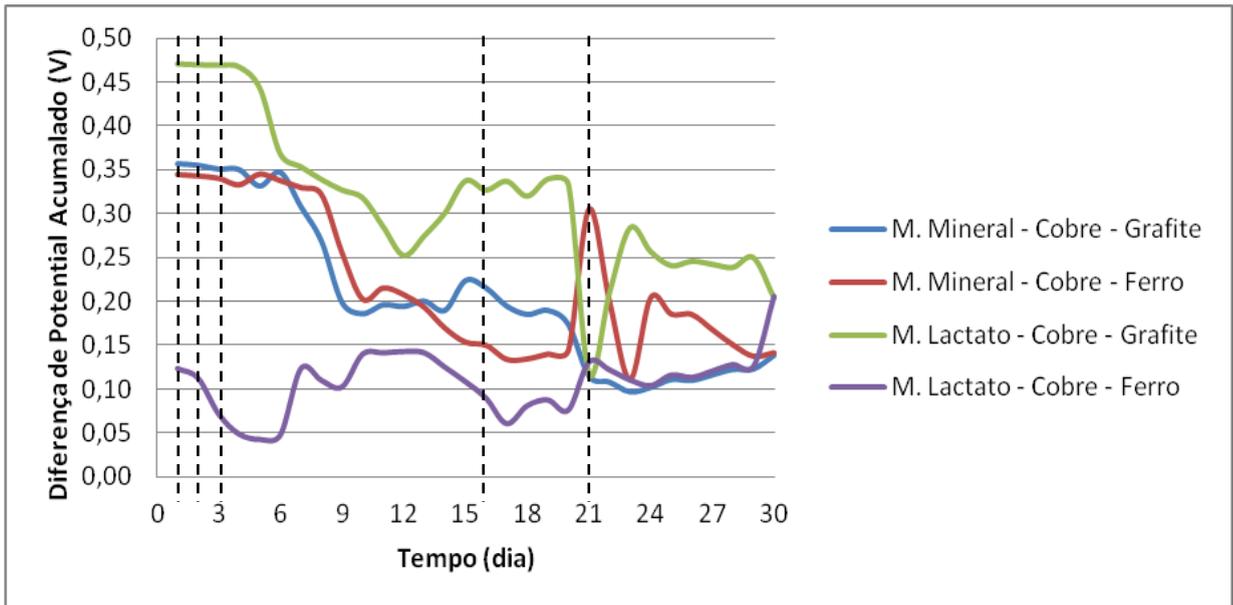


Gráfico 7: Geração de Diferença de Potencial Elétrico nas CCMs inoculadas com *E. coli* 8739 em meio mineral e lactato, com eletrodos Cobre - Grafite e Cobre - Ferro. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

Os valores de diferença de potencial com *Escherichia coli* no meio mineral com eletrodo de ferro no 23º dia pode ser justificado pela adição de glicose no meio no 21º dia de operação. No 30º nota-se também um pico de potencial elétrico, provavelmente causado pelo mau-contato na ponte salina no dia anterior. Como o valor medido no 28º provavelmente foi influenciado negativamente pelo mau-contato no dia anterior, a medição do 29º dia mostra um pico aparente. O problema aconteceu em apenas uma das duplicatas, e influenciou no resultado da média.

Kim et al. (2011) demonstraram a dependência entre geração de diferença de potencial elétrico e adição de glicose. O mesmo foi observado nesse trabalho, como expresso nos gráficos 8 (*E. coli*) e 9 (*P. aeruginosa*).

O decaimento de voltagem gerada nas CCMs com meio lactato e eletrodo de ferro do 3º ao 6º dia deve-se à uma mal conformação da ponte salina, que provavelmente impedindo a troca de íons. . Como a conformação da ponte salina era muito frágil, qualquer movimento nas câmaras poderia fazer com que não se conseguisse medir uma diferença de potencial, caracterizando esse mau-contato. Quando esse problema foi resolvido no 7º dia a voltagem se apresentou 0,123 V, igual à encontrada no 1º dia, e apresentou um decaimento de 0,048 V nos 20 dias, mais branda do que as outras CCM (lactato- grafite: 0,137 V; mineral-grafite: 0,183 V; mineral-ferro 0,200 V).

Nas CCMs inoculadas com *P. aeruginosa*, a conformação que apresentou um comportamento crescente até o valor de 0,436 V (pico) no 8º dia de operação na geração de diferença de potencial foi a do meio mineral com eletrodo de ferro. Outra conformação que obteve também um crescimento durante os 3 primeiros dias foi a conformação lactato-ferro que subiu de 0,025 V para 0,090 V nesse período. As outras duas mantiveram-se constantes (mineral-grafite: $0,442 \pm 0,008$ V em 8 dias, lactato-grafite: $0,455 \pm 0,005$ V em 8 dias;). Esse valor pode ter sido devido a um mau-contato na ponte salina durante os dois primeiros dias. O comportamento constante pode ser explicado por um período de adaptação das células ao meio (RODRIGO et al., 2009).

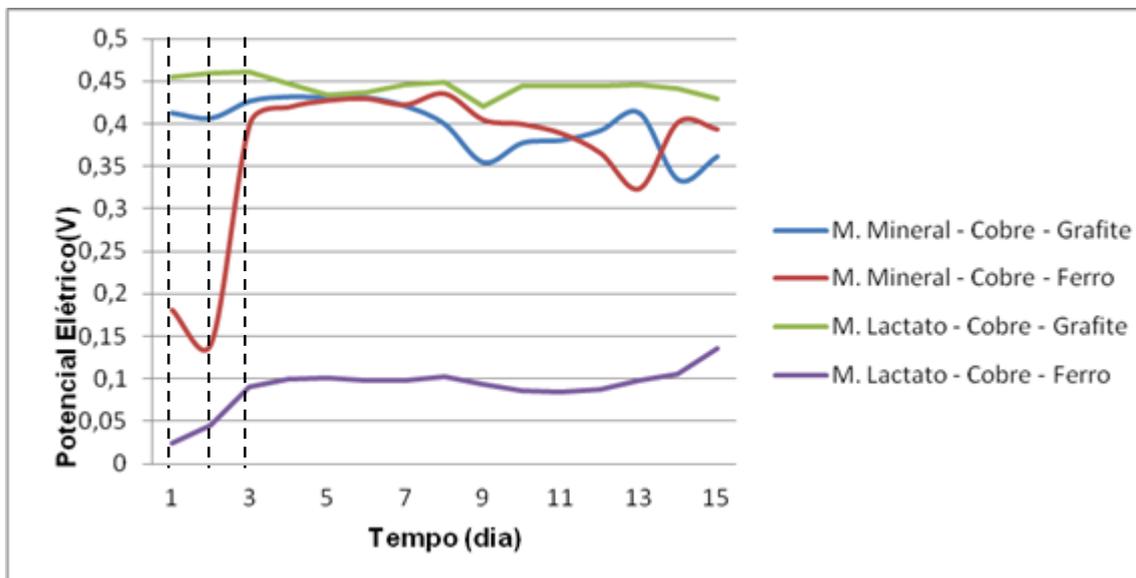


Gráfico 8: Geração de Diferença de Potencial Elétrico nas CCM inoculadas com *P. aeruginosa* 27853 em meio mineral e lactato, com eletrodos Cobre - Grafite e Cobre - Ferro. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

5.2 DEGRADAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A análise de degradação de açúcares redutores foi executada com o objetivo de relacionar a degradação de matéria orgânica e geração de diferença de potencial. Em diversos trabalhos (KIM, 2002, Rabaey et al, 2003; RABAEY, 2004; 2005) foi comprovada a conversão de glicose em energia elétrica pelos microrganismos, sempre havendo um pico de potencial elétrico quando adicionado a glicose (RABAYE et al., 2003) tanto quando utilizado *E. coli* (Gráficos 5 e 6) como *P. aeruginosa* (Gráficos 7 e 8). Porém, no presente trabalho, o potencial não aumentou

com o acréscimo de glicose, mas quando essa glicose foi consumida, a diferença de potencial decaiu nos 20 dias de operação (*E. coli*-mineral-grafite: 0,183 V; *E. coli*-mineral-ferro: 0,200 V; *E. coli*-lactato-grafite: 0,137 V; *E. coli*-lactato-ferro: 0,048 V; *P. aeruginosa*-mineral-grafite: 0,075 V; *P. aeruginosa*-lactato-grafite: 0,038 V;).

Para as CCM inoculadas com *P. aeruginosa* e com eletrodos cobre-grafite não ocorreu decaimento da diferença de potencial elétrico. Isso pode ter ocorrido por causa de uma demora de adaptação da bactéria ao eletrodo (RODRIGO et al, 2009).

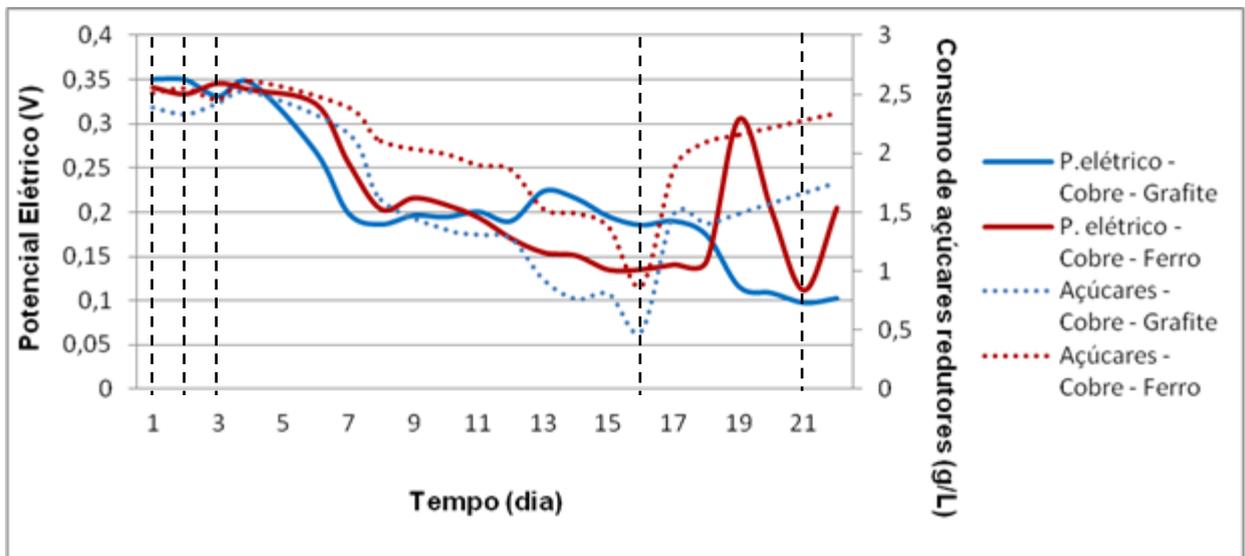


Gráfico 9 – Potencial elétrico x tempo e consumo de açúcares x tempo, das CCMs contendo meio mineral como substrato e *E. coli* 8739 como inoculo. As linhas verticais pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

A presença de glicose em uma CCM não inoculada não está relacionada com o potencial da célula. Isso porque a glicose não se dissocia na presença de água, o que não forma um eletrólito (CASTELLAN, 1991).

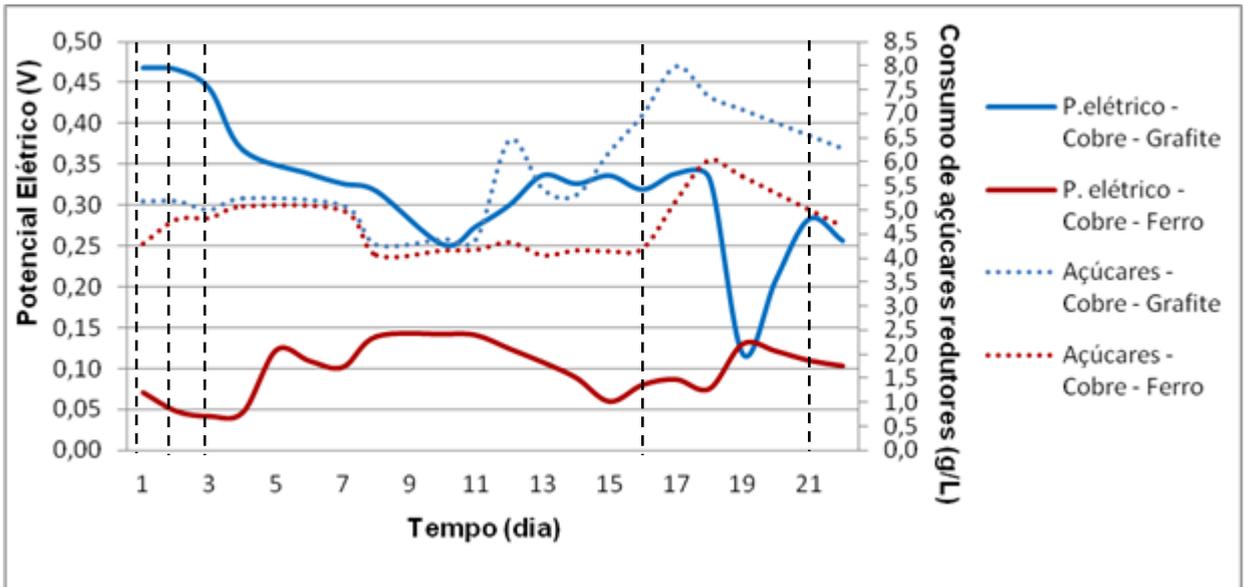


Gráfico 10 – Potencial elétrico x tempo e consumo de açúcares x tempo, das CCMs contendo meio lactato como substrato e *E. coli* 8739 como inoculo. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

Nas CCM com meio lactato, a concentração de açúcares redutores foi superior à das CCM com meio mineral. Isso ocorreu porque o método de açúcares redutores por DNS identifica não só açúcares, mas qualquer espécie redutora no meio. Além do próprio lactato ser uma espécie redutora, substâncias redutoras provenientes do metabolismo celular também podem ter interferido nessa análise.

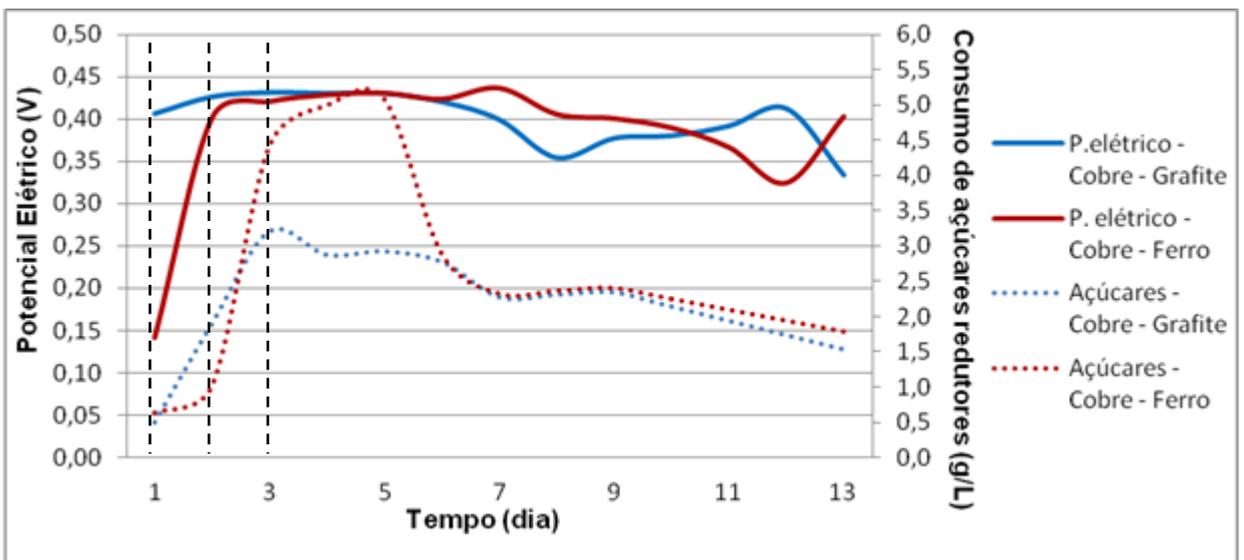


Gráfico 11 – Potencial elétrico x tempo e consumo de açúcares x tempo, das CCMs contendo meio mineral como substrato e *P. aeruginosa* 27853 como inoculo. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

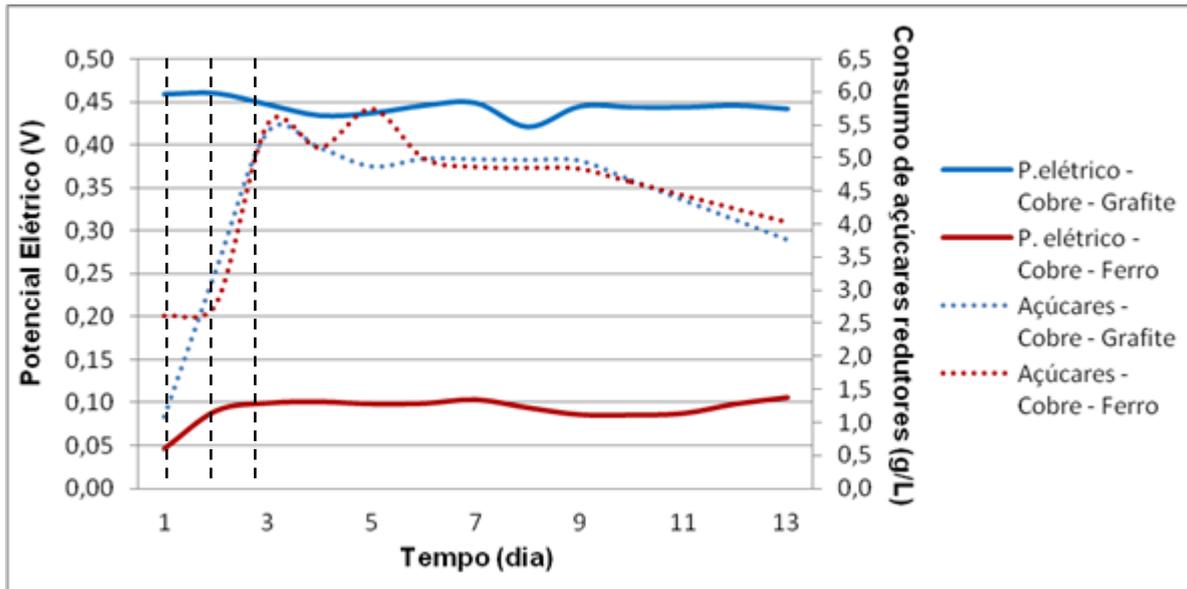


Gráfico 12 – Potencial elétrico x tempo e consumo de açúcares x tempo, das CCMs contendo meio lactato como substrato e *P.aeruginosa* 27853 como inoculo. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

No meio mineral a única fonte de carbono para a CCM era açúcar redutor, a quantidade avaliada representava apenas a quantidade de glicose. No meio lactato, no entanto, isso não ocorreu, o lactato de cálcio influenciou os resultados de concentração de açúcares redutores. Com isso, os resultados das células com o meio lactato ultrapassaram os 3 g/L de açúcares redutores adicionados inicialmente.

Porém, observou-se a degradação dos açúcares redutores ao longo do tempo, como esperado e uma relação positiva entre a degradação do substrato e geração de potencial elétrico (KIM et al., 2011; RABAEY et al., 2003).

5.3 MONITORAMENTO DO pH

Nas células das duas bactérias foi possível observar uma diminuição da diferença de potencial após algum tempo de operação. Isso provavelmente se deve a três fatores: o pH, a toxicidade do meio e à formação do biofilme.

O Gráfico 13 apresenta o comportamento do pH em CCM inoculadas com *E. coli*.

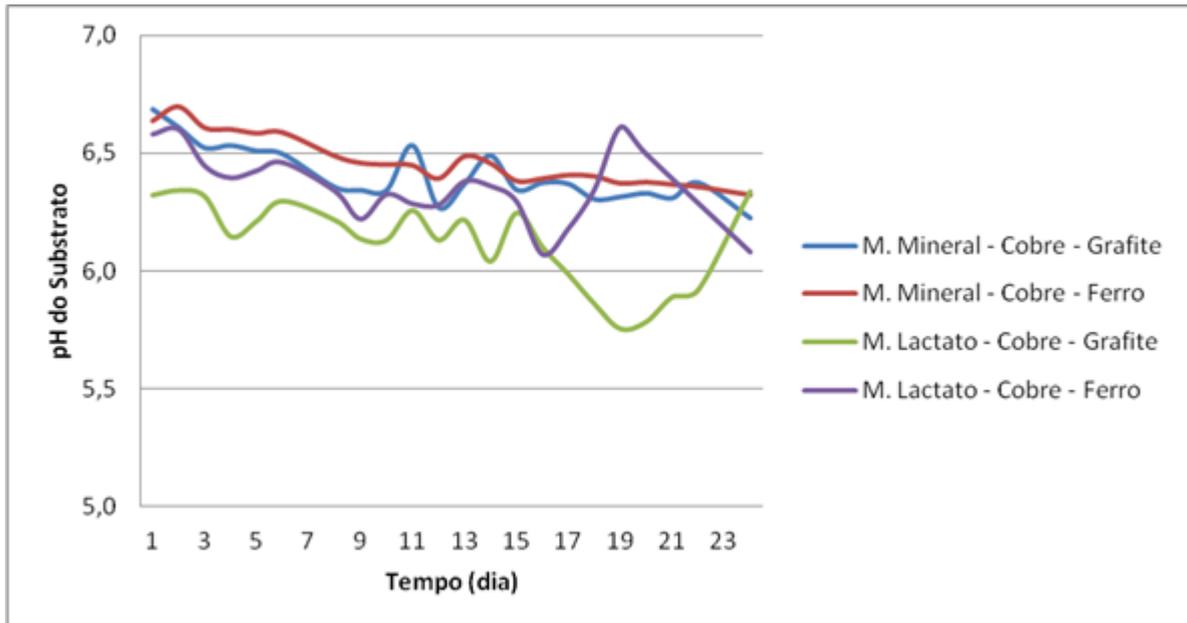


Gráfico 13 – Monitoramento do pH na Câmara anódica das CCM, inoculadas com *E. coli* e incubadas em 37°C.

O pH diminuiu e ficou abaixo do pH ótimo para o desenvolvimento desses microrganismos. Isso pode ter influenciado o resultado da voltagem já que em pH menor, o crescimento microbiano é também menor. Os microrganismos possuem a faixa ótima de pH entre 6 e 7 (CARNEIRO, 2008).

Em todas as CCM montadas os valores de pH da câmara anódica decresceram. Este resultado está de acordo com o observado por Giu et al. (2003), pois a produção de prótons executada pelas bactérias é feita em uma taxa maior do que seu transporte pela ponte salina ou pela membrana de separação das câmaras.

Nas CCM inoculadas com *P. aeruginosa* o pH do meio lactato decaiu com uma velocidade maior do que nas CCM com *E. coli*. Isso indica que essa bactéria tem taxas de conversão mais alta nesse meio, isto é, libera mais H^+ no meio que a *E. coli*, e a ponte salina não consegue enviá-los para o cátodo na mesma taxa.

O Gráfico 14 apresenta o comportamento do pH das CCMs inoculadas com *P. aeruginosa*.

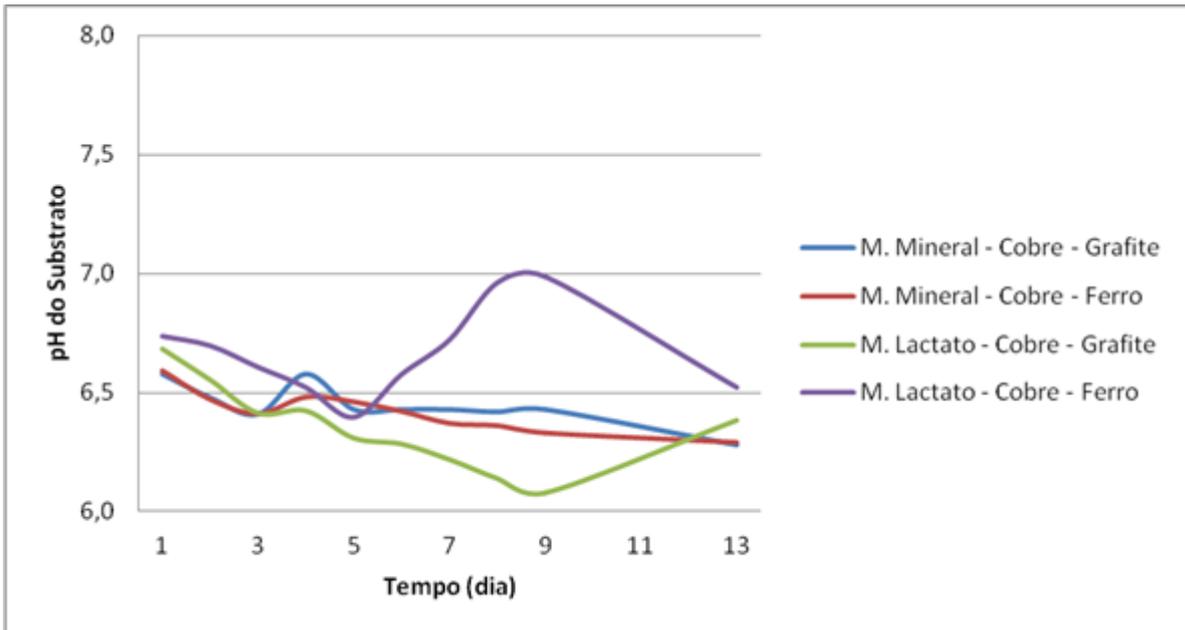


Gráfico 14: Monitoramento do pH na Câmara anódica das CCM, inoculadas com *P.aeruginosa* e incubadas em 37°C.

5.4 MONITORAMENTO DA POTÊNCIA ELÉTRICA

Os gráficos 15 e 16 mostram o comportamento da potência ao longo do tempo de experimento. Ela foi calculada com auxílio da Equação 5, e utilizando a impedância de entrada do multímetro como resistência externa.

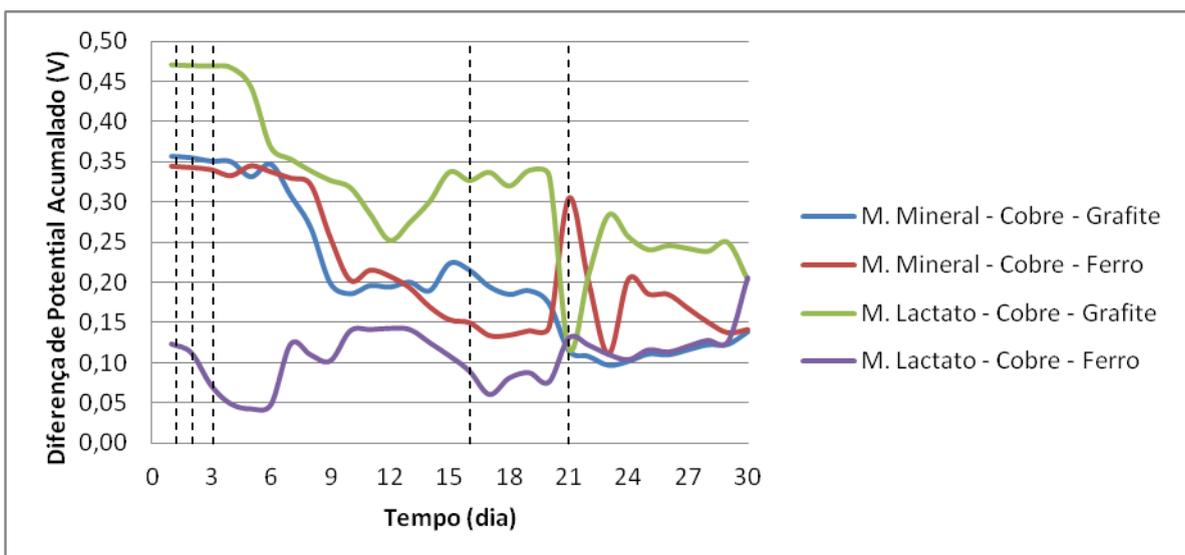


Gráfico 15 – Diferença de potencial elétrico utilizando $P = E^2/R$, ao longo de 30 dias nas CCMs inoculadas com *E. coli*. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

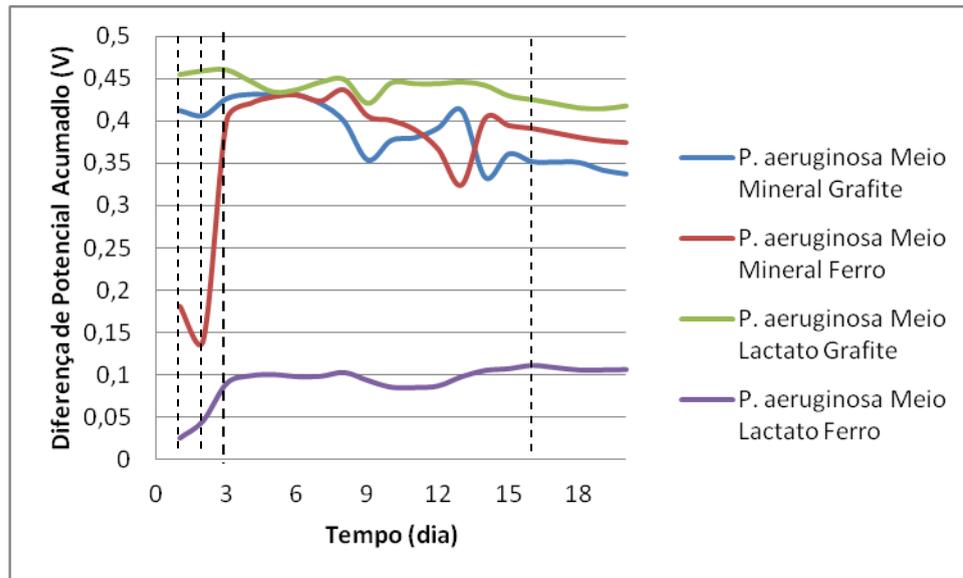


Gráfico 16 – Diferença de potencial elétrico calculado utilizando $P = E^2/R$, ao longo de 20 dias nas CCMs inoculadas com *P. aeruginosa*. As linhas pontilhadas referem-se aos dias nos quais houve adição de glicose.

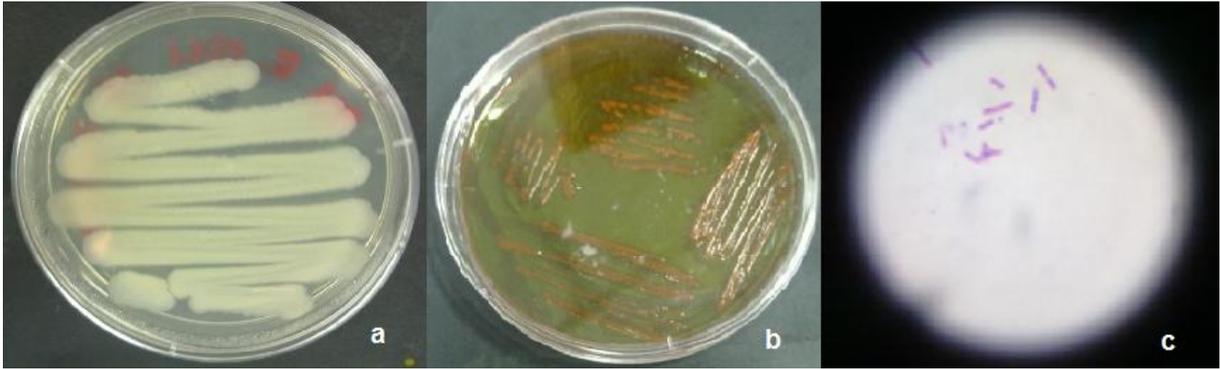
No trabalho de Reiche e Kirkwood (2012), na CCM operada com *E. coli* tendo como substrato de glicerol e eletrodos de malha de carbono, a máxima densidade de corrente elétrica obtida pela célula foi de $9,8 \text{ mA/m}^2$ de eletrodo.

Consideramos, nesse trabalho, que a única área do eletrodo é a área externa, ou seja, desconsiderando a porosidade do material, a potência máxima obtida foi de valores 20 vezes menores de densidade de potência comparando com Reiche e Kirkwood (2012). Isso pode ser devido a diversos fatores: a aeração do cátodo, presente no trabalho de referência; o pH do meio controlado; a área de contato dos eletrodos; o volume de eletrólito (que não consta na referência).

5.5 INÓCULO

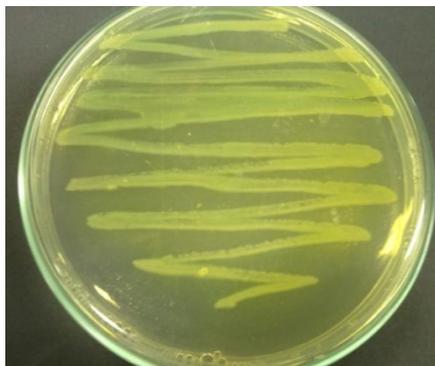
A ativação da bactéria *E. coli* ATCC 8739, por repique da cepa no ágar TSA, após 24h de incubação em estufa à 37°C , mostrou um crescimento espesso e uniforme (Fotografia 9a), como era o esperado.

A confirmação da ativação e isolamento da *E. coli* obteve-se através do cultivo em ágar EMB (Fotografia 9b) e o resultado da coloração de Gram (Fotografia 9c).



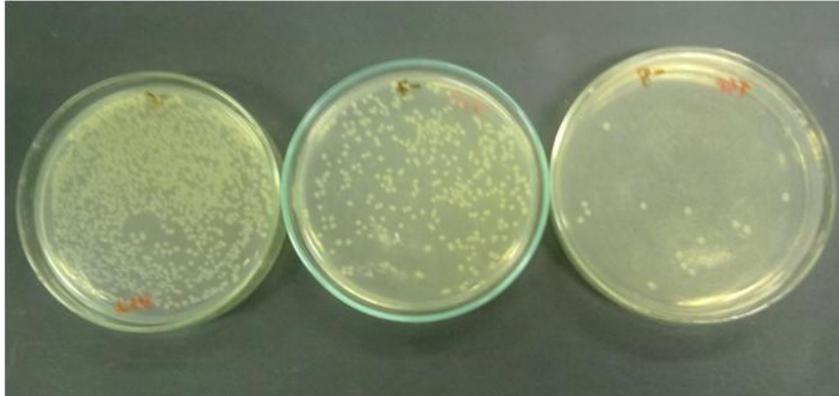
Fotografia 9 – (a) Cultivo de *E. coli* ATCC 8739 em ágar TSA, por 24h. (b) Cultivo de *E. coli* ATCC 8739 em ágar EMB, por 24h. (c) Lâmina de coloração de Gram da bactéria *Escherichia coli* ATCC 8739. Aumento 1000x.

Como a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi ativada a partir de uma cepa adquirida para o presente trabalho, não houve a necessidade de fazer testes para confirmar a sua pureza. Após ser diluída em caldo BHI, houve o cultivo em ágar Cetrímide (Fotografia 10), o cultivo apresentou coloração amarelo esverdeado, típico de *P. aeruginosa*.

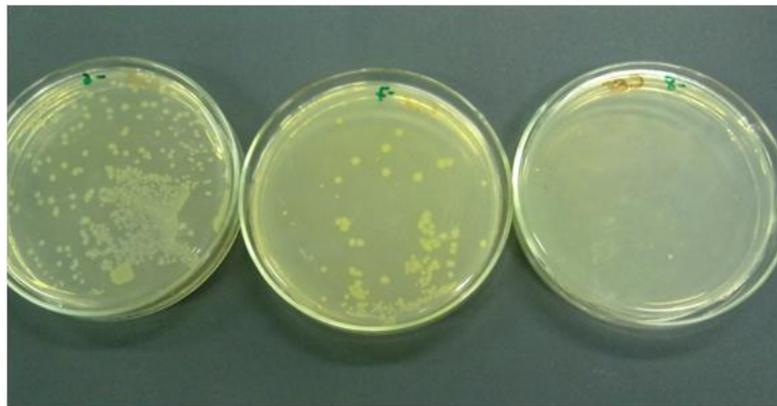


Fotografia 10 – Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 em ágar Cetrímide por 24h.

No plaqueamento para a diluição, utilizando a Escala de Macfarland, obteve-se $1,7 \cdot 10^9$ ufc/mL de *E. coli* (Fotografia 11) e $1,1 \cdot 10^9$ ufc/ml de *P. aeruginosa* (Fotografia 12).



Fotografia 11 – Resultado do plaqueamento da bactéria *E. colinas* diluições 10-6, 10-7 e 10-8, respectivamente, em ágar TSA incubado por 24h.



Fotografia 12 – Resultado do plaqueamento da bactéria *P. aeruginosa* nas diluições 10-6, 10-7 e 10-8, respectivamente, em ágar cetrimide incubado por 24h

O peso seco do inóculo foi estimado por análise gravimétrica (TORTORA; FUNKE; CASE; 2010). Primeiramente as membranas (com porosidade de 0,45 μm) foram secas em estufa 60°C por 12h (FILHO; LÓPEZ, 2010), sendo em seguida pesadas. A filtração de 1mL dos inóculos foi feita em duplicata, com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após a filtração as membranas foram deixadas na estufa a 60°C durante 12h e, então, foram pesadas. De acordo com o peso seco, a quantidade de inóculo adicionada em cada CCM foi de 3,2g/L de *E. coli*, em oito células, e 2,7 g/L de *P. aeruginosa*, nas oito células restantes.

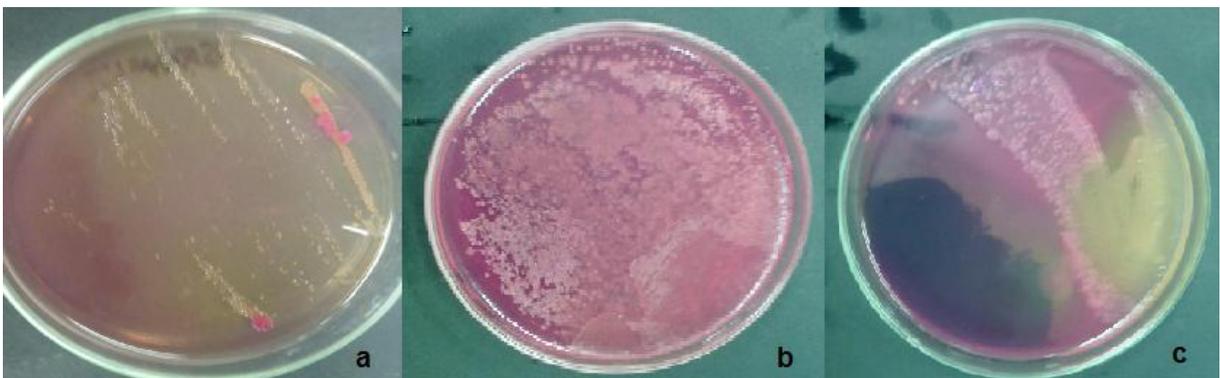
5.6 MONITORAMENTO DOS MICRORGANISMOS INOCULADOS

A análise qualitativa demonstrou que as duas bactérias mantiveram-se ativas durante o experimento, sendo que as Fotografias 13a e 13b exemplificam o que foi observado no monitoramento.



Fotografia 13 – (a) Crescimento de *E. coli* MacConkey (b) – Crescimento de *P. aeruginosa* em ágar Cetrimide

Nas CCM que possuíam como inoculo a *E. coli* foi evidenciado o crescimento de outras bactérias, gram-negativas não fermentadoras de lactose (Fotografia 14a). Esse resultado pode ser justificado por contaminação cruzada decorrente da não esterilização da câmara anódica e do eletrodo, por exemplo.



Fotografia 14 – (a) Presença de bactérias lactose positiva, colônias púrpuras, e negativa, colônias incolores, nas CCMs inoculadas com *E. coli*. (b) Presença de colônias rosas e incolores indicam contaminação, o crescimento foi semelhante em todas as CCMs contendo meio mineral e inoculadas com *E. coli*. (c) Presença de diversos tipos de colônias na CCM inoculada com *E. coli* em meio lactato com eletrodo de ferro.

A presença de contaminação não precisa ser classificada como um aspecto negativo, pois a utilização de culturas mistas de bactérias é comum em CCMs que utilizam como substrato efluentes domésticos ou industriais (ZAIN et al. 2011; MIN et al. 2005), por exemplo.

A Tabela 08 mostra o resultado da quantificação celular feita no final dos experimentos.

Tabela 08: Quantificação celular realizada ao final dos experimentos. Cultivos realizados em 37°C/24-48h

Microrganismo	Substrato	Eletrodo	<i>E. coli</i> (MacConkey)	<i>P. aeruginosa</i> (Cetrimide)	PCA
<i>E. coli</i>	Lactato	Ferro-Cobre	ND	-	3.10^4
		Grafite - Cobre	ND	-	N.D
	Mineral	Ferro-Cobre	ND	-	$3,8.10^7$
		Grafite - Cobre	18.10^7	-	14.10^7
<i>P. aeruginosa</i>	Lactato	Ferro-Cobre	-	$3,2.10^5$	N.D
		Grafite - Cobre	-	$3,84.10^4$	N.D
	Mineral	Ferro-Cobre	-	N.D	N.D
		Grafite - Cobre	-	N.D	N.D

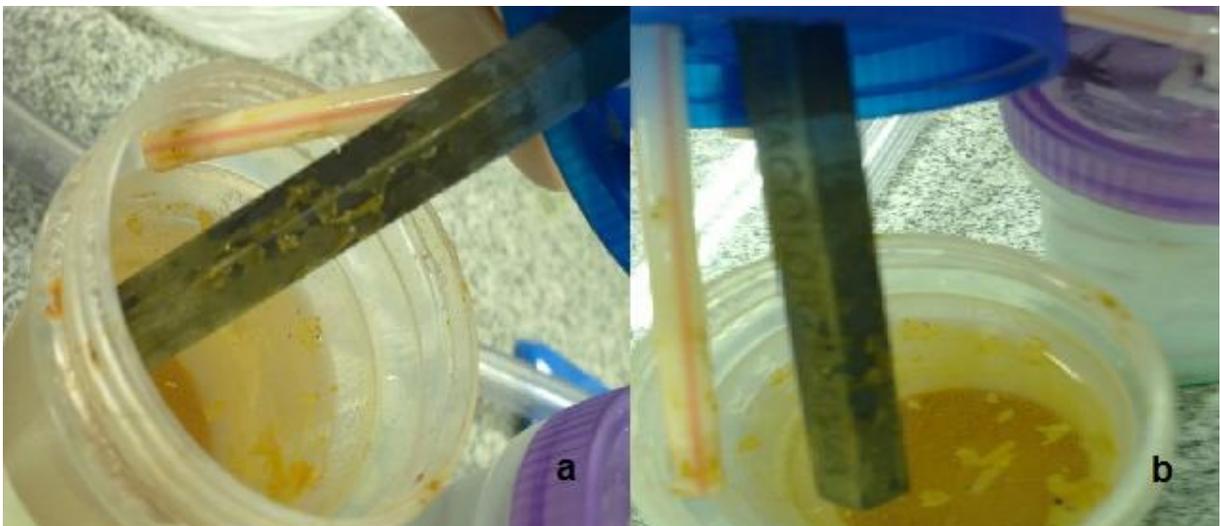
PCA: ágar de contagem padrão em placas (*plate count agar*)

Não foi possível quantificar a contaminação, pois houve problemas durante o experimento. Foi feito espalhamento, em placas contendo os meios MacConkey, Cetrimide e PCA, com diluição de 10^{-1} a 10^{-7} dos inoculados *E. coli* e *P. aeruginosa*. Após o espalhamento as placas foram incubadas por 24h em estufa a 37°, porém após as 24h a maioria das placas continham uma grande quantidade de água e em algumas o ágar derreteu, nas duas situação não houve crescimento microbiano.

Apenas 15 placas, aproximadamente 10% das placas, mantiveram-se secas e com crescimento microbiano. Dessas, apenas 7 foram passíveis de contagem, as outras tiveram um crescimento muito grande, inviabilizando a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

Em todas as células quantificadas houve diminuição de UFC em relação a quantidade que foi inoculada, mostrando que houve mortandade de células durante o experimento.

Foi verificada a formação de biofilme, evidenciada tanto nas células contendo *E. coli* (Fotografia 15a) quanto nas células contendo *P. aeruginosa* (Fotografia 15b), porém apenas das câmaras que continham lactato. O início do crescimento do biofilme variou: para *E. coli* foi evidenciado o crescimento do biofilme 72h após o início do experimento e para *P. aeruginosa* o crescimento iniciou-se com 24h apenas.



Fotografia 15 – (a) Formação de biofilme na CCM contendo *E. coli* como inoculo, grafite como eletrodo e lactato como substrato, foi evidenciada após 72h de incubação à 37°C. (b) Formação de biofilme na CCM contendo *P. aeruginosa* como inoculo, grafite como eletrodo e lactato como substrato, foi evidenciada após 24h de incubação à 37°C.

A formação de biofilme inicialmente é favorável na CCM. A interação microrganismo - eletrodo se dá de forma mais efetiva pelo contato entre eles. Porém, com o passar do tempo, ocorre a maturação do biofilme, a morte de células e o desprendimento desse material do eletrodo. A morte de microrganismos modifica a ação do biofilme: de um material condutor, ele passa a ser um material isolante (FRANKS; MALVANKAR; NEVIN, 2010).

No presente trabalho não houve uma análise aprofundada do biofilme, como em ZHAO et al. (2012), que houve a formação de biofilme na câmara anódica, inoculada com *E. coli*, utilizando como eletrodo papel carbono e glicose como substrato. O estudo do biofilme foi feito por Espectroscopia de Impedância

Electroquímica (EIS) para averiguar as reações eletroquímicas que ocorrem no biofilme.

6 CONCLUSÕES

A análise estatística demonstrou forte dependência da geração de potencial elétrico em relação à bactéria utilizada, à relação eletrodo e substrato e do próprio eletrodo escolhido. Os eletrodos de cobre-grafite possuem melhores resultados de potencial acumulado quando em meio lactato. Já os eletrodos cobre-ferro são mais eficientes quando em contato com o substrato mineral.

Dentre todas as conformações, aquela que apresentou o maior acumulado de diferença de potencial foi a CCM inoculada com *P. aeruginosas*, em meio lactato com eletrodo de grafite ($8,75 \pm 0,01$ V) e a pior conformação foi aquela inoculada com *P. aeruginosa*, em meio mineral com eletrodo de ferro ($1,86 \pm 0,02$).

Apesar disso, os resultados mostram que as conformações em que houve maior atividade bioeletroquímica foi em meio mineral com o eletrodo de ferro.

A dependência da concentração de açúcares na geração de diferença de potencial não foi como o esperado. A adição de açúcares não produziu picos de tensão, o que evidenciaria o trabalho do microrganismo. Isso deve-se a inúmeros fatores, como: estrutura da célula; diminuição do pH; formação de biofilme e toxicidade no meio.

O principal problema da estrutura da célula é a ponte salina. Como a ponte salina foi feita artesanalmente, a formação de bolhas dentro do canudo era uma situação desfavorável, mas que ocorreu e de formas diferentes em cada uma das pontes. A formação de bolhas nessa parte dificulta a passagem de íons, diminuindo assim a diferença de potencial da CCM.

Em relação ao pH, como as bactérias encontravam-se em situação anóxica, ocorreu a diminuição dessa variável pela fermentação dos microrganismos. A taxa de conversão da matéria orgânica não acompanhou a passagem de corrente elétrica, o que acabou acidificando o meio das bactérias. O pH mais baixo não era o ideal para os microrganismos estudados, o que acarreta em um menor metabolismo.

A formação do biofilme, no início é favorável, já que auxilia na interação bactéria-eletrodo. Porém, com a maturação desse biofilme, os microrganismos morrem e acabam se tornando um filme isolante à passagem de corrente elétrica.

A estrutura da célula foi pensada de forma que a contaminação da solução do cátodo e do ânodo fosse a mínima possível, porque como visto na literatura, essa contaminação diminui a diferença de potencial gerada.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Utilizar outra conformação de CCM como de câmara única em que seja possível a utilização de uma membrana de troca de elétricos ao invés de ponte salina, por exemplo.

Utilização de uma câmara anódica anóxica, para aumentar a eficiência durante a transmissão de íons para os eletrodos e conseqüente geração de diferença de potencial.

Fazer experimentos com outras bactérias, constantemente, citadas na literatura, como: *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella oniedensis* e *Geobacter sulfurreducens*, e comparar com os resultados obtidos nesse trabalho, avaliando qual possui a melhor eficiência.

Avaliar a eficiência de uma célula a combustível microbiana utilizando solo como substrato.

Utilizar o teste de Fehling ao invés do DNS de Miller, para quantificar a redução de açúcares.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, Petróleo. Disponível em: <[http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/07-Petroleo\(2\).pdf](http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/07-Petroleo(2).pdf)>. Acesso em: 27 mai.2012.

ANGENENTL.T.,KARIMK.,AL-DAHANM.H.,WRENNB.A.;DOMÍGUEZ- ESPINOSA R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **TRENDS in Biotechnology**,v. 22, p.477-485.2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10357: águas: determinação do pH: método eletrométrico. Rio de Janeiro,1999.

ATKINS, P.; PAULA, J. Físico-Química, 8º, Rio de Janeiro Ed. LTC, 2008.

CAI, J.; ZHENG, P.; ZHANG, J.; XIE, Z.; LI, W.; SUN, P.; Simultaneous anaerobic sulfide and nitrate removal coupled with electricity generation in Microbial Fuel Cell. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 224-228. 2013.

CARNEIRO, L.C.; Avaliação de *Escherichia coli* em manipuladores de alimentos da cidade de Morrinhos – GO. **Revista Vita et Sanitas**, v. 02, p; 32-42. 2008.

CASTELLAN, G. W. Fundamentos de Físico-Química. Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda, 1991.

CATAL, T.; LI, K.; BERMEK, H.; LIU, H. Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 175, p. 196-200. 2008

CHAUDHURI, S.K., LOVLEY, D.R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. **National Biotechnology**.v.21,p. 1129–1232.2003.

CHENG, S.; LIU, H.; LOGAN, B. E. Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 489-494. 2006.

CONSELHO NACIONAL DA INDÚSTRIA. **Matriz energética: Cenários, Oportunidades e Desafios**. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.cni.org.br/portal/data/files/8A9015D015A0F71F0115AE4>>

[B9A37466D/Matriz%20Energética.pdf](#)> Acesso em: 24 de maio de 2012.

DI LORENZO, M.; SCOTT, K.; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M. Effect of increasing anode surface area on the performance of a single chamber microbial fuel cell. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, ed. 1, p. 40-48. 2010.

DUMAS, C.; MOLLICA, A.; FÉRON, D.; BASSÉGUY, R.; ETCHEVERRY, L.; BERGEL, A.; Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials. **Electrochimica Acta**, v. 53, p.468-473. 2007.

EDDY, M. “Dirt Batteries” to Power Cellphones in Africa. GeekoSystem. Disponível em: <<http://www.geekosystem.com/microbial-fuel-cells/>>. Acesso em: 20 mai 2012.

ERABLE, B.; BERGEL, A.; First air tolerant effective stainless steel microbial anode obtained from a natural marine biofilm. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3302-3307. 2009

FERRONATO, G. R.; SALMASO, M. H.. Avaliação de atividade antimicrobiana de espécies de macrófitas aquáticas da região metropolitana de Curitiba, 2010.

FRANKS, A. E.; MALVANKAR, N.; NEVIN, K. P. Bacterial biofilms: the powerhouse of a microbial fuel cell. **FUTURE SCIENCE**, v. 4, p. 589-604. 2010.

FUTAMATA, H.; BRETSCHGER, O.; CHEUNG.; KAN, J.; OWEN, R. NEALSON, K. H. Adaptation of soil microbes during establishment of microbial fuel cell consortium fed with lactate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, ed. 1, p. 58-63. 2013.

GENTIL, Vicente. CORROSÃO. 3º edição. Rio de Janeiro, LTC – Livros Técnicos e Científicos, 1996.

GIL,G.;CHANG,I.;KIM,B.H.;KIM,M.;JANG,J.;PARK,H.S.;KIM,H.J. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. **Biosensors and Bioelectronics**,v. 18,p.327-224.2003.

GOMES, ADRIANO S. O. **Desenvolvimento de uma célula a combustível microbiana com culturas puras de *Pseudomonas aeruginosa* em meio de cultura de glicerol.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração: Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2011.

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

HERNANDEZ,M.; NEWMAND. Review Extracellular electrontransfer. **Cellular and Molecular Life Science**.v. 58,p.1562–1571.2001.

KARGI,F.;ELKER,S. High power generation with simultaneous COD removal using a circulating column microbial fuel cell. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84,ed. 7,p.961-965,jul. 2009.

KATURI, K.P.; SCOTT,K.. Electricity generation from the treatment of wastewater with a hybrid up-flow microbial fuel cell. **Biotechnology and Bioengineering**,v 107,ed. 1^a,p.52-58,set.2010.

KETHEESAN, B.; NIRMALAKHANDAN, N. Improving net energy gain in fermentative biohydrogen production from glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, ed. 18, p. 11693-11701. 2011.

KIM,B. H.; CHANG, I. S.; GADD, G. M. Challenges in microbial fuel cell development and operation. **Apply Microbiology & Biotechnology**,v. 76, p. 485-494.2007.

KIM,H.J.;HYUN,M.S.;CHANG, I.S.; KIM,B.H. A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*.**Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p.365-367.1999.

KIM,H.J.;PARK,H.S.;HYUN,M.S.;CHANG,I.S.;KIM,M.;KIM,B.H.A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p145-152. 2002.

KIM, K.; CHAE, K.; CHOI, M.; AJAYI, F. F.; JANG, A.; KIM, C.; KIM, I. S. Enhanced Coulombic efficiency in glucose-fed microbial fuel cells by reducing metabolite electron losses using dual-anode electrodes. **Bioresource Technology**, v. 102, v. 5, p. 4144-4149. 2011.

KRAMER, J.; SOUKIAZIAN, S.; MAHONEY, S.; HICKS-GARNER, J. Microbial fuel cell biofilm characterization with thermogravimetric analysis on bare and polyethyleneimine surface modified carbon foam anodes. **Journal of Power Sources**, v. 210, p 122-128. 2012.

LEHNINGER, A.L.; **Princípios de Bioquímica**. 4ed. Editora Sarvier. São Paulo. 2006.

LEPAGE, G.; ALBERNAZ, F. O.; PERRIER, G.; MERLIN, G.; Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes. **Bioresource Technology**, v 124, p. 199-207. 2012.

LEFEBVRE, O.; TAN, Z.; KHARKWAL, S.; NG, H.Y. Effect of increasing anodic NaCl concentration on microbial fuel cell performance. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 336-340. 2012.

LIU, Z.; LI, H. Effects of bio- and abio-factors on electricity production in a mediatorless microbial fuel cell. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, ed. 3, p. 209-214. 2007.

LIU, Z.; LIU, J.; ZHANG, S.; SU, Z. Study of operational performance and electrical response on mediator-less microbial fuel cells fed with carbon – and protein – rich substrates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, ed. 3, p 185-191. 2009

LIU, J.; QIAO, Y.; GUO, C. X.; LIM, S.; SONG, H.; LI, C. M. Graphene/carbon cloth anode for high-performance mediatorless microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v 114, p. 275-280. 2012.

LOGAN, B.E.; HAMELERS, B.; ROZENDAL, R.; VERSTRAETE, W.; RABAEYK. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. **Environmental Science & Technology**. v. 40, p.5181-5192.2006.

LOGAN, B.E.; CHENG, S.; WATSON, V.; ESTADT, G. Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air–Cathode Microbial Fuel Cells. **Environmental Science & Technology** .v. 41, p.3341-2246.2007.

LOGAN, B. E.; REGAN, J. M. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. **Trends in Microbiology**.v. 14, p512–518, 2006.

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

LOGAN, B. E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. **Microbiology**, v. 7, p.375-381.2009.

LOPES,G. Célula a Combustível – o futuro energético, hoje! **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**. v. 1, p.3-8,2006.

LOVLEY, D. R., PHILLIPS, E. J. P. Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6., p.1472-1480. Junho,1988

MARCON, L. R. C. **Potencialidade da célula combustível microbiana para a geração de energia elétrica a partir de esgoto sanitário**. 2011. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo,São Carlos.2011.

MCKINLAY,J.B.,ZEIKUS,J.G.Extracellularironreductionismediatedinpartby neutral red and hydrogenase in Escherichia coli. **Applied Environmental Microbiology**.v. 70,p.3467–3474.2004.

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

MIN, B.; LOGAN, B. E. Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. **Environmental Science & Technology**30,p.5809-5814. 2004.

MIN,B.;CHENG,S.;LOGAN,B.E.Eletricitygenerationusingmembraneandsalt bridge microbial fuel cells. **Water Research**,v. 39, p.1675-1686.2005.

MONTEIRO,C.L.B.;COGO,L.L.;GALARDA,I;BORTOLOZZIFILHO,F.C. **Manual Teórico-Prático de Procedimentos Básicos em Microbiologia Médica**. Curitiba,2009. p.205

NIMJE, V. R.; CHEN, C. C.; CHEN, H. R.; CHEN, C. Y.; TSENG, M. J.; CHENG K. C.; SHIH, R. C.; CHANG, Y. F. A Single-Chamber Microbial Fuel Cell without an Air Cathode. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3933-3948. 2012.

OZBUDAK, E. M.; THATTAI, M.; LIM, H. N.; SHRAIMAN, B. I.; OUDERNAARDEN, A. V. Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*. **Nature**, v. 427, p. 737-740. 2004.

PARK,D.H.;ZEIKUS,J.G. Impact of composition on electricity generation in a single

compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*. **Apply Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p.58-61.2002.

PICOT, M.; LAPINSONNIÈRE, L.; ROTHBALLER, M.; BARRIÈRE, F.; Graphite anode surface modification with controlled reduction of specific aryl diazonim salts for improved microbial fuel cells power output. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, ed. 1, p. 181-188. 2011.

RABAEY, K., LISSENS, G., SICILIANO, S. D., VERSTRAETE, W. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. **BiotechnolLett**. 2003.

RABAEY, K.; CLAUWAERT, P.; AELTERMAN, P.; VERSTRAETE, W. Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. **Environmental Science & Technology** **39**, p.8077-8082. 2005.

RABAEY, K.; VERSTRAETE, W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p.291-298, 2005.

RACHINSKI, S.; CARUBELLI, A.; MANGONI, A. P.; MANGRICH, A. S. Pilhas de combustíveis microbianas utilizadas na produção de eletricidade a partir de rejeitos orgânicos : uma perspectiva de futuro. **Química Nova**. v.33, No.8, p. 1773-1778 2010.

RAGHAVULU, S. V.; SARMA, P. N.; MOHAN, S. V.; Comparative bioelectrochemical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* with anaerobic consortia as anodic biocatalyst for biofuel cell application. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, ed. 3, p. 666-674. 2011.

RAHIMNEJAD, M.; MOKHTARIAN, N.; NAJAFPOUR, G. D.; GHOREYSHI, A. A.; DAUD, W. R. W. Effective parameters on performance of Microbial Fuel Cell. Second International Conference on Environmental and Computer Science. 2009.

READ, S. T.; DUTTA, P.; BOND, P. L.; KELLER, J.; RABAEY, K. Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes. **BMC Microbiology**. 2010.

REZAEI, F.; RICHARD, T. L.; BRENNAN, R. A.; LOGAN, B. E. Substrate-Enhanced Microbial Fuel Cells for improved Remote Power Generation from Sediment-Based Systems. **Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 4053-4058. 2007.

RITCHER, H.; MCCARTHY, K.; NEVIN, K. P.; JOHNSON, J. P.; ROTELLO, V. M.; LOVLEY, D. R. Electricity Generation by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Gold Electrodes. **Langmuir**, v. 24, p. 4376-4379. 2008.

SVEDA, S.; SREEKRISHNAN, T. R. Effect of salt concentration and mediators in salt bridge microbial fuel cell for electricity generation from synthetic wastewater. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 47, ed. 6, p. 878-886. 2012.

TALARO, K.P. **Foundations in Microbiology**. 8ªed. Nova Iorque: The McGraw- Hill Companies. 2012.

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **MICROBIOLOGIA**. 8ªed. São Paulo: Artmed, 2005.

UNDEN, G.; BONGAERTS, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetic and transcriptional regulation in response to electrons acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1320, p. 217-234. 1997.

UOL Economia. ÍNDICES ECONÔMICOS: INFLAÇÃO E MAIS INDICADORES – Disponível em: <<http://economia.uol.com.br/cotacoes/indices.jhtm>>. Acesso em 25 jun 2012.

WEI, J.; LIANG, P.; HUANG, X. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 102, ed. 20, p. 9335-9344. 2011.

WEN, Q.; KONG, F.; ZHENG, H.; YIN, J.; CAO, D.; REN, Y.; WANG, G. Simultaneous processes of electricity generation and ceftriaxone sodium degradation in an air-cathode single chamber microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*, v. 196, p. 2567-2572. 2011.

ZHAN, Y.L.; QI, L.L.; WANG, Q.; LOU, Y.J.; YAN, G.X. Analysis of microbe in microbial fuel cell. **Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities**. v. 23, p. 445-449, jun. 2009.

ZHANG, Y.; SUN, J.; HU, Y.; LI, S.; XU, Q. Bio-cathode evaluations in microbial fuel cells: A comparison of graphite felt, carbon paper and stainless steel mesh materials. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, ed. 22, p. 16935 – 16942. 2012.

ZHAO, Y., LI, P., WANG, X., SUN, Y. Influence of initial biofilm growth on electrochemical behavior in dual-chambered mediator microbial fuel cell. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**. v.40. p. 967-972. 2012.