

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

RODRIGO JOSÉ MARASSI

CARACTERIZAÇÕES DE CÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS ALIMENTADAS
COM DIFERENTES EFLUENTES INDUSTRIAIS

VOLTA REDONDA
2016

RODRIGO JOSÉ MARASSI

**CARACTERIZAÇÕES DE CÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS
ALIMENTADAS COM DIFERENTES EFLUENTES INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Clemente Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro
Co-orientador: Dr. Gustavo Miranda Rocha

Volta Redonda, RJ
2016

M311 Marassi, Rodrigo José.

Caracterizações de células a combustível microbianas alimentadas com diferentes efluentes industriais. / Rodrigo José Marassi - Volta Redonda, 2016.

95 f. il.

Dissertação (Tecnologia Ambiental) - Universidade federal Fluminense.

Orientador: Gilmar Clemente Silva.

Co-orientador: Carlos Eduardo de Souza Teodoro; Gustavo Miranda Rocha

1. Sistemas bioeletroquímicos. 2. Bioeletrocatalise. 3. Energia renovável. 4. Aproveitamento de resíduos agroindustriais. I. Silva, Gilmar Clemente. II. Teodoro, Carlos Eduardo de Souza. III. Rocha, Gustavo Miranda.

CDD 660.62

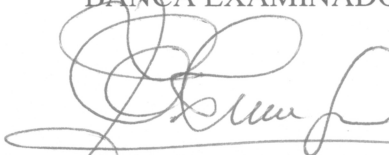
RODRIGO JOSÉ MARASSI

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA
ALIMENTADA COM DIFERENTES EFLUENTES INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Aprovado em 04 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr.º Gilmar Clemente Silva - UFF
Orientador



Prof. Dr.º Elivelton Alves Ferreira - UFF



Prof. Dr.º Eduardo Norberto Codaro - UNESP

Volta Redonda
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todo poderoso por me conceder paciência, sabedoria e proteção. Por seu filho Jesus Cristo sido fonte de inspiração, sua mãe Maria a intersecção.

Agradeço aos meus familiares por toda força e ajuda, minha mãe Marly que sempre acreditou nos meus esforços e na minha dedicação, obrigado por me ajudar sempre. A minha namorada Thalita pelo companheirismo, carinho e conselhos.

Agradeços a todos que fizeram parte deste trabalho como autores indiretos, assim como meus companheiros de trabalho nos laboratórios de biotecnologia e eletroquímica e colegas de universidade que me ajudaram com palavras de incentivos ou com conselhos técnicos. Os técnicos Matheus, Luis Celso e Alexandre, os alunos da pós-graduação companheiros de laboratório Thiago Brandão, Maria Maura, Natanael, Máira, os alunos da pós-graduação companheiros de disciplina Adir, André, Gustavo, Leandro, Mariana e Valquiria. E em especial os alunos de iniciação científica e estagiários que me ajudaram muito Ana Beatriz, Fabrício, Marcos e Carla.

Agradeço plenamente a todos da EEIMVR-UFF e a todos do Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental (PGTA), ao Professor Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro pelas orientações e seu investimento, ao Dr. Gustavo Miranda Rocha por suas orientações, e de modo especial ao Professor Dr. Gilmar Clemente Silva por acrescentar na minha formação acadêmica experiências incomparáveis, pelas horas de dedicação, conselhos sábios.

À FAPERJ, pela bolsa concedida.

RESUMO

Neste trabalho foi estudado o uso das células a combustível microbianas (CCMs) para gerar eletricidade, simultaneamente ao tratamento de efluentes. As células do tipo catodo-ar foram montadas com o anodo de carbono vítreo reticulado, catodo de tecido carbono e a membrana nafion. Como substratos foram usados os efluentes vinhaça, soro de leite e água residuária, oriundos das agroindústrias de etanol e leite, enriquecidos com alguns nutrientes inorgânicos e acetato de sódio. As CCMs foram caracterizadas usando a técnica da polarização eletroquímica avaliando os parâmetros densidade de corrente, densidade de potência e resistência interna em diferentes tempos de crescimento do biofilme e por técnicas químicas calculando a remoção da demanda química de oxigênio (DQO), eficiência coulômbica (EC) e descoloração. Os inóculos foram as bactérias eletrogênicas *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*. A CCM alimentada com vinhaça alcançou densidade máxima de potência de $0,93 \text{ W m}^{-3}$, $0,25 \text{ W m}^{-3}$ e $0,65 \text{ W m}^{-3}$ e remoção na DQO de 22 %, 28 % e 42 %, inoculada com a *Clostridium butyricum*, *Shewanella putrefaciens* e *Shewanella oneidensis*, respectivamente. Adicionalmente, foi testado uma co-cultura de *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum* em vinhaça, este sistema atingiu a densidade de potência de $1,05 \text{ W m}^{-3}$ e 57 % remoção de DQO. A mesma CCM alimentada com soro de leite e água residuária, inoculados com as bactérias *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*, produziu densidades máximas de potência de $0,98 \text{ W m}^{-3}$; $2,02 \text{ W m}^{-3}$ bem como remoção de DQO, 74 % e 43 %, respectivamente. A partir da técnica microscopia de força atômica observou-se que estas bactérias possuem forma de bastonetes com comprimento em torno de $1,3 \mu\text{m}$. Os resultados confirmam a CCM como uma tecnologia alternativa para produção de bioeletricidade e tratamento de efluentes industriais.

Palavras-chave: Sistemas Bioeletroquímicos. Bioeletrocatalise. Energia renovável. Aproveitamento de resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

In this work, microbial fuel cells (MFCs) were studied for electricity generation, simultaneously to the wastewater treatment. The cathode-air cell type, were assembled with anode the reticulated vitreous carbon foam, cathode the carbon cloth and nafion membrane. As substrates were used the effluent vinasse, whey and wastewater from the ethanol and agro milk industry, enriched with some inorganic nutrients and sodium acetate. The MFCs were characterized by electrochemical polarization technique measuring the parameters such as current density, power density and internal resistance for different times of biofilm growth and by chemical techniques calculating removals of chemical oxygen demand (COD), coulombic efficiency (CE) and decolorization. The inoculums were the electrogenic microorganisms *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella oneidensis* and *Clostridium butyricum*. The MFCs fed with vinasse achieved the maximum power density of 0.934 W m^{-3} , 0.25 W m^{-3} e 0.65 W m^{-3} and COD removal of 22 %, 28 % e 42 %, inoculated with *Clostridium butyricum*, *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella oneidensis*, respectively. Additionally, it was tested a co-culture of *Shewanella oneidensis* and *Clostridium butyricum* in vinasse, this system reached the power density of 1.05 W m^{-3} and 57 % COD removal. The same MFC fed with whey and wastewater, inoculated with *Shewanella oneidensis* and *Clostridium butyricum*, produced maximum power density of 2.02 W m^{-3} , 0.98 W m^{-3} , as well as COD removal of 74 % and 43 %, respectively. From the atomic force microscopy it was observed that these bacteria have a rod shape and length of around $1.3 \mu\text{m}$. These results confirm the MFC as an alternative technology to bioelectricity generation and industry wastewater treatment.

Keywords: Bioelectrochemical System. Bioelectrocatalysis. Renewable Energy. Reuse of Agroindustrial Wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Esquema de uma célula a combustível microbiana (Fonte: ZHUWEI, et al. 2007)	18
Figura 3.2 – Ilustração da atuação de mediadores. (Fonte: Adaptado de LOVLEY et al., 1996)	20
Figura 3.3 – Ilustração de uma Célula a Combustível Microbiana sem mediadores.	21
Figura 3.4 – Gráfico da evolução do números de registros de patentes segundo diferentes instituições.....	23
Figura 3.5 – Curva de polarização típica de uma célula a combustível microbiana	27
Figura 3.6 – Diagrama de potência de uma célula a combustível microbiana. (Extraída de Rosenbaum et al., 2007.)	29
Figura 4.1 – Projeto da Célula a Combustível Microbiana de compartimento único, com eletrodos de CVR (anodo), tecido de carbono (catodo) e separados pela membrana Nafion [®] com retentor de silicone.	35
Figura 5.1 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com <i>Clostridium butyricum</i> em vinhaça enriquecida e com acetato no período de 216 horas de operação.	49
Figura 5.2 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com <i>Shewanella oneidensis</i> em vinhaça enriquecida e com acetato no período de 336 horas de operação	51
Figura 5.3 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com <i>Shewanella putrefaciens</i> em vinhaça enriquecida e com acetato no período de 168 horas de operação	52
Figura 5.4 – Curva da potência gerada em relação com o tempo de operação para as bactérias <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> e <i>Shewanella oneidensis</i> em CCM alimentada com vinhaça enriquecida e com acetato.....	55
Figura 5.5 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com <i>Shewanella oneidensis</i> e <i>Clostridium butyricum</i> em vinhaça enriquecida e com acetato no período de 384 horas de operação	59
Figura 5.6 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com <i>Shewanella oneidensis</i> em efluente lácteo enriquecido e com acetato no período de 360 horas de operação.	63

Figura 5.7 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com <i>Clostridium butyricum</i> em efluente lácteo enriquecido e com acetato no período de 336 horas de operação.	64
Figura 5.8 – Curva de geração de potência com os respectivos tempos de ensaio de polarização para CCM inoculadas com as bactérias <i>Clostridium butyricum</i> e <i>Shewanella oneidensis</i> em efluentes lácteos.	66
Figura 5.9 – Varredura espectral da vinhaça antes (enriquecida) e depois do tempo de operação em CCM cultivada com cultura pura de: <i>Shewanella putrefaciens</i> (S.p.), <i>Shewanella oneidensis</i> (S.o.) e <i>Clostridium butyricum</i> (C.b).	74
Figura 5.10 – Varredura espectral para o soro de leite e água residuária antes (enriquecido) e depois do tempo de operação em CCM cultivada com cultura pura de: <i>Shewanella oneidensis</i> e <i>Clostridium butyricum</i>	76
Figura 5.11 – Imagem de Microscopia de Força Atômica do Biofilme de <i>Shewanella oneidensis</i> e <i>Clostridium butyricum</i> após ser cultivada em CCM com vinhaça, usando o modo Peak Force QMN.....	81
Figura 5.12 – Imagem de topografia em Microscopia de Força Atômica do Biofilme de <i>Shewanella oneidensis</i> e <i>Clostridium butyricum</i> após ser cultivada em CCM com vinhaça enriquecida após o período de incubação fixada em lâminas de vidro.	82
Figura 5.13 – Imagem em Microscopia de Força Atômica do Biofilme de <i>Shewanella oneidensis</i> após ser cultivada em CCM com soro de leite enriquecida, (A) imagem de força, (B) imagem da topografia.	83
Figura 5.14 – Imagem em 3D de topografia em Microscopia de Força Atômica do Biofilme de <i>Shewanella oneidensis</i> após ser cultivada em CCM com efluente lácteo enriquecida.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Caracterização de CCMs, mostrando com os parâmetros normalmente avaliados em CCM.	31
Tabela 4.1 – Meio de Cultura Agar Nutriente- AN.....	36
Tabela 4.2 – Meio de Cultura <i>Reforced Clostridial Medium</i> - RCM.....	37
Tabela 5.1 – Caracterização físico-química da vinhaça.	44
Tabela 5.2 – Caracterização físico-química do efluente soro de leite.....	46
Tabela 5.3 – Resultado estatístico para o desempenho eletroquímico junto com o desvio padrão para o efluente vinhaça em CCM inoculada com diferentes inoculos	54
Tabela 5.4 – Potência máxima alcançada por CCM em diferentes inóculos alimentadas com efluentes industriais.....	57
Tabela 5.5 – Parâmetros bioeletroquímicos em CCM para cultivo puro e co-cultura alimentados com vinhaça.....	60
Tabela 5.6 – Potência Máxima alcançada por CCM em diferentes Co-culturas.....	61
Tabela 5.7 – Resultados estatístico para as principais variáveis eletroquímica do sistema junto com desvio padrão, para o respectivo período de operação.	65
Tabela 5.8 – Potências máximas obtidas por CCM alimentadas com efluentes de indústria láctea.....	67
Tabela 5.9 – Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Eficiência coulômbica (EC) antes e após o tratamento em CCM.....	71
Tabela 5.10 – Parâmetros bioeletroquímicos de CCM em diferentes inoculos em substrato de vinhaça e efluente lácteo.....	78
Tabela 5.11 – Parâmetros Ambientais para tratamento dos efluentes em CCM inoculadas com diferentes inoculos.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	ampère
AFM	Atomic Force Microscopy
BEN	Balanço Energético Nacional
BOD	Biochemical oxygen demand
C	Coulomb
CCM	Célula a Combustível Microbiana
COD	Chemical oxygen demand
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
DO	Densidade óptica
<i>I</i>	Densidade de corrente
<i>P</i>	Densidade de potência
emf	força eletromotriz
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
EC	Eficiência Coulômbica
EUA	Estados Unidos da América
<i>F</i>	constante de faraday
<i>R_{int}</i>	Resistência interna
J	joules
kW	kilowatts
kWh	kilowatt hora
mA	miliampère
MME	Ministério de Minas e Energia
mV	milivolt
mW	miliwatt
N	número de elétrons por mol de reação
nm	nanômetros
OCP	Potencial em circuito aberto
PNE	Plano Nacional de Energia
PEM	Proton Exchange Membrane
Q	carga transferida em coulomb
R	Constante universal dos gases
RCM	Reinforced Clostridial Medium
TWh/ano	Tera watts hora por ano
V	volt
W	Trabalho realizado pela célula
W	watt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1. Descrição da Tecnologia.....	17
3.2. Histórico	19
3.3. Célula a Combustível Microbiana (CCM) como Tecnologia Ambiental.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Construção e manipulação da Célula a Combustível Microbiana	34
4.2. Preparação das cepas bacterianas para inoculação	35
4.3. Operação da Célula a Combustível Microbiana: preparação do substrato e inoculação	37
4.4. Análises químicas, bioquímicas e espectroscópicas do tratamento do efluente após o período de incubação em CCM	38
4.5. Ensaio de Desempenho da CCM por polarização eletroquímica.	40
4.6. Caracterização do Biofilme por Microscopia de Força Atômica	41
5. RESULTADOS E DISSCUSSÕES	42
5.1. Caracterização Físico-química dos efluentes vinhaça e soro de leite.....	42
5.2. Análise da Produção de Energia Elétrica Direta da Celula a Combustível Microbiana (CCM) por polarização eletroquímica	47
5.2.1. Cultura pura em CCMs alimentadas com efluente Vinhaça.....	47
5.2.2. Co-cultura de <i>Shewanella oneidensis</i> e <i>Clostridium butyricum</i> em CCM alimentada com vinhaça	57
5.2.3. Culturas com <i>Shewanella oneidensis</i> ou <i>Clostridium butyricum</i> em CCMs alimentadas com efluentes lácteos.....	61
5.3. Avaliação do Desempenho da Célula a Combustível Microbiana para o tratamento dos Efluentes	68

5.3.1. Remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e análise da Eficiência Coulumbica (EC).....	68
5.3.2. Avaliação do Índice de Descoloração por espectroscopia UV-vis.....	71
5.4. Produção de bioeletricidade x Tratamento de efluente em Célula a Combustível Microbiana (CCM).....	76
5.5. Análise do Biofilme por Microscopia de Força Atômica.....	80
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, há uma crescente conscientização e preocupação da população mundial com os impactos ambientais e a conservação dos recursos naturais. De maneira que, as ações e os planejamentos governamentais e empresariais têm sido tomados em direção da mitigação da degradação ambiental e preservação dos bens naturais.

Esta problemática ambiental originou fortes correntes no mundo, com o intuito de desenvolver pesquisas tecnológicas mais sustentáveis. Assim, se torna de essencial importância o emprego de novas tecnologias, para reduzir os impactos ambientais e ainda obter qualidade de vida em comum plano com crescimento econômico.

Neste contexto, o setor energético sofre pressão global por ser uma atividade altamente impactante, em função da manutenção de uma grande oferta de energia e a utilização de energias convencionais, muitas vezes não renováveis.

De fato, os impactos do setor energético podem ser observados em sua maior proporção no processo de industrialização da energia, no transporte e a transmissão de energia, e ainda no consumo de fontes energéticas não renováveis, como os combustíveis fósseis.

O cenário mundial do setor energético é altamente dependente dos combustíveis fósseis. Segundo a *Internacional Energy Agency* (2013) em um estudo estatístico do consumo total de energia no mundo, o petróleo apresentava a maior parcela de 40,8%, e apenas com 18,1 % a energia elétrica ocupa a segunda colocação e 12,4% a energia oriunda dos biocombustíveis e de resíduos, deste modo confirmando o domínio ainda da fonte não renovável.

O grande consumo de combustíveis fósseis pode provocar a emissão de gases, que são agentes do efeito estufa, agravantes do fenômeno do aquecimento global e além de acarretar outras reações mais complexas. E assim, conduzir a poluição atmosfera para diversos fenômenos prejudiciais em cadeia, entre estes podem ser citados os processos de *smog*, *smog* fotoquímico e acidificação dos corpos hídricos superficiais, como os rios e os lagos localizados próximos aos grandes centros urbanos e industriais (BAIRD e CANN, 2011).

Reduzir a dependência dos combustíveis fósseis pode fazer a diferença para melhorar a qualidade de vida da população. A produção de energia em larga escala, de forma sustentável e com responsabilidade social é um grande desafio para qualquer país.

Como a matriz energética brasileira está baseada na hidroeletricidade tem-se uma elevada participação de fonte renovável, mas por outro lado, este tipo de geração ainda causa impactos ambientais difíceis de serem mensurados e nem sempre há garantia de fornecimento de energia com qualidade.

Por exemplo, recentemente o país sofreu com a estiagem prolongada atípica para a ocasião, o que reduziu os reservatórios de água nas usinas a níveis críticos. Este fenômeno mais uma vez serviu de alerta para que sejam aceleradas a introdução de outras fontes de energia na matriz energética brasileira.

Algumas fontes de energia como eólica e fotovoltaica possuem grande potencial para serem implementadas no país, dependendo da região. Entretanto, o Brasil possui uma vocação ímpar para a bioenergia, por exemplo, investimentos aportados desde a década de 70 transformaram a cadeia produtiva do etanol brasileiro na mais eficiente do mundo.

Mais recentemente as inserções do biodiesel e do etanol de segunda geração estão confirmando esta vocação. Entretanto, para continuar na vanguarda da bioenergia é necessário que o país desenvolva tecnologias modernas, que aplicadas no processo de obtenção dos biocombustíveis, possam resultar em avanços no aproveitamento da energia da biomassa (SILVA et al., 2008).

Uma maneira de aumentar o poder a energia da biomassa é aproveitando-se os subprodutos e resíduos industriais que ainda possuam alta carga orgânica, como substrato em uma célula a combustível microbiana para geração direta de eletricidade (SANTOS et al., 2012).

As células a combustível microbianas permitem que seja obtido energia elétrica a partir de uma grande variedade de substratos, sendo que muitos deles são biomassas com baixo valor agregado ou resíduos até considerados passivos ambientais (SELEMBO et al., 2009; SILVA et al., 2011).

Neste sentido, este trabalho implicou na utilização de resíduos oriundos da produção do etanol e de laticínios como substrato nas células a combustível microbiana. Visto que ambos resíduos possuem alta carga orgânica relatada pela demanda química de oxigênio (DQO), são produzidos em larga escala no Brasil, por exemplo são esperados para a safra 2015/2016 da cana de açúcar produção em torno de 28 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2015), como para cada litro de etanol são gerados de 12 a 15 litros de vinhaça, um resíduo da produção, estima-se que sejam gerados da ordem de 325 bilhões de litros de vinhaça.

Neste estudo foram realizados ensaios eletroquímicos e químicos, para avaliar o desempenho da célula a combustível microbiana quanto à produção de bioeletricidade e redução do potencial poluidor da vinhaça ou do resíduo lácteo. A célula utilizado neste trabalho foi projetada para operar com anodo de carbono vítreo reticulado, catodo ao ar de tecido de carbono e inoculadas com cepas das bactérias exoeletrogênicas *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Construir uma célula a combustível microbiana (CCM) com catodo ao ar, baseada em um protótipo desenvolvido pelo Geuff, de maneira que produza energia elétrica e ao mesmo tempo em que reduza o potencial poluidor dos efluentes industriais. A CCM empregada como tecnologia ambiental agrega valor aos efluentes extraindo a energia dos mesmos por meio da biodegradação das substâncias poluentes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o comportamento eletroquímico das bactérias *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum* em meios de culturas à base de vinhaça e efluente lácteo.

Analisar o desempenho da célula a combustível quanto à capacidade de geração de corrente elétrica e potência, quando alimentada com substratos à base de vinhaça e efluente lácteo.

Quantificar a redução de DQO e cor dos efluentes depois de tratado pelo biorreator eletroquímico.

Caracterizar o biofilme formado pelas bactérias eletrogeradoras pela técnica de Microscopia de Força Atômica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA

Células a Combustível Microbianas, CCM, são dispositivos bioeletroquímicos capazes de converter a energia química das substâncias contidas no substrato diretamente em energia elétrica. Esta conversão é feita por meio de microrganismos do tipo bactérias, as quais atuam como bioeletrocatalisadores. De maneira que oxidam as substâncias químicas e geram elétrons durante o metabolismo, assim concomitantemente ocorre a biodegradação do substrato, ou seja, seu tratamento biológico (LOGAN et al., 2004; LOGAN et al., 2006; LOGAN, 2008).

As bactérias são organismos procariontes, microscópicos, com tamanho aproximado de 1 μm , que podem converter uma variedade enorme de substâncias em dióxido de carbono, água e energia. Assim, estes microrganismos usam a energia produzida para crescer e manter o metabolismo. Entretanto em determinadas montagens, denominadas células a combustível microbiana pode-se extrair uma parte desta energia na forma de eletricidade. Em alguns casos a eficiência coulômbica pode chegar ao excelente valor de 70% (ZHOU et al., 2012), dependendo do substrato, do material anódico e do material catódico.

Como toda a célula a combustível, a microbiana é composta de três componentes principais: anodo, catodo e eletrólito, considerados o “coração” da célula. As bactérias vivem no anodo, onde se encontram os substratos (substância química a ser metabolizada), como por exemplo, glicose, acetatos, resíduos industriais, efluentes domésticos, entre outros. A partir da degradação destes substratos são gerados dióxido de carbono, prótons e elétrons. Contudo, o anodo deve possuir condições essenciais para as bactérias se desenvolverem, como por exemplo, quantidade de matéria orgânica, pH ótimo, temperatura ótima, carga de eletrólitos e concentração baixa de oxigênio dissolvido (KIM et al., 2008).

Sob condições aeróbias, as bactérias usam oxigênio como receptor de elétrons para produzir água. Porém, no anodo de uma CCM, não há presença de oxigênio, então as bactérias precisam mudar o receptor natural de elétron por outra substância, que no caso é o material anódico da CCM (RABAEY e VERSTRAETE, 2005). Devido à habilidade das bactérias para transferir elétrons ao material anódico, pode-se usar uma CCM para coletar os elétrons oriundos

do metabolismo microbiano, pois os elétrons produzidos são transferidos para o anodo (terminal negativo) e fluem para o catodo (terminal positivo) (Figura 3.1).

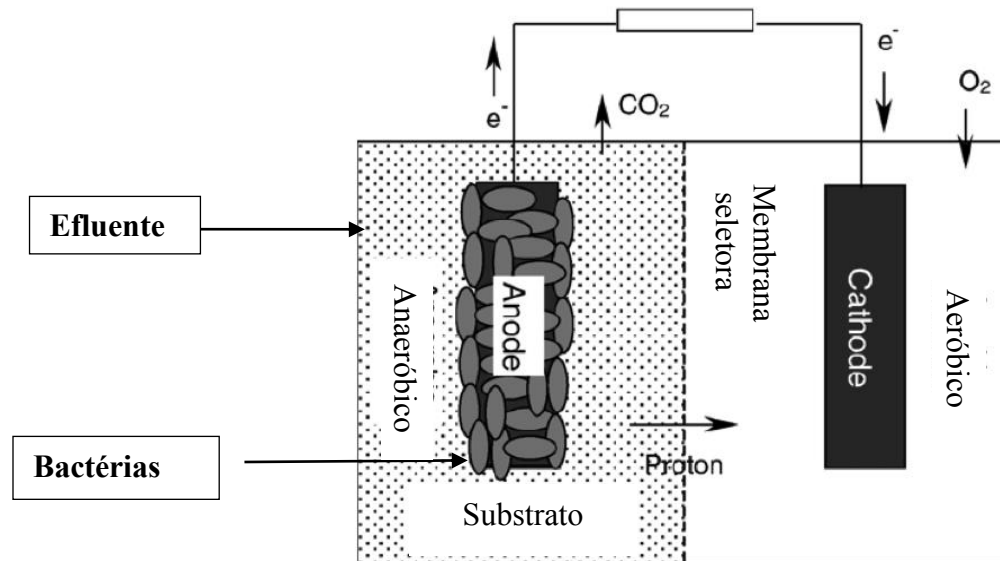


Figura 3.1 – Esquema de uma célula a combustível microbiana (Fonte: ZHUWEI, et al. 2007)

Os elétrons fluem por um circuito elétrico externo transportando uma carga através de um resistor para o catodo. A diferença de potencial (V) entre o anodo e o catodo, e através do fluxo de elétrons (A) resulta na geração de uma potência (W).

Para fechar o circuito, os prótons fluem pela membrana trocadora de prótons que também separa os eletrodos. Para este fim, geralmente emprega-se o Nafion[®] (DuPont, Wilmington, Delaware), uma membrana polimérica que atua como uma barreira seletiva para substâncias, permitindo apenas a passagem de íons hidrogênio (WILKINSON et al., 2000; GIL et al., 2003).

No catodo ocorre a reação de redução do oxigênio mediante a presença de elétrons e de íons hidrogênio, portanto produzindo água. Esta reação ocorre com eficiência quando são empregados catalisadores específicos, bioquímicos ou químicos. E assim, os estudos destes componentes vem evoluindo a CCM ao longo do tempo.

3.2. HISTÓRICO

A geração de corrente elétrica, a partir de bactérias, foi primeiramente relatada em 1911 no Proc. Roy. Soc. London Ser. B por Michael Cresser Potter. Potter verificou a produção de energia elétrica durante a cultura dos microrganismos *Escherichia coli* e de *Saccharomyces* na presença de eletrodo de platina.

O tema reapareceu duas décadas mais tarde, quando Barnet Cohen (1931) voltou a dar atenção ao tema e criou algumas células a combustível conectadas em série e assim conseguiu obter 35 V de tensão e corrente de 2 mA.

Com o decorrer dos anos, houve um avanço destes estudos com os trabalhos realizados por DelDuca et al., 1963 que usaram o gás hidrogênio oriundo da fermentação de glicose pela *Clostridium butyricum* como combustível. Na ocasião o sistema criado por DelDuca não foi reconhecido como tecnologicamente viável devido ao baixo desempenho na produção de hidrogênio.

Foi então que Karube et al., (1976), contribuíram para aumentar a produção de hidrogênio, por meio de um desenho de célula inovador para a época. Foi novamente Karube et al., (1977), que propuseram outras arquiteturas para as células a combustível, os quais muitos são utilizados até os dias atuais.

O interesse nesta área pela comunidade científica aumentou a partir da década de 1980, quando se descobriu que a densidade de corrente e potência poderiam ser aumentadas no sistema com a adição de substâncias denominadas mediadores (DAVIS e HIGSON, 2007; IEROPOULOS et al., 2005). Mediadores são substâncias que se encontram em um estado oxidado, mas que facilmente podem ser reduzidas por meio de captura de elétrons da membrana celular, entre outros se destacam alguns corantes e organometálicos tais como vermelho neutro, azul de metileno, thionina, azul de meldola, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona e Fe (III) EDTA (PARK e ZEIKUS, 2000; TOKUJI e KENJI, 2003; VEGA e FERNANDEZ, 1987; ALLEN e BENNETTO, 1993; IEROPOULOS et al., 2005). A Figura 3.2 mostra uma ilustração do mecanismo da transferência de elétrons para os mediadores, que posteriormente os transferem para o anodo.

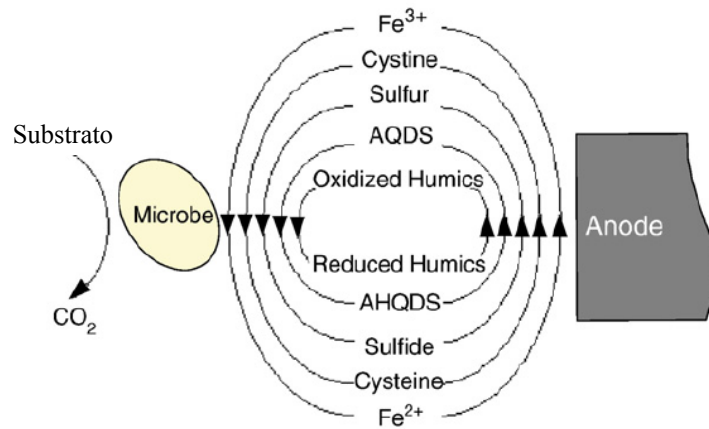


Figura 3.2 – Ilustração da atuação de mediadores. (Fonte: Adaptado de LOVLEY et al., 1996)

Contudo, um grande salto no desenvolvimento de célula a combustível viria em 1999 quando se observou que determinadas espécies de bactérias não precisavam de mediadores para transferir elétrons para um condutor externo, deste modo transferindo por contato físico, ou seja, transferência direta (KIM et al., 1999a; KIM et al., 1999, US Patent 5976719, CHAUDHURI e LOVLEY, 2003). A Figura 3.3 mostra o esquema de uma CCM ao ar, que é normalmente empregada, em que as bactérias aderidas no material condutor do anodo realizam a transferência direta de elétrons para produção de bioeletricidade.

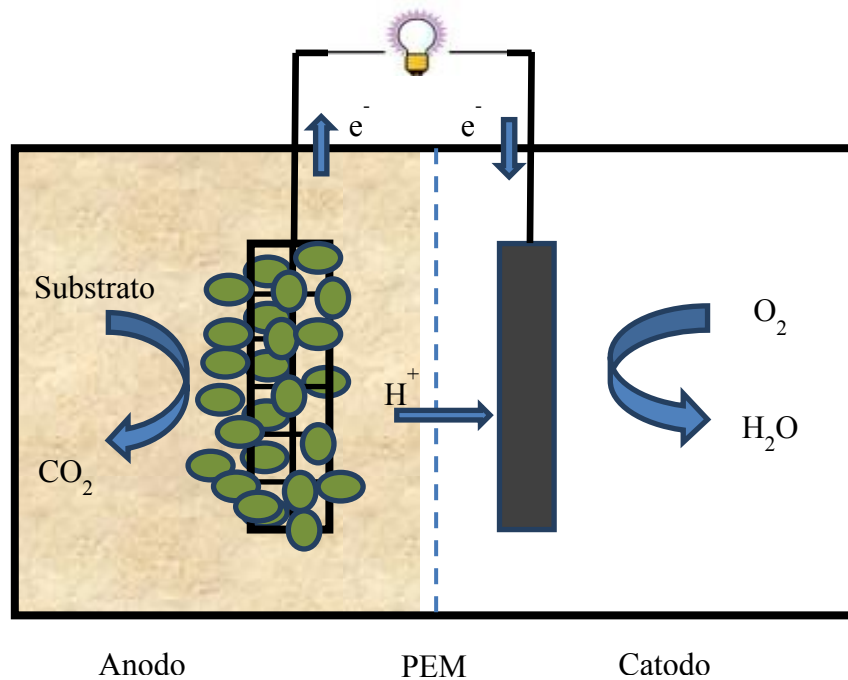


Figura 3.3 – Ilustração de uma Célula a Combustível Microbiana sem mediadores.

A partir da descoberta de Kim, 1999, bactérias do gênero redutoras de íons metálicos, em especial a *Shewanella putrefaciens* (KIM et al., 2002), a *Geobacter sulfurreducens* (BOND e LOVLEY, 2003), a *Geobacter metallireducens* (MIN et al., 2005) e a *Rhodospirillum rubrum* (CHAUDHURI e LOVLEY, 2003) tem sido alvo de estudos para serem empregadas em uma célula a combustível microbiana.

Em 2006, descobriu-se que os gêneros *Geobacter* e *Shewanella* produzem nanofios, os quais podem ser usados no processo de transferência de elétrons da camada extra celular para o meio externo (GORBY, et al., 2006, XIE et. al. US Patent 2011/0236769A1). Isto despertou interesse da indústria eletrônica (HUSSAIN, US Patent 2012/0019214A1).

Neste contexto, os mecanismos de transferência de elétrons das bactérias mais aceitos foram organizados e divididos em duas classes: transferência direta e transferência indireta. A transferência direta de elétrons (TDE) ocorre pelo contato físico da membrana via proteínas redox denominadas citocromos do tipo-c e via nanofios. Já a transferência indireta de elétrons, também

nomeada de transferência mediada (TME), que é conduzida por substâncias redox liberadas pelo metabolismo bacteriano (Figura 3.2) (CARMONA-MARTÍNEZ et al., 2013, SCHRÖDER, 2007)

Na verdade o mecanismo de condução elétrica na interface biofilme/material condutor ainda não está totalmente elucidado. Portanto, avanços nesta área serão determinantes para se aumentar a densidade de potência do dispositivo. Assim, as pesquisas científicas em células a combustível microbianas vem gerando um aumento no número de patentes no mundo.

Observa-se que os depósitos de patentes sobre células a combustível microbiana basicamente ocorreram partir do início do ano 2001. Este histórico relativamente recente justifica-se pelo fato das pesquisas terem um grande salto tecnológico a partir desta época.

Buscas estatísticas com o termo exato “microbial fuel cell” para títulos, mostrou 135 registros de patentes no mundo, para concessão e aplicação de células a combustível microbiana. No serviço Espacenet, da European Patent Office, revelou 111 registros de patentes, enquanto que no WIPO - World Intellectual Property Organization, foram encontrados 83 registros. Consulta no USPTO – United States Patent Trademark Office USPTO, que é uma entidade referência nos registros de patentes, foram encontrados 54 registros. Numa observação mais cuidadosa nota-se que muitos inventores e empresas acabam depositando seus inventos em mais de um país, como foi o caso do registro feitos por Kim, et al., Korean Patent No. 224381, US Patent No. 5,976,719, Japanese Patent No. 3022431 and EP Patent Application No. 97306661.6.

A Figura 3.4 mostra um gráfico da evolução do número de registros de patentes no mundo, feitos a partir de 1967 de acordo com as instituições citadas. Notadamente a maioria dos registros concentra-se nos últimos anos, o que mostra a emergência desta tecnologia.

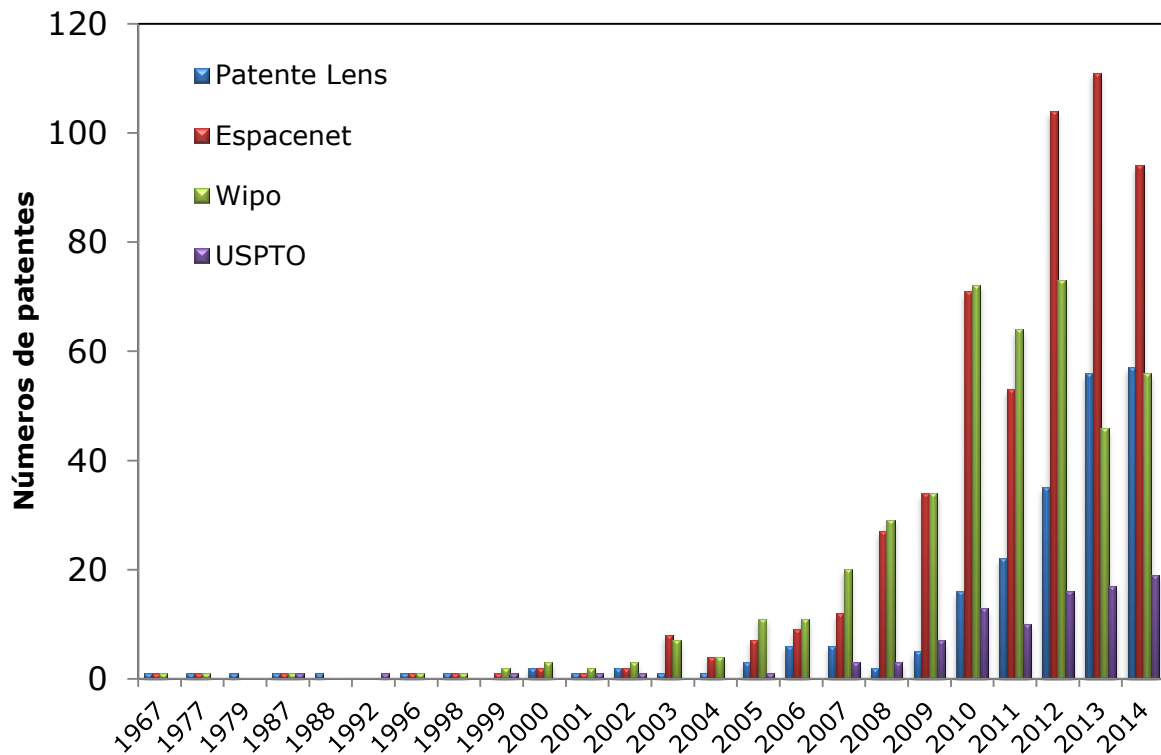


Figura 3.4 – Gráfico da evolução do números de registros de patentes segundo diferentes instituições.

Nesta direção, verificou-se também que as bactérias empregadas com maior sucesso são as dos gêneros *Geobacter*, *Shewanella* e *Clostridium*. Estes gêneros podem produzir corrente elétrica a partir da degradação do substrato de diferentes procedências, assim como, efluentes domésticos, efluentes industriais, lodos de esgoto e rejeitos alimentícios. Também se pode gerar corrente elétrica a partir da degradação de matéria orgânica e sulfetos encontrados em áreas remotas ou não servidas pela rede de distribuição, como por exemplo, sedimentos marinhos – *offshore* (BOND et al. 2002; REIMERS et al., 2006). Neste caso, a potência gerada pode prover energia para operar pequenos dispositivos elétricos onde o acesso rotineiro para manutenção é difícil, por exemplo, substituindo as baterias.

Os substratos são importantes para os processos bioquímicos dos microrganismos, pois neles estão contidos os nutrientes necessários ao metabolismo celular. A eficiência e viabilidade econômica para converter resíduos orgânicos em bioenergia depende das características das substâncias destes resíduos e do microrganismo empregado. Um dos principais componentes do

substrato são as substâncias que fornecem carbono ao metabolismo, por isto são conhecidas como fontes de carbono.

Assim o desempenho das células a combustível microbianas, densidade de potência, eficiência coulômbica, bem como o tempo de aclimatização (*start-up*) estão intimamente ligados aos substratos (KIM et al., 2008; WANG et al., 2009a). Neste sentido, substâncias como acetato, glicose, sacarose, frutose, aminoácidos entre outras são substâncias muito estudadas para serem empregadas como substratos, pois o comportamento bioquímico destas substâncias é conhecido.

Embora exista um consenso na literatura que é mais fácil se estabelecer o mecanismo de produção de energia elétrica a partir de substâncias com estrutura molecular simples do que em relação às substâncias complexas (LIU et al., 2005), o melhoramento de desempenho da tecnologia de célula a combustível microbiana aliado à diminuição de custos abriram oportunidades para o uso de substratos ditos não convencionais, como por exemplo à base de resíduos e biomassa.

Assim, observa-se na literatura cada vez mais o uso destes substratos que muitas vezes são considerados passivos ambientais, que são materiais de descarte podendo causar impactos ambientais. Desta forma preservam-se as substâncias que notadamente possuem outras funções mais nobres, casos da glicose, sacarose entre outras ao mesmo tempo em que se aumenta a sustentabilidade dos processos.

3.3. CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA (CCM) COMO TECNOLOGIA AMBIENTAL

A CCM como tecnologia ambiental é alimentada com resíduos líquidos, que normalmente são degradados e convertidos em energia elétrica (RABAEY et al., 2010). Os efluentes industriais possuem características para serem empregados como substratos de CCM, pois possuem altas concentrações de matéria orgânica e macro nutrientes microbianos, de maneira que resulta em valores altos de DBO (WANG et al., 2009b).

No Brasil, segundo a Resolução CONAMA N° 430 (2011), alterada 357 (2005), águas residuárias ou efluentes industriais, são resíduos líquidos oriundos de diversas atividades ou processos industriais. De modo que, é necessário respeitar os padrões, os parâmetros e as diretrizes do lançamento do mesmo em corpos de água receptores, para uma gestão ambiental sustentável.

Dentre alguns parâmetros do potencial poluidor compreendidos na Resolução CONAMA N° 430 para o lançamento do efluente no meio ambiente são: pH, temperatura, vazão, parâmetros inorgânicos, parâmetros orgânicos, materiais sedimentares, materiais flutuantes, óleos e graxas, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio).

No entanto, existe a DQO (Demanda Química de Oxigênio), um parâmetro ambiental para efluentes que avalia a quantidade de matéria orgânica não biodegradável e biodegradável, ao contrário da DBO, que avalia apenas matéria orgânica biodegradável. Assim, a DQO é um indicador ambiental mais adequado para avaliar a qualidade do tratamento do efluente (BAIRD e CANN, 2011) ainda que possam variar com a época do ano. Como por exemplo, a vinhaça, resíduo líquido da produção de bioetanol, possui em média altas concentrações de DQO, tal como, 17677,7 mg L⁻¹ (MOTA et al., 2013), 13380 mg L⁻¹ e 25225 mg L⁻¹ (MARINHO et al., 2014) e 45000 mg L⁻¹ (INTANOO et al., 2014).

Além desta característica, a vinhaça contém diversos elementos químicos como potássio, cálcio, nitrogênio e magnésio e sais de sulfato e fosfato, que quando aplicados ao solo vem ajudando na suplementação das culturas e melhorando as condições do solo para o cultivo, por consequência resultou em uma cadeia produtiva mais competitiva. Porém, a quantidade gerada deste efluente é muito alta em torno de 12 L a 15 L, e ainda este manejo conhecido como fertirrigação vem sendo seriamente discutido, pois o seu uso excessivo causa impactos ambientais no solo, na água dos lençóis freáticos e dos corpos receptores (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; FUESS e GARCIA, 2014).

Os impactos ambientais por efluentes são singulares, dependendo das características físico-químicas e do manejo do efluente. Assim como a vinhaça, o efluente lácteo possui um alto volume de geração em torno de 10L, dependendo do processamento, contudo com maior carga orgânica média gerando uma DQO em torno de 88 000 mg L⁻¹ (SEO et al., 2015) e 65 000 mg L⁻¹ (VOURCH et al., 2008), pH ligeiramente ácido, de valores entre 5,5 a 6,5 para amostra oriunda do processamento do leite e 4,5 a 6,5 para amostra oriunda do processamento do queijo (soro), e ainda altas concentrações de sais e de proteínas e açúcares redutores (KARADAG et al., 2015) caracterizando o efluente com alto potencial de impacto ambiental.

Os impactos gerados por efluentes que são lançados nos corpos hídricos sem o devido tratamento ou lançados após um tratamento/manejo ineficiente se tornam cada vez mais uma

problemática em que afeta todo um ecossistema. A disposição incorreta de qualquer efluente gera uma poluição ambiental muitas das vezes irreversíveis. Contudo os elementos químicos e a carga orgânica dos efluentes podem ser aproveitadas por microrganismos de modo que os efluentes se tornem um insumo.

Neste contexto, altas DQO dos efluentes e a presença de vários elementos químicos podem traduzir em potencial poluidor ou em energia recuperável, que está contida em forma química das moléculas, por meio de um arranjo de CCM. A célula a combustível microbiana degrada/oxida a biomassa dos poluentes com eletroatividade do biofilme microbiano formado no anodo, ao mesmo tempo em que capta elétrons do sistema, para gerar bioeletricidade. Isso acontece com mais eficiência se o sistema for submetido a uma resistência externa, em que muitos casos estudados foram de 1000Ω (LOGAN 2008; RABAEY, et al., 2010)

A CCM como tecnologia ambiental, possui o arranjo sistemático com uma linha de pensamento em dois focos: a produção de bioeletricidade e o tratamento do efluente. Este pensamento começou a fluir em 2004, quando surgiram os primeiros estudos empregando efluentes como substrato de CCM (ELMEKAWY et al., 2015).

Para este tipo de sistema são de essencial importância: a biocompatibilidade dos materiais do anodo e configuração do catodo, portanto a interação bactéria/efluente/ arquitetura. Dentre os materiais utilizados como material condutor e biocompatível para o anodo encontram-se o tecido de carbono, feltro de grafite, escova de grafite ou fibra de carbono, cilindro e placa de grafite, carvão ativado em grãos e carbono vítreo reticulado (LOGAN 2008; JANICEK et al., 2014).

Para a arquitetura ou forma do anodo e da célula, os mais estudados são os cilíndricos verticais e horizontais, também denominados tubulares, embora existam estudos com bioreatores cúbicos e tetraédricos. (OLIVEIRA et al., 2013).

De maneira geral, observa-se que as CCMs independentes dos formatos, encontram-se em duas configurações básicas, de tal forma que, a configuração com o catodo exposto ao ar é denominadas células de um compartimento, e a célula de dois compartimentos possui solução catódica, com a espécie redutora diferente do oxigênio.

Para todos os tipos de configurações, em termos de cálculos, o desempenho do sistema se quantifica normalmente pela produção de bioeletricidade e tratamento do efluente. A bioeletricidade é avaliada pela polarização eletroquímica, que resultam no potencial (E), densidade

de corrente (i) e densidade de potência (p). A análise do tratamento do efluente na CCM é feita pela avaliação da remoção de DQO (ηDQO).

A densidade de potência se faz através da normalização da energia gerada por volume de efluente ou área do eletrodo de trabalho

$$P(W) = E(V) \times I(A)$$

$$p(Wm^{-3}) = E(V) \times i(Am^{-3})$$

$$p(Wm^{-2}) = E(V) \times i(Am^{-2})$$

Num sistema ideal o potencial não diminui com o aumento da corrente ou densidade de corrente. Entretanto nos sistemas reais sempre há perdas ocasionadas pelas polarizações, gerando sobrepotenciais. Como resultado, na prática, os potenciais ideais não são atingidos. Quando carga é aplicada em uma célula a combustível em que os eletrodos estavam em circuito aberto, cada um dos dois eletrodos polariza em direções opostas. Os catodos se tornam menos catódicos e os anodos menos anódicos, diminuindo o potencial disponível da célula a combustível. Perdas adicionais importantes são provocadas pela resistência ôhmica nos componentes, principalmente no eletrólito (Figura 3.5).

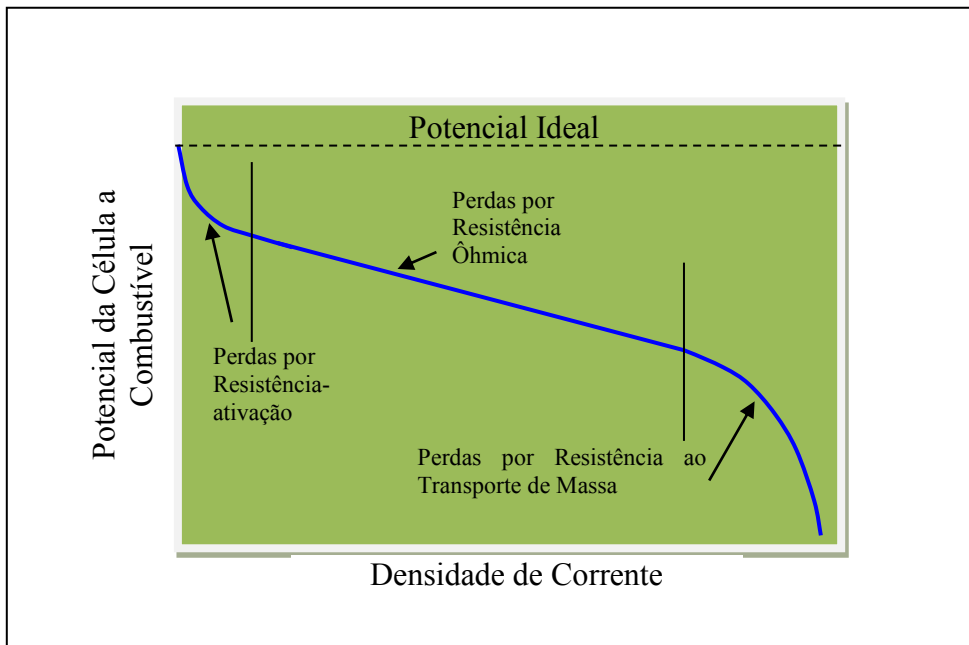


Figura 3.5 – Curva de polarização típica de uma célula a combustível microbiana

Os mecanismos responsáveis pelas perdas por polarização nos eletrodos são:

- a) polarização química, relacionada com a energia de ativação das etapas dos processos eletroquímicos que ocorrem nos eletrodos (SCHÖDER, 2007; TORRES et al., 2010);
- b) polarização de concentração no eletrólito, relacionada com a variação da concentração das espécies determinantes do potencial na vizinhança da superfície dos eletrodos;
- c) polarização de resistência, relacionada com as mudanças de condutividade específica do eletrólito provocadas pelas reações eletroquímicas nos eletrodos.

As perdas por polarização química e por polarização de concentração são mais significativas que a polarização por resistência. A primeira tem peso maior em correntes baixas e pode ser reduzida com uso de catalisadores com menor resistência à ativação e maior superfície de catálise por unidade de volume do eletrodo. A segunda tem peso maior nas correntes altas e pode ser minimizada melhorando a difusão de material até a superfície dos eletrodos, por exemplo, aumentando o fluxo de gás oxigênio no catodo. Com relação às perdas ôhmicas, estas são proporcionais à corrente e podem ser diminuídas pelo uso de eletrólitos mais finos, ou seja, membranas seletoras de prótons e com menor resistência ao transporte iônico, assim como, pela utilização de conectores com menor resistência elétrica.

Na presença de corrente elétrica (quando se aplica uma carga externa) a equação pode escrita de maneira completa na equação:

$$E_{cel} = E_{catodo} - |\eta_{at.,cat.} + \eta_{conc.,cat.}| - E_{anodo} - |\eta_{at.,an.} + \eta_{conc.,an.} - iR_i|$$

Onde $\eta_{at,cat}$ e $\eta_{at,an}$ são as perdas (sobretensões) por ativação no catodo e no anodo, respectivamente; $\eta_{conc,c}$ e $\eta_{conc,a}$ são as perdas (sobretensões) por concentração no catodo e no anodo, respectivamente. Assumindo que o eletrólito e os eletrodos obedecem a Lei de Ohm, iR_i , é a resistência interna, i é a corrente que flui pelo sistema (LOGAN et al., 2006).

Na prática representa-se num mesmo gráfico, a variação de potencial e de potência em função da densidade de corrente, Figura 3.8.

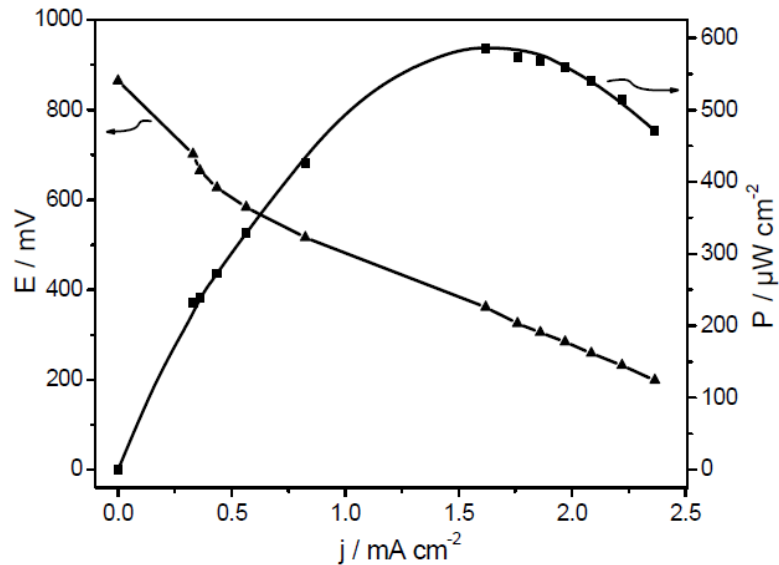


Figura 3.6 – Diagrama de potência de uma célula a combustível microbiana. (Extraída de Rosenbaum et al., 2007.)

De fato o maior desafio nesta área é ultrapassar a bancada dos laboratórios com a fabricação de protótipos para a escalagem de potência. Atualmente pesquisadores já conseguiram densidade de potência de 1 kW/m^3 (volume do reator) e $6,9 \text{ W/m}^2$ (área do anodo), estes são valores animadores para acelerar a amadurecimento da tecnologia

Para obter-se remoção de DQO calcula-se o percentual da diferença entre a concentração final e concentração inicial de DQO do sistema.

$$\eta_{DQO} (\%) = [(DQO_i - DQO_f) / DQO_i] \times 100$$

Além disso, o comportamento do sistema em no âmbito simultâneo eletroquímico e ambiental, se calcula pelo modelo matemático da eficiência coulômbica (EC), sendo que a EC possibilita avaliar as perdas das reações eletroquímicas do sistema, calcula-se como:

$$EC = \frac{\int_{t_1}^{t_2} U dt / R}{Fxb(\Delta DQO)V} xM$$

Onde, U é potencial da CCM pelo tempo de operação, R resistência externa, F constante de Faraday, b números de elétrons transportados por molécula de O₂, ΔDQO é a remoção de DQO do sistema, V o volume de efluente e M a massa molar do O₂ (LOGAN et al., 2006).

Estes parâmetros junto com a curva de polarização eletroquímica permitem avaliar o rendimento do sistema, para o tratamento do efluente e a produção de bioeletricidade. De maneira que estes conjuntos de variáveis normalmente estudadas possam se completar em direção do desenvolvimento sustentável das pesquisas em CCM.

As pesquisas de CCM alimentada com efluentes teve o início por volta do ano 2004 (ELMEKAWY et al., 2015), e atualmente, as pesquisas em CCM apresentam pelo menos três diferentes focos: o estudo de diferentes efluentes como substrato e o seu comportamento, os desempenhos da eletrocatalise de diferentes microrganismos inoculados e diferentes arranjo sistemáticos de CCM .

A Tabela 3.1 mostra o comportamento atual das pesquisas de CCM como tecnologia ambiental. Assim, pode verificar um amplo estudo da utilização de efluentes como sustrato em CCM de diversas fontes, tal como, das indústrias de alimentos, das indústrias agroenergéticas e de tratamento de esgoto. Além disso, foram identificados relatos, que apesar de gerar potências baixas em muitos casos, a remoção de DQO atingiu os 90%, deste modo este perfil resultante pode ser explicado pela baixa EC do sistema. Outro fator importante observado nas pesquisas em CCM foi à utilização de consórcios microbianos, em que são isolados principalmente de estações de tratamento de esgoto (ETE) em ambiente municipal e industrial. Porém, existem poucos estudos com CCM alimentadas com efluentes e inoculadas com culturas puras e co-culturas de microrganismos exoeletrogênicos.

Tabela 3.1 – Caracterização de CCMs, mostrando com os parâmetros normalmente avaliados em CCM.

CCM	Substrato	Microrganismo (origem)	P _{Max}	DQO	EC	Referência
Catodo ao ar	Resíduo hidrolisado de bioetanol	Consorcio de bactérias	410 mW m ⁻²	60%	*	WANG et al., 2009
Catodo aerado (O ₂)	Efluente de óleo de palma	Consórcio de Lodo anaeróbico	55 mW m ⁻²	*	*	MOKHTARIAN et al., 2012
Catodo ao ar	Efluente de cervejaria	Consórcio de tratamento de esgoto	11 W m ⁻³	87%	38%	WANG et al., 2008
Catodo ao ar	Efluente a base de azocorante	Consórcio de Lodo anaeróbico	100 mW m ⁻²	*	16%	SUN, et al., 2013
Catodo ao ar	Percolado de alimentos	Consórcio de Lodo anaeróbico	445 mW m ⁻³	87%	20%	LI et al., 2013
		Consórcio da Clarificação	453 mW m ⁻³	91%	21%	
Catodo ao ar	Efluente de esgoto	Consórcio de bacterias (ETE)	281 mW m ⁻²	70%	3%	KARRA et al., 2013
Catodo ao ar	Meio de cultura com glicose	<i>Shewanella sp.</i> HN-41 (LMAA)	18,2 mW m ⁻²	*	*	WU et al., 2013
	Meio de cultura com lactato	<i>Shewanella sp.</i> HN-41 (LMAA)	71,6 mW m ⁻²	*	*	
Catodo aerado (PBS)	Efluente de destilaria de álcool	MicrobiosTermofilicos (destilaria)	1000 mW m ⁻²	76%	80%	HA et al. , 2012
Catodo ao ar	Efluente sintético (lactato + CaCl ₂)	<i>Shewanella putrefaciens</i> (ATCC)	6,24 Wm ⁻³	80%	8%	PANDIT et al., 2014
Catodo aerado (Fe III)	Efluente sintético (lactato + sulfato)	Consorcio de redutoras de sulfato (ETE)	280 mW m ⁻²	24%	18%	LEE et al., 2012
	Efluente sintético (lactato + sulfato)		260 mW m ⁻²	25%	10%	
Catodo com ferricianeto	Meio de cultura com lactato	<i>Shewanella decolorationis</i> S12	0,2 W m ⁻³	*	23%	YANG et al., 2014
	Meio de cultura de azocorante	<i>Shewanella decolorationis</i> S12	1,38 W m ⁻³	*	19%	
Catodo aerado (água)	Efluente do coco/casaca hidrolisada	Consórcio de Lodo da clarificação	180 mW m ⁻²	91%	25%	JAYASHREE et al., 2014
catodo ao ar	Efluente de vinho vermelho	Consórcio de desnitrificadoras	50 mW m ⁻²	27%	9%	SCIARRIA et al., 2015
	Efluente de vinho branco		250 mW m ⁻²	90%	15%	
Catodo com KMnO ₄	Efluente de bioetanol	Consórcio de Lodo de digestão	150 m W m ⁻²	70%	*	SAKDARONNARONG et al., 2015
	Efluente de bioetanol + lignina		9300 mW m ⁻²	81%	*	

As CCMs como tecnologia ambiental, além de produzir bioeletricidade apresenta um amplo potencial biorremediador de efluentes. Assim, não só reduzindo a DQO e DBO, mas também outros compostos normalmente presentes em efluentes, tal como, alguns íons de sulfetos, sulfatos, fosfatos, nitritos, nitratos e outros já relatados.

E uma CCM, com catodo ao ar, proposta por Zhao et al. (2009), a remoção de sulfetos, tiosulfatos e sulfatos foram respectivamente 91%, 86% e 99% e uma potência gerada de 2,7 mW a 9,8 mA de corrente, utilizando como inoculum *Desulfovibrio desulfuricans* e um efluente sintético rico em compostos de enxofre.

Lee et al. (2012), construíram duas CCMs inoculadas com um consórcio de bactérias redutoras de enxofre (BRS), isoladas de uma estação de tratamento municipal. Estas CCMs foram diferenciadas pelo efluente depositado no compartimento anódico, ou seja, lactato mais sulfatos e lactato mais sulfetos. Neste estudo foram obtidos os percentuais de remoção de 84,2 % para sulfatos e 57,7% para sulfetos e atingindo uma potencia máxima de 255 mW m⁻² e 276 mW m⁻² respectivamente.

Em Zhang et al. (2013), no estudo para redução de nitrogênio nos efluentes utilizou-se uma CCM de dois compartimentos com anodo fixo e um biocatodo rotacional sem separação (sem membrana). Este sistema tinha como objetivo a bio estimulação de bactérias amônio oxidantes, nitrito oxidante e desnitrificadoras, para a bio conversão do íon amônio em nitrito - nitrato e finalmente em nitrogênio elementar. A CCM obteve a redução de 82% do total de nitrogênio para circuito fechado com resistência de 200 Ω e 52% para circuito aberto. E ainda, obtendo a densidade de potencia elétrica, remoção da DQO e do íon amônio de respectivamente 585 mW m⁻³, 85,7% e 91,4% para CCM em circuito fechado (200 Ω).

Mais recentemente, Tao et al. (2015), utilizou uma CCM inoculada com consórcio de microrganismos de lodo anaeróbico, submetida a resistência externa de 1000 Ω. Observou a remoção de amônio (NH₄⁺) e fósforo total (tP) em efluente sintético. Em sua CCM foi obtido os resultados na redução da concentração de 55 mg L⁻¹ para 25 mg L⁻¹ de amônio, e 122 mg L⁻¹ para 68 mg L⁻¹ de fósforo total em um período de análise de 75 horas de operação (3 dias), e ainda com a ηDQO de 66% e 560 mW m⁻² de densidade de potência gerada.

Outro problema ambiental são os compostos recalcitrantes contidos em muitos efluentes industriais. Estes compostos possuem a característica de difícil degradação no meio ambiente, e

são principalmente derivados do petróleo. Desta forma, as tecnologias convencionais de tratamento desses efluentes se tornam custosas, sendo assim as pesquisas de biodegradação de compostos recalcitrantes vem crescendo, de modo a impulsionar as pesquisas em CCMs também para este tipo de composto.

Desta maneira, Adelaja et al. em 2015 elaborou uma pesquisa de uma CCM com catodo aerado e anodo com bactérias isoladas de uma estação de tratamento de lodo anaeróbico, alimentada com fenantreno, benzeno (compostos recalcitrantes) e uma solução de macro e micronutrientes. Neste estudo utilizaram uma resistência externa de 1000 Ω , que obteve como resultado após o ciclo de operação de 60 dias, 95% de degradação dos dois compostos, 80% de remoção de DQO e a potência máxima de 0,91 mW m⁻².

Enfim, as CCMs se tornam cada vez mais uma tecnologia ambiental inovadora e mais completa do que os sistemas convencionais de tratamento de efluentes. Assim, desenvolvendo algumas vantagens comparadas com os sistemas de tratamento de efluentes convencionais, tais como, tratar efluentes de altos e baixos valores de DQO, balanço energético mais positivo, menos biomassa produzida, e os altos níveis de sulfatos não inibirem as atividades de bactérias eletrogeradoras como é o caso das metanogênicas na produção de metano. (KARRA et al., 2012; RABAEY et al., 2010)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CONSTRUÇÃO E MANIPULAÇÃO DA CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA

O protótipo da Célula a Combustível Microbiana (CCM) de compartimento único foi construído de acrílico com o formato cúbico (14,5 cm x 14,5 cm x 14,5 cm), de maneira que foi empregado o anodo tridimensional e o catodo fino exposto ao ar.

Para o eletrodo do catodo foi utilizado o tecido de carbono (144 cm²) com a carga catalisadora de 0,5 mgPt cm⁻², que normalmente é empregado em CCM. E para o anodo o material do eletrodo foi o carbono vítreo reticulado (CVR) com o volume de 2642,63 cm³ em espuma com 10 poros por polegada, o qual foi anexado ao tecido de carbono, o CVR foi utilizado por ter uma boa condutividade e ter forma de espuma e assim ocupando todo o volume do anodo. Os eletrodos do anodo e catodo foram separados pela membrana polimérica Nafion[®] 215 (Figura 4.1).

A membrana Nafion[®] e os tecidos de carbono foram pré tratados e pós tratados para limpeza e esterilização com banhos de peróxido de oxigênio (H₂O₂) a 3% e com H₂SO₄ de concentração 0,5 mol L⁻¹, ambos por uma hora com temperatura de 80 °C. O CVR foi esterilizado em autoclave por 30 minutos antes e depois da operação enquanto que o reator de acrílico foi limpo com sabão neutro e álcool 70%.

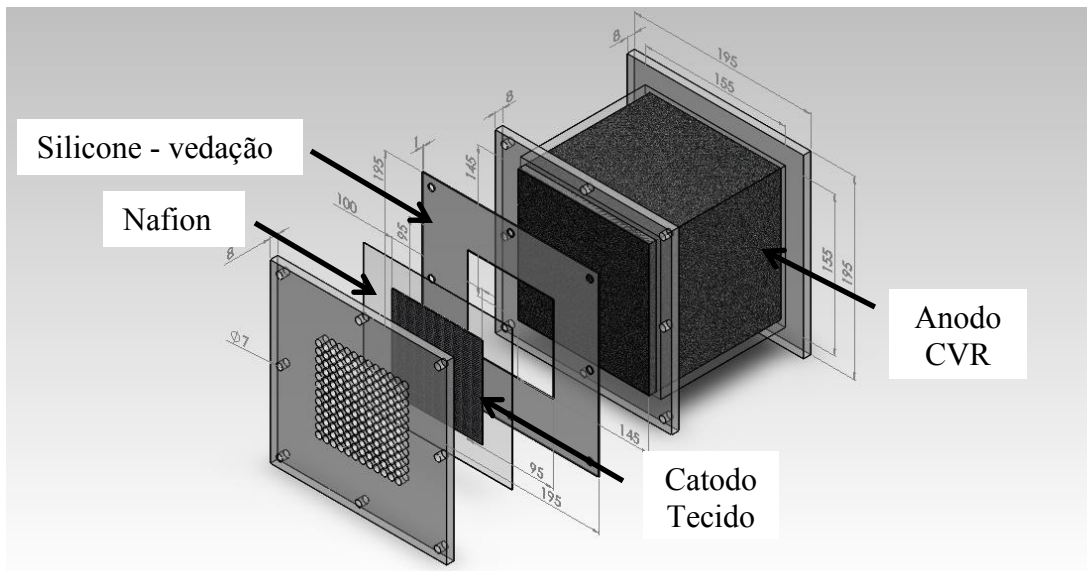


Figura 4.1 – Projeto da Célula a Combustível Microbiana de compartimento único, com eletrodos de CVR (anodo), tecido de carbono (catodo) e separados pela membrana Nafion[®] com retentor de silicone.

4.2. PREPARAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS PARA INOCULAÇÃO

As cepas liofilizadas de *Shewanella putrefaciens* referência 1967 e *Clostridium butyricum* referência 7470 foram adquiridas da Fundação de Pesquisa André Tosello de Coleção de Culturas Tropicais (CCT). A cepa liofilizada de *Shewanella oneidensis* referência 700550 foi comprada do ATCC (American Type Culture Collection).

Os inóculos de *Shewanella putrefaciens* e *Shewanella oneidensis* foram preparados com meio Agar nutriente com pH ajustado para $7,0 \pm 0,3$ para cultivo em placas de petri e para manutenção dos ensaios em caldo nutriente, assim descritos na Tabela 4.1. Os reagentes foram pesados em uma balança semi-analítica da marca Tecnal para um volume de 300 mL com Agar e 400 mL sem Agar (caldo). O meio sólido (com Agar) foi colocado em um erlenmeyer de 1000 mL e o meio líquido (caldo) foi dividido em quatro erlenmeyers de 250 mL por cepa, resultando um volume final de 100 mL em cada. Para garantir a inocuidade dos ensaios e a não interferência de outros microorganismos foi realizado um processo de esterilização de 15 minutos, de modo que a esterilização dos meios de culturas e materiais foi feita em autoclave vertical da marca CS Primatec. Após a ambientação da temperatura dos meios e materiais, cultivou-se as cepas com a

técnica de repicagem para placas em uma cabine de biossegurança nível 2 da marca Pachano – Pa 420, e incubou-se a temperatura de 30 °C em uma incubadora Sanyo modelo IAC-19 por 24 horas. Os inóculos em placas foram propagados nos erlenmeyers em meio de cultura do tipo caldo nutritivo na câmara de biossegurança e colocados para crescer em agitador/encubador Shaker da Tecnal a 150 rpm a 30°C por 24 horas, concomitantemente foram cultivadas mais placas que logo após as culturas crescerem por 24 horas e foram armazenadas a 4 °C em uma câmara BOD da marca Tecnal, para manutenção das cepas durante os experimentos e garantia das cepas ativadas.

Tabela 4.1 – Meio de Cultura Agar Nutriente- AN.

Reagente	Quantidade
Extrato de carne	3,00 g
Peptona	5,00 g
Agar (meio sólido)	18,00 g
Água destilada	1000 ml

Procedeu-se de maneira semelhante para cultura da bactéria *Clostridium butyricum*, no entanto utilizando meio de cultura RCM “*reforced clostridial medium*” (Tabela 4.2) sólido e caldo ajustando o pH a $7,0 \pm 0,3$, em cultura para tubos, no qual foram pipetados 10 mL de meio em cada tubo esterilizando em autoclave. Inoculou-se a bactéria na câmara, com alça e incubou-se nos dois casos em temperatura 30 °C, atmosfera de 10 % de CO₂ em incubadora anaeróbica da marca Sanyo por 24 horas. As culturas crescidas também foram armazenadas a 4 °C, para serem utilizadas nos ensaios.

Tabela 4.2 – Meio de Cultura *Reforced Clostridial Medium* - RCM.

Reagentes	Quantidade (g/L)
Extrato de carne	10,00
Extrato de Levedura	3,00
Peptona	10,00
Amido solúvel	1,00
Glicose	5,00
Cloreto de cisteína	0,50
Acetato de sódio	3,00
Cloreto de sódio	5,00
Agar	0,50

4.3. OPERAÇÃO DA CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA: PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO E INOCULAÇÃO

A vinhaça utilizada como substrato da CCM foi coletada na saída do tanque de fermentação na Usina São João, localizada na cidade de Araras, estado de São Paulo enquanto que os efluente lácteos foram coletados na saída do sistema de processamento do queijo, soro de leite, e do processamento do leite, água residuária, durante o processamento lácteo na Industria Boa Nova em Valença no estado do Rio de Janeiro. Os efluentes concentrados foram enriquecidos com 4,58 g L⁻¹, Na₂HPO₄; 2,45 g L⁻¹, NaH₂PO₄·H₂O; 0,31 g L⁻¹, NH₄Cl; 0,13 g L⁻¹, KCl e pH ajustado para 6,9 ± 0,2 com NaOH na concentração de 6 mols L⁻¹, para todos os experimentos (LOGAN, 2008; MARASSI, 2013).

Os experimentos em CCM foram conduzidos com culturas puras e uma co-cultura de *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*, para a vinhaça *in natura* ou enriquecido com acetato de sódio, na concentração de 1 g L⁻¹. Deste modo, os experimentos constituíram em 6 bateladas, para cada respectivo tempo de operação, de acordo com o desenvolvimento das bactérias na CCM. Para os ensaios com soro de leite e água residuária, os mesmos foram enriquecidos com acetato de sódio, na concentração de 1 g L⁻¹ e inoculados com culturas puras de

Shewanella oneidensis e *Clostridium butyricum*, respectivamente. E com os tempos de operação também dependentes do desenvolvimento de cada cultura microbiológica.

A inoculação das cepas em CCM foi realizada avaliando-se a absorvância (DO_{600}) de uma alíquota do pré cultivo líquido de bactéria utilizada no respectivo ensaio, que foi diluída e homogeneizada após o período de incubação em uma câmara de biossegurança (Pachano). Para esta análise utilizou-se um espectrofotômetro UV-vis da marca Shimadzu e modelo UV-1800. Assim a quantidade estabelecida de inóculo foi de 0,1 DO_{600} para todos os experimentos, logo resultando no volume de inóculo de 120 mL, 160 mL, 30 mL para as soluções de *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella oneidensis* e *Clostridium buyiricum*, respectivamente. Para os experimentos com co-cultura, o volume de inóculo foi de aproximadamente 80 mL no caso da *Shewanella oneidensis* (0,05 DO_{600}) e 15 mL da solução de *Clostridium butyricum* (0,05 DO_{600}).

Para cada experimento o volume de vinhaça enriquecida foi de 2800 mL depositada juntamente com o inóculo no compartimento do anodo. Durante o período de operação a CCM incubada foi conectada a uma resistência externa de 1000 Ω entre os terminais do anodo e catodo, e adequada em ambiente à temperatura de 30 °C em estufa bacteriológica.

4.4. ANÁLISES QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DO TRATAMENTO DO EFLUENTE APÓS O PERÍODO DE INCUBAÇÃO EM CCM

A maior parte das metodologias empregadas nas análises foram baseadas no *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater* - SMEWW 22nd Edition.

As amostras dos efluentes foram pré tratadas pelo processo de filtração segundo a metodologia 3030B para caracterização de cátions dissolvidos como sódio, potássio, magnésio e cálcio de acordo com normas analíticas 3500-Na-B, 3500-K-B, 3111-B. As normas presentes na metodologia 3500B foram utilizadas para análises de sódio e potássio em que foi usado um fotômetro de chama da marca Analyser e a norma 3111-B foi usada para análise do cálcio e magnésio por espectroscopia de absorção atômica com o sistema ar/ acetileno no espectrofotômetro de absorção atômica da marca Varian modelo SpectrAA 220Z. Para as análises de elementos inorgânicos não metálicos como o fósforo, nitrogênio, cianeto e sulfato utilizou-se a norma analítica 4500. No entanto, as análises de cianeto, sulfato e fósforo foram realizados pela

empresa Bioagri e a análise de nitrogênio total foi realizada de acordo com a norma 4500 -N_{org} pelo método de Kjeldahl com um processo de digestão ácida, destilação e titulação, usando um destilador Tecnal.

Para os compostos orgânicos foram avaliados o teor de matéria orgânica (MO), sólidos voláteis (STV), fixos (STF) e totais (ST), carbono orgânico total (COT), demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), empregando as normas 2540 (B, C, E) para STV, STF e ST, respectivamente, 5310B para COT, 5210D para DQO e 5210B para DBO.

Para avaliar a degradação e a eficiência da biorremediação dos efluentes foram avaliadas em termos da demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), de modo que foram realizadas em três fases, antes do tratamento com a CCM, com acetato e sem acetato, e após o tratamento em CCM, todas as amostras foram homogeneizadas e analisadas em triplicatas e apresentando os valores médios. Os experimentos de DQO e DBO seguiram a metodologia SMEWW 5220D e SMEWW 5210B, com uma faixa de quantificação padrão de 0 a 1000 mgO₂ L⁻¹ para DQO e DBO, para as análises de DQO foi utilizado um fator de diluição de 20 vezes, 40 vezes e 100 vezes para vinhaça, soro de leite e água residuária, respectivamente, usando um espectrofotômetro UV-vis da marca Shimadzu (UV-1800).

Para os cálculos de remoção de DQO foi usada a η DQO para cada batelada, e demonstrada abaixo:

$$\eta DQO (\%) = [(DQO_f - DQO_i) / DQO_f] \times 100$$

No entanto, foi utilizado metodologias alternativas para caracterização dos efluentes em termos de açúcar redutor total (ART), proteína total (PT), condutividade e espectroscopia e absorção na região do UV- visível.

O teor de açúcar redutor foi avaliado pelo do método DNS (3,5 dinitrosalicilato), em que 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico foi dissolvido em 100 mL de solução NaOH na concentração de 2 mol L⁻¹, separadamente foi dissolvido com aquecimento 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 250 mL de água deionizada, após a dissolução, as duas soluções foram juntadas e avolumadas para 500 mL com água deionizada. Nas medições utilizou-se 1,5 mL de amostras

com 1 mL de DNS, os efluentes foram diluídos para entrar na curva padrão de glicose de faixa de concentração de 0 a 2 mg mL⁻¹, as amostras tanto a padrão quanto a dos efluentes foram ativadas em água fervendo por 5 minutos, entretanto as leituras de espectroscopia UV-visível a 540 nm foram feitas a frio, após colocar 7,5 mL de água deionizada em cada amostra.

Para análise do teor de proteínas utilizou-se o método do reativo de biureto, em que dissolveu-se 0,15 g de sulfato de cobre pentahidratado e 0,6 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 50 mL de água deionizada, depois completou o volume para 100 mL com 30 mL de NaOH 10% (p/v) e 20 mL com água deionizada. Para a curva padrão de albumina foi usado a faixa de concentração de 0 a 100 mg L⁻¹. Neste caso, foi usado 1 mL de amostras e 5 mL de biureto, deixando em repouso por 10 minutos, e os efluentes também foram diluídos para entrarem na curva padrão, o comprimento de onda para as leituras também foram de 540 nm.

Para as análises de espectroscopia na região do UV -visível foi utilizado à varredura spectral junto do cálculo de descoloração, usando um espectrofotômetro UV-vis da marca Shimadzu, modelo UV-1800 operando entre 350 nm e 900 nm . As amostras foram avaliadas em duas etapas, antes e depois do período de operação na CCM, em triplicatas, com um fator de diluição de 10 vezes e pH ajustado para 7,0 ± 0,3.

A descoloração foi determinada com o valor da absorvância da vinhaça *in natura* e tratada em CCM fixando o comprimento de onda inicial da estabilização da densidade óptica no espectro visível, que foi de 480 nm e de 600 nm para os efluentes lácteos. O cálculo da porcentagem relativa da descoloração (D%) é descrito abaixo:

$$DC(\%) = \frac{|D1 - D2|}{D1} \times 100$$

4.5. ENSAIO DE DESEMPENHO DA CCM POR POLARIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.

Os experimentos de polarização foram realizados no equipamento carga eletrônica FC marca Kikusui modelo KFM2005, registrados em intervalos de 24 horas com um tempo de descanso de 30 minutos após a retirada da resistência externa da CCM. A polarização foi

conduzida em computador pessoal com auxílio do software FCtester configurado para realizar a variação das resistências eletrônicas no tempo de 1 segundo.

Para cada experimento o tempo de operação foi determinado pelo rendimento da CCM, desta maneira para cada experimento obteve-se um tempo de operação determinado pela polarização. As curvas de polarização foram construídas e analisadas estatisticamente com o auxílio do software Origin 8.1, e assim, quantificando os valores potência gerada (ExI), a resistência interna e eficiência coulômbica (EC) para cada sistema (bactéria/CCM). Para construção das curvas equivalentes, os dados foram analisados aplicando a regressão estatística e análise variância (ANOVA) com o teste de Tukey a 95 % de confiança.

4.6. CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As amostras para análise em Microscopia de Força Atômica foram coletadas após o período de incubação em CCM. Após as coletas, 15 mL das amostras foram centrifugadas e suspensas 3 vezes com centrífuga da marca Cientec e modelo CT – 6000R com rotação de 3000 rpm e refrigeração de 10 °C, e usando tampão fosfato na concentração de 0,1 mol L⁻¹ de pH igual 7,4 para a lavagem, a última suspensão foi feita com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato para fixação e pipetado em lâminas limpas com H₂SO₄ (0,5 mol L⁻¹), e as amostras em lâminas foram deixadas para descanso por 1 hora.

As lâminas preparadas foram secas com um jato suave de nitrogênio, e analisadas em Microscopio de Força Atômico da marca Bruker e modelo Biocatalyst utilizando o modo Peak Force QMN calibrado para propriedades nanomecânicas com PDMS soft (2,5 MPa), e como cantilever foi usado o modelo scanasyst de constante mola nominal igual 0,40 N/m.

5. RESULTADOS E DISSCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EFLUENTES VINHAÇA E SORO DE LEITE

Os substratos ou combustíveis de CCMs oriundos de efluentes devem ter normalmente uma quantidade considerável de matéria orgânica como fonte de carbono, que são avaliadas em termos de sua DQO. Também devem possuir outros elementos inorgânicos considerados macronutrientes e micronutrientes para o desenvolvimento do biofilme microbiano a fim de melhorar o metabolismo e conseqüentemente auxiliar na eletroatividade da CCM (LOGAN 2008; RABEAY, 2010; CHAUDHURI e LOVLEY, 2003).

Além disso, o desempenho da CCM quanto à produção de bioeletricidade e tratamento do substrato quando este é um efluente, se altera principalmente devido às características químicas e físico-química do mesmo (PANT et al., 2010), por isso a necessidade da caracterização prévia do efluente para se avaliar a condição de compatibilidade com os microrganismos eletrogeradores, pois os parâmetros pH, DQO e DBO podem variar muito dependendo do efluente.

Por exemplo, a vinhaça, um efluente da produção de etanol oriundo da fermentação do mosto de cana de açúcar, possui alta carga orgânica, traduzida normalmente em uma faixa de DQO média em torno de 22 – 45 g L⁻¹ e pH ácido de faixa média em torno de 3,5 - 4,6, (LAZARO et al., 2014).

Ainda é característico da vinhaça conter vários outros elementos químicos, como nitrogênio, potássio, fósforo e magnésio, que podem ser reaproveitados como macro e micronutrientes para o desenvolvimento de determinados meios de cultura ou como fertirrigação (CAMPOS et al., 2014; MOTA, 2013). Por ter uma composição rica em macro e micronutriente, a vinhaça torna-se um efluente estratégico para ser empregado em CCM.

A Tabela 5.1 mostra a quantificação dos elementos químicos mais importantes, bem como a carga orgânica, pH, condutividade da vinhaça como coletada na saída do tanque de fermentação,

Assim, observa-se na Tabela 5.1 que a vinhaça como coletada, apresentou alta concentração de matéria orgânica (4880 mg L⁻¹), sólidos totais (26476 mg L⁻¹), açúcar redutor (5327 mg L⁻¹) e alguns elementos químicos, o que reflete numa DQO e DBO elevada. Dados da

literatura, mostram que experimentos de caracterização da vinhaça apresentaram respectivamente valores de DQO e DBO de 55,8 g L⁻¹ e 29,7 g L⁻¹ (SILES et al., 2011), 42,0 g L⁻¹ e 11,3 g L⁻¹ (FERREIRA et al., 2011) e 13,2 g L⁻¹ e 5,9 g L⁻¹ (CAMPOS et al., 2014). Estes valores são ligeiramente diferentes dos valores de DQO e DBO obtidos no presente trabalho, os quais foram de 30,8 g L⁻¹ e 15,8 g L⁻¹, respectivamente. Contudo, estas diferenças podem ser explicadas pela dependência da composição da vinhaça em fatores produtivos do etanol, bem como, a época de plantio da cana (safra e entre safra), cultivar usada, clima, sistema de processamento e outros. Estes valores de DQO e DBO para vinhaça, comprovam que a mesma é um efluente de alto impacto ambiental que merece um tratamento adequado antes de ser descartado. (FUESS e GARCIA, 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

Quanto aos elementos químicos inorgânicos reaproveitáveis biologicamente, foram encontradas altas concentrações de cálcio (403 mg L⁻¹), potássio (2001 mg L⁻¹), magnésio (345 mg L⁻¹) e nitrogênio (267 mg L⁻¹) e baixa concentração o fósforo (24 mg L⁻¹). Nota-se que em muitos estudos estes elementos são acrescidos para enriquecimento sintético do substrato, a fim de melhorar o desempenho da CCM (LOGAN et al., 2008; ZHANG et al., 2015), portanto, no caso da vinhaça estes elementos já estão presentes no meio e favorecem o uso da vinhaça como substrato em CCM.

Entretanto, observa-se na Tabela 5.1, que a vinhaça contém alta concentração de sulfato (1604 mg L⁻¹), baixo pH e alta condutividade (21,8 mS cm⁻¹), indicadores que em principio favorecem para aumentar o potencial poluidor da vinhaça. Contudo, com o emprego da CCM pode-se, degradar, remover passivos ambientais, ou seja, compostos químicos presentes em efluentes que causam sérios problemas ambientais mas que podem ser oxidados ou convertidos, como é o caso do sulfato (LEE et al., 2012; TAO et al., 2015) e do potencial hidrogênionico, o qual pode ser ajustado para neutralidade, devido a passagem dos prótons pela membrana (ZHANG et al., 2015). Por outro lado, a alta condutividade do efluente é um fator importante para CCM, neste caso a alta condutividade faz com que o sistema tenha menos resistência interna e assim facilita o transporte de íons e captação de elétrons.

Os valores dos parâmetros avaliados mostram que a vinhaça pode ser utilizada como substrato em CCM. Por exemplo, Sevda et al. (2013) usaram como substrato o efluente da fermentação alcoólica na produção de etanol/açúcar de uma indústria Belga, neste estudo os

valores de DQO de 9968 mg L⁻¹ e condutividade de 4,0 mS cm⁻¹ resultaram na densidade de potência de 382,5 mW m⁻² e remoção de DQO de 49,8 %. Em um outro estudo, Vasquez-Larios et al. (2014) utilizaram percolado da estação de tratamento municipal como substrato, que possuía como características principais DQO de 12500 mg L⁻¹, nitrogênio (Kjeldahl) de 2900 mg L⁻¹, condutividade de 36,7 mS cm⁻¹ e razão DBO₅/DQO de 0,85, que alcançou como resultado potência máxima gerada de 72 mW m⁻², 85 % de remoção de DQO e EC de 4,2.

Tabela 5.1 – Caracterização físico-química da vinhaça.

Parâmetros	Concentração/ mg L ⁻¹
Sólidos (totais)	26476
Matéria Orgânica	4880
Açúcar Redutor (total)	5327
Carbono (total)	10310
DBO ₅	15895
DQO	30880
Nitrogênio (Kjeldahl)	267
Fósforo (P)	24
Potássio (K ⁺)	2001
Cálcio (Ca ²⁺)	403
Magnésio (Mg ²⁺)	345
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	1604
Cianeto	< 0,1
Condutividade ¹	21,8
pH	4,8

¹unidade em mS cm⁻¹

Outros efluentes estudado como substrato de Célula a Combustível Microbiana foram os resíduos da indústria de laticínios, aqui denominados como soro de leite e água residuária. Estes

efluentes são oriundos do processamento do leite, possuem características predominantes de alta carga orgânica, pH levemente ácido e altas concentrações de potássio, sódio e cálcio.

A Tabela 5.2 apresenta a caracterização do efluente denominado, soro de leite, mostrando os parâmetros mais relevantes para o crescimento bacteriano em CCM e impactante ao meio ambiente. Observa-se na Tabela 5.2, que o efluente lácteo apresenta altos valores de DQO ($67669 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$), de açúcar redutor (49433 mg L^{-1}), de carbono total (21130 mg L^{-1}). O que comprova alta disponibilidade de fonte de carbono para o metabolismo. Além disso, também apresenta os macronutrientes, sódio (5162 mg L^{-1}), potássio (1373 mg L^{-1}), cálcio (530 mg L^{-1}) e magnésio (133 mg L^{-1}). Nota-se também alta concentração de nitrogênio de 497 mg L^{-1} , em função da concentração significativa de proteínas de 936 mg L^{-1} . Estes valores mostram que o efluente lácteo tem características compatíveis para ser uma solução nutritiva, portanto não sendo necessário acrescentar muitos elementos essenciais para o crescimento microbiano, assim como verificado no caso da vinhaça.

Além disso, observa-se na Tabela 5.2, que este efluente apresentou pH ligeiramente ácido, aproximando da neutralidade, neste caso, não foi necessário adicionar quantidades relevantes de solução básica para a correção do pH, e ainda foi detectado um alto valor de condutividade de $20,07 \text{ mS cm}^{-1}$, este resultado é importante para CCM, pois conforme mencionado anteriormente a maior condutividade do substrato resulta em menor resistência interna da célula.

A maioria destes resultados encontrados estão de acordo com valores encontrados na literatura, como, pH de 6,5, DQO de $65000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, cálcio (Ca^{2+}) de 500 mg L^{-1} , magnésio (Mg^{2+}) de 71 mg L^{-1} , potássio (K^+) de 1450 mg L^{-1} em Vourch et al. (2008) e DQO de $88000 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, proteína dissolvida de 1500 mg L^{-1} e nitrogênio total de 1080 mg L^{-1} em Seo et al. (2015), confirmando este efluente como potencial substrato de célula a combustível microbiana (CCM).

Kelly e He (2014) testaram várias células a combustível microbiana alimentadas com diferentes fontes de efluentes oriundos da indústria láctea. Eles verificaram que o efluente do processo de flotação ao ar alcançou a maior densidade de potência, valor de $3,2 \text{ W m}^{-3}$ e simultaneamente com o tratamento atingiu 27,2 % de EC com 85 % de remoção de DQO, em aproximadamente 20 dias de operação.

Tabela 5.2 – Caracterização físico-química do efluente soro de leite.

Parâmetros	Concentração/mg L ⁻¹
Açúcares Redutores (totais)	49433
Proteínas dissolvidas	936
DQO	67669
Nitrogênio (Kjeldahl)	497
Sódio (Na ⁺)	5162
Potássio (K ⁺)	1373
Cálcio (Ca ²⁺)	536
Magnésio (Mg ²⁺)	133
Carbono Orgânico (total)	20990
Carbono (total)	21130
Condutividade ¹	20,1
pH	6,6

¹ unidade em mS cm⁻¹

A análise comparativa da caracterização entre os efluentes vinhaça e lácteo mostra que o efluente de fonte láctea apresentou maior carga orgânica, resultando em maiores valores de DQO e carbono total, de maneira que a quantidade foi praticamente o dobro em todas estas análises efetuadas, para vinhaça foi de 30880 mgO₂ L⁻¹ (DQO) e 10310 mg L⁻¹ (Carbono Total) e para o efluente lácteo foi de 67669 mgO₂ L⁻¹ (DQO) e 21130 mg L⁻¹ o que resultou em um maior potencial poluidor. Porém, constatou-se que no efluente lácteo esta carga orgânica tinha características mais nobre, pois apresentou a concentração de 49433 mg L⁻¹ em açúcares redutores enquanto que para vinhaça foi de apenas 5327 mg L⁻¹, logo a disponibilidade de fonte carbono rápido é maior para o efluente lácteo. Esta fonte requerer menos processos e menos energia celular para entrar na via metabólica do que matéria orgânica mais complexa.

Além desta diferença na carga orgânica, os efluentes apresentaram diferenças nas concentrações de cátions metabólitos dissolvidos e nitrogênio. Por exemplo, as concentrações de potássio e magnésio presentes na vinhaça foram respectivamente de 2001 mg L⁻¹ e 345 mg L⁻¹ enquanto que para o efluente lácteo foram de 1373 mg L⁻¹ e 133 mg L⁻¹. Dentre as funções

metabólicas exercidas por estes elementos estão o auxílio no transporte transmembrânico, co-fatores enzimáticos e estabilização de compostos. Por outro lado, os elementos nitrogênio e cálcio se encontram em maior concentração no efluente lácteo, 497 mg L^{-1} e 536 mg L^{-1} , enquanto que na vinhaça apresentaram concentrações de 267 mg L^{-1} e 403 mg L^{-1} , respectivamente. Estes elementos são normalmente utilizados nas estruturas de macromoléculas e estabilidades de componentes celulares.

Tais composições resultaram em pH mais neutro no efluente lácteo, como valor de 6,6 e para vinhaça um pH mais ácido, com valor de 4,8, e ainda implicaram em valores ligeiramente mais altos da condutividade para vinhaça ($21,8 \text{ mS cm}^{-1}$) do que para o efluente lácteo ($20,1 \text{ mS cm}^{-1}$).

5.2. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ENERGIA ELÉTRICA DIRETA DA CELULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA (CCM) POR POLARIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

5.2.1. CULTURA PURA EM CCMs ALIMENTADAS COM EFLUENTE VINHAÇA

A técnica da polarização eletroquímica é normalmente usada para avaliar e estudar a performance da bioeletroatividade da CCM, consiste em estudar os perfis das curvas de potencial (E) em função da densidade de corrente (i), e da densidade de potência (p) também em função da densidade de corrente (i), com intuito de avaliar as perdas causadas pelas polarizações e buscar a região de potência máxima (LOGAN et al., 2006; SCHÖDER, 2007; TORRES et al., 2010), que são dependentes do microrganismo eletrogênico e do efluente usado como fonte precursora de bioenergia.

Deste modo, para estudar o comportamento bioeletroquímico da CCM alimentada com vinhaça e inoculada com das bactérias eletrogênicas, foram realizados ensaios de polarização eletroquímica em diferentes tempos de crescimento (ciclos) para as CCMs inoculadas com as bactérias *Clostridium butyricum* (sem acetato), *Clostridium butyricum* (com acetato), *Shewanella oneidensis* (com acetato) e *Shewanella putrefaciens* (sem acetato), *Shewanella putrefaciens* (com acetato).

A bactéria *Clostridium butyricum* é uma espécie anaeróbica restrita, portanto seu aceptor final de elétrons não será o oxigênio. Verifica-se na literatura que esta espécie não foi testada

com a mesma proporção que as demais espécies utilizadas neste trabalho. Todavia, nota-se que em trabalhos nos quais foram empregados consórcios de bactérias em CCM, ao final dos ciclos de estudos foram encontrados predominantemente cepas da bactéria *Clostridium butyricum* (HA et al., 2012; JIA et al., 2013;). Por isso, a bactéria *Clostridium butyricum* foi utilizada em cultivo puro em CCM com vinhaça enriquecida.

A Figura 5.1 mostra as curvas de polarização (Exi) e densidade de potência (pxi) para os tempos de 48, 120 e 216 h de crescimento para a bactéria *Clostridium butyricum*. Pode ser observado que a bactéria *Clostridium butyricum* teve uma fase de adaptação e crescimento bem definida de aproximadamente 120 h, examinada pela evolução do potencial de circuito aberto, OCP (potencial no estado em que não há passagem de corrente), assim o OCP no início do ensaio que foi de 0,12 V. O OCP evolui para valores mais positivos atingindo o valor máximo de 0,66 V (OCP_{max}) em 120 h de incubação e resultando na densidade de corrente $i_{máx}$ de 0,1220 mA cm⁻². Após este período verificou-se que o OCP tende a diminuir, fenômeno registrado até 216 h de incubação.

Também nota-se na Figura 5.1 perfis típicos das curvas de polarização, mostrando as regiões de perdas por ativação, por resistência ôhmica e por transporte de matéria. A curva de polarização da CCM após 48 h de inoculação apresentou densidade de corrente máxima de 0,020 mA cm⁻². Verifica-se ainda na Figura 5.2 que este número aumenta, atingindo o valor máximo de 0,1250 mA cm⁻² após 120 h de experimento. Contudo, o registro da polarização em 216 h de experimento apresentou um valor menor de densidade de corrente, em torno de 0,1099 mA cm⁻². Este comportamento pode ser explicado em função do ciclo de vida das bactérias, ou seja, a diminuição do OCP e a diminuição da densidade de corrente estão relacionadas com a fase de morte celular das bactérias. (SCHRÖDER, 2007; LOGAN, 2008; RABAEY et al., 2010).

No gráfico (pxi) da Figura 5.1, nota-se que a curva de densidade de potência varia o seu perfil em resposta ao desempenho da curva de polarização, esta performance é devido a densidade de potência ser dependente do potencial e da densidade de corrente ($p = Exi$). Assim, a densidade de potência de pico, que era de 8,03 mW m⁻² (0,04 W m⁻³) em 48 h alcançou o máximo em 120 h, com o valor de densidade de potência de 181,6 mW m⁻² (0,93 W m⁻³), porém, a redução do rendimento da CCM diminuiu em 16 % e a densidade de potência diminuiu para 151,8 mW m⁻² (0,78 W m⁻³) ao final de 216 h de operação.

Para avaliar as perdas na região ôhmica calculou-se a resistência interna (R_{int}), de modo que extraiu da curva de polarização (Exi) os valores de ΔE e Δi . Em que para este caso, os valores de R_{int} foram de 29,4 Ω ; 41,1 Ω e 42,3 Ω , sucessivamente aos períodos de 48, 120 e 216 h (FIGURA 5.1). Este aumento é normalmente provocado pelo aumento das perdas ôhmicas, tais perdas estão ligadas a membrana catiônica e ao acceptor de elétrons (carbono vítreo), que perdem a eficiência nos fluxos de íons com o aumento da biomassa bacteriana.

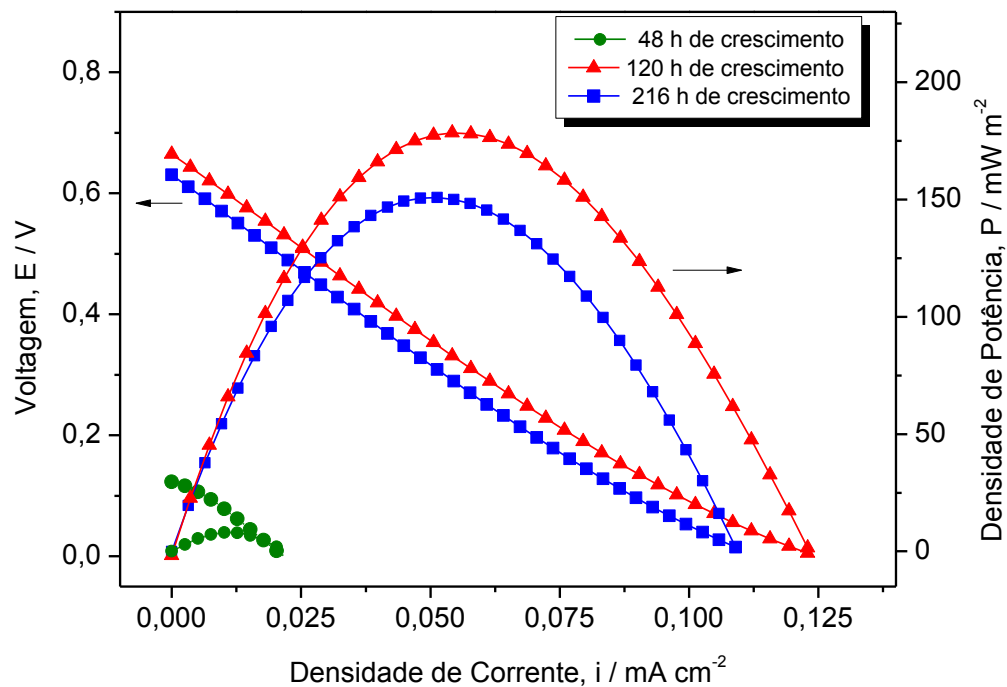


Figura 5.1 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com *Clostridium butyricum* em vinhaça enriquecida e com acetato no período de 216 horas de operação.

A bactéria *Shewanella oneidensis* é uma espécie anaeróbica facultativa e bastante eletroativa, muito estudada na área de CCM (ROY et al., 2014; BOND et al., 2002), pois consegue transferir os elétrons diretamente para o eletrodo por meio de nanofios (GORBY et al., 2006). Porém não se encontrou trabalhos empregando esta bactéria em meio à base de vinhaça.

A Figura 5.2 apresenta as curvas dos ensaios de polarização eletroquímica e densidade de potência para os tempos de crescimento de 48 h, 216 h e 336 h, para a CCM inoculada com *Shewanella oneidensis* em vinhaça com acetato.

A partir da Figura 5.2 observa-se que o OCP após 120 h de incubação apresentou valor de 0,19 V. Este valor evolui para 0,50 V, após 216 h de incubação, quando começa a diminuir sendo registrado 0,42 V após 336 h. A partir deste período não se conduziu outras polarizações, pois tanto o OCP quanto a potência já apresentavam valor muito baixo comparado ao medido em 216 h (máximo de desempenho obtido).

As curvas de polarização para o substrato inoculado com a bactéria *Shewanella oneidensis*, em diferentes tempos, também apresentaram perfis típicos. Como esperado, i_{\max} de 0,1101 mA cm⁻² foi obtida após um período de 216 h (FIGURA 5.2).

Na curva de densidade de potência (p_{xi}) verifica-se no gráfico da Figura 5.2, que a resposta da curva de polarização da bactéria atingiu o máximo de potência gerada de 125,7 mW m⁻² (0,65 W m⁻³) em 216 h de operação diminuindo para 81,0 mW m⁻² (0,42 W m⁻³) com 336 h de desenvolvimento, o que causou uma redução de 35 % na produção de bioeletricidade.

A análise das perdas ôhmicas na CCM com *Shewanella oneidensis* foi realizada medindo-se o aumento resistência interna, nos diferentes tempos de operação, sendo registrado R_{int} de 32,1 Ω (após 120 h); 34,9 Ω (após 216 h) e 36,9 Ω (após 336 h). Este comportamento pode ser explicado pela formação do próprio biofilme proveniente do metabolismo, tanto na superfície do eletrodo quanto na superfície da membrana trocadora de prótons.

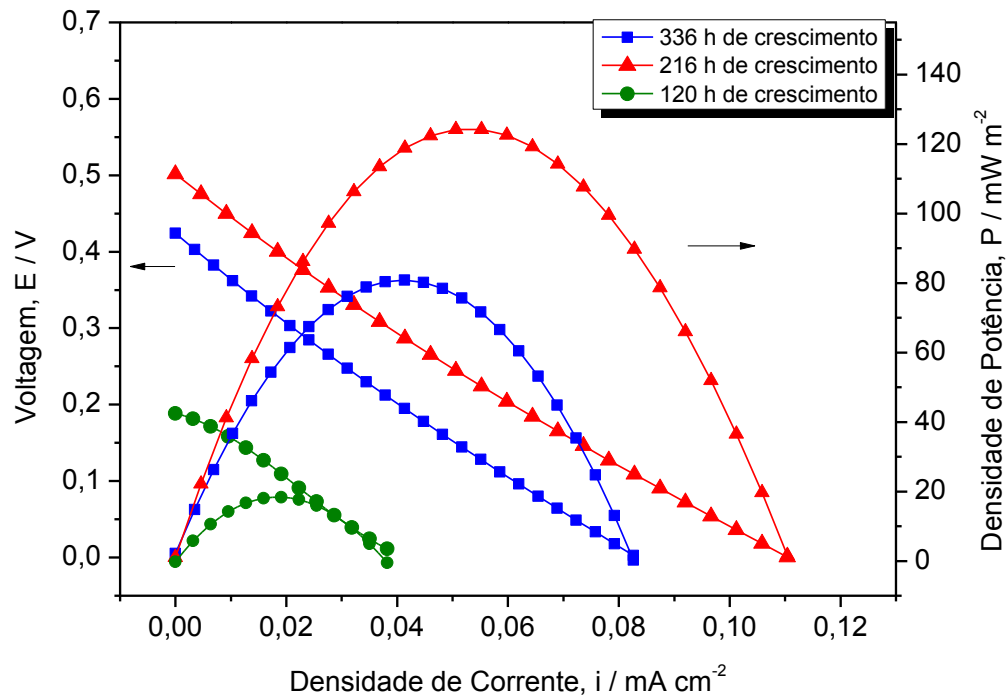


Figura 5.2 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com *Shewanella oneidensis* em vinhaça enriquecida e com acetato no período de 336 horas de operação

A bactéria *Shewanella putrefaciens* também é uma espécie anaeróbica facultativa, eletroativa, porém mais comum que a *Shewanella oneidensis*. Foi umas das espécies pioneiras empregadas em CCM sem mediadores químicos (CARMONA-MARTÍNEZ et al., 2013; KIM et al., 2002; KIM et al., 1999a).

A Figura 5.3 mostra a curva de polarização eletroquímica (E_{xi}) e densidade de potência (p_{xi}) para CCM cultivada com *Shewanella putrefaciens* em vinhaça com acetato com os ciclos de desenvolvimento do biofilme de 24 h, 48h e 168 h.

Nota-se primeiramente na Figura 5.3, que o experimento mostrou menos dispersão entre as curvas, e que as fases de adaptação e desenvolvimento desta bactéria não foram detectadas pelos ensaios, ou seja, o OCP não apresentou grandes alterações durante o período de medição. Assim, em 24 h de crescimento a CCM chegou ao valor de OCP de 0,36 V subsequentemente teve leves flutuações ao longo do tempo de operação atingindo o máximo de 0,40 V em 48 h, este valor perdurou por mais de 100 h, registrando-se 0,38 V após 168 h.

Na curva de polarização observou-se que o sistema conseguiu manter a corrente máxima de $0,0440 \text{ mA cm}^{-2}$, conforme abordado anteriormente, após longo tempo de operação, a formação do biofilme e a diminuição do OPC ocasionaram ligeira diminuição da corrente máxima, para o valor de $0,0380 \text{ mA cm}^{-2}$.

Quanto à geração de potência verifica-se na Figura 5.3 que em 48 h atingiu o máximo de potência gerada de $43,5 \text{ mW m}^{-2}$ ($0,25 \text{ W m}^{-3}$) em resposta a curva de polarização, e que em 168 h o sistema teve uma redução na eficiência em 27 % pois a potência gerada diminuiu para $32,1 \text{ mW m}^{-2}$ ($0,19 \text{ W m}^{-3}$).

Neste sistema, as resistências ôhmicas calculadas foram de $55,9 \Omega$ (após 24h); $61,2 \Omega$ (após 48h) e $78,3 \Omega$ (após 168h). Valores pouco maiores que os registrados anteriormente, em função da menor bioatividade da *Shewanella putrefaciens*.

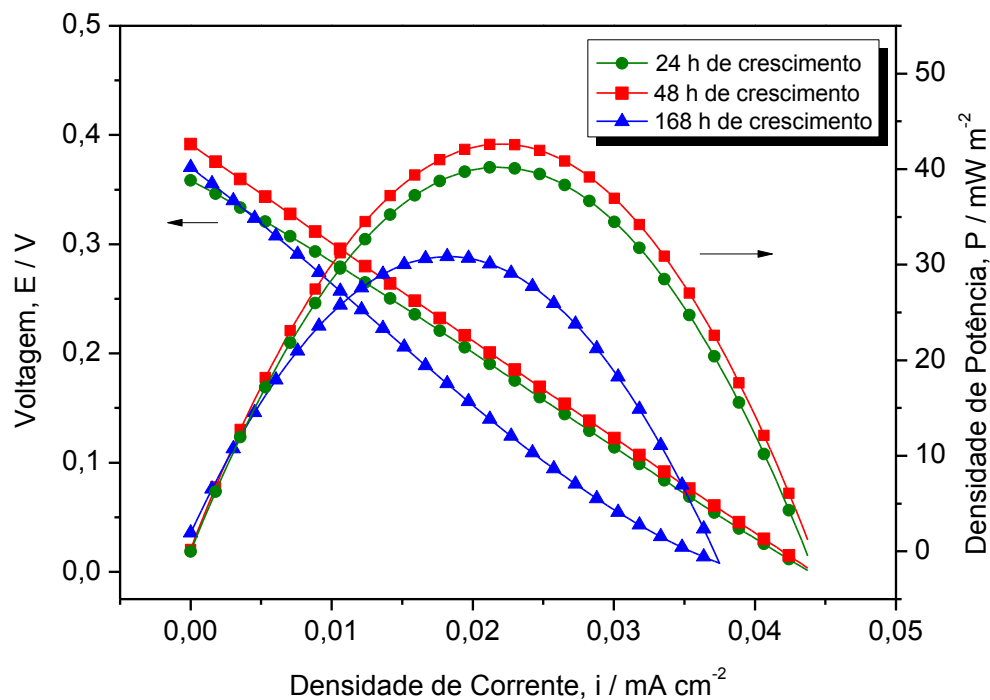


Figura 5.3 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com *Shewanella putrefaciens* em vinhaça enriquecida e com acetato no período de 168 horas de operação

A Tabela 5.3 mostra os resultados estatísticos para análise de variância (ANOVA) das principais variáveis obtidas dos ensaios de polarização eletroquímica em CCM alimentada com vinhaça em seus respectivos inóculos. Dentre as quais, o potencial de circuito aberto máximo (OCP_{max}) é utilizado para quantificar o máximo de diferença de potencial atingido entre os polos da CCM, a densidade de corrente máxima (i_{max}) avalia o maior fluxo de elétrons no sistema e a densidade de potência máxima (p_{max}) relata a maior quantidade energia gerada, sendo todas as variáveis relacionadas ao o período de operação (Δt) em horas de crescimento do biofilme.

Na Tabela 5.3 nota-se que os resultados experimentais foram significativamente diferentes para OCP_{max} ($p = 0,000$), i_{max} ($p = 0,000$) e p_{max} ($p = 0,000$) em todos os inóculos, aceitando a hipótese segundo o teste de Tukey com 95 % de confiança. Desta maneira, observa-se que o comportamento atingido de maior potencial com maior densidade de corrente resultaram em maior potência gerada para os casos. Logo, nota-se que a cultura mais eficiente para produção de bioeletricidade foi a co-cultura de *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum* em substrato de vinhaça com acetato, que obteve a p_{max} de $205,4 \pm 0,5$, OCP_{max} de 0,73 (V) e i_{max} de $0,1514$ ($mA\ cm^{-2}$) em 120 h de crescimento. Por outro lado, as cepas menos eficientes foram as culturas de *Shewanella putrefaciens* (sem acetato) com p_{max} de $3,27 \pm 0,04$ ($mW\ m^{-2}$), OCP_{max} 0,15 (V) e i_{max} $0,0062$ ($mA\ cm^{-2}$) e *Clostridium butyricum* (sem acetato) com p_{max} $5,8 \pm 0,2$ ($mW\ m^{-2}$), OCP_{max} 0,24 (V) e i_{max} $0,0435$ ($mA\ cm^{-2}$) ambas em 24 h de crescimento.

Tabela 5.3 – Resultado estatístico para o desempenho eletroquímico junto com o desvio padrão para o efluente vinhaça em CCM inoculada com diferentes inoculos

CCM (inóculo)	OCP _{max} / V	i _{max} / mA cm ⁻²	p _{max} / mW m ⁻²	Δt / h
<i>Shewanella putrefaciens</i> Sem Acetato	0,15 (0,00)	0,0060 (0,0004)	3,27 (0,04)	24
<i>Shewanella putrefaciens</i> Com Acetato	0,39 (0,00)	0,0440 (0,0004)	43,3 (0,2)	48
<i>Clostridium butyricum</i> Sem acetato	0,24 (0,00)	0,0100 (0,0005)	5,8 (0,2)	24
<i>Clostridium butyricum</i> Com Acetato	0,66 (0,00)	0,1220 (0,0003)	181,2 (0,8)	120
<i>Shewanella oneidensis</i> Com acetato	0,50 (0,00)	0,1100 (0,0004)	125,3 (0,2)	216

O teste aplicado foi o de Tukey com 95% de confiança. A variável OCP não apresentou erro significativo.

Em resumo os desempenhos eletroquímicos das culturas puras em termos de potência gerada, quando correlacionados com tempo total de incubação, mostram valores de perdas no rendimento de 16 % em 96 h para *Clostridium butyricum*, 35 % em 120 h para *Shewanella oneidensis* e 27 % em 120 h para *Shewanella putrefaciens*. Com isso, entre as cepas estudadas, consolidam-se as bactérias *Clostridium butyricum* e *Shewanella oneidensis* como as mais eficientes na produção de bioeletricidade.

Este comportamento também pode ser visualizado na Figura 5.4, a qual mostra as potências máximas atingidas pelas CCMs com seus respectivos tempos de operação. Deste modo, observa-se que as CCMs que obtiveram maiores potências geradas foram as com *Clostridium butyricum* e *Shewanella oneidensis*, porém a performance da geração de potência com o tempo foi diferente entre as cepas utilizadas como culturas em CCM.

Além da potência máxima a Figura 5.4 pode fornecer os tempos das fases de crescimento bacteriano e determinar o tempo de retenção hidráulica para cada cultura, que pode ser determinado em um sistema do tipo CCM pelo ponto de máxima potência alcançado, ou seja, a circulação do efluente em CCM deve operar na fase de máxima bioeletroatividade.

Assim, nota-se que a *Shewanella oneidensis* (Figura 5.4) teve um maior tempo de adaptação de aproximadamente 150 h, a *Clostridium butyricum* apresentou uma fase de adaptação curta de 60 h e a *Shewanella putrefaciens* não apresentou fase de adaptação.

Este comportamento da bactéria *Shewanella putrefaciens* resultou na ausência das fases de crescimento definidas, logo o perfil da curva foi caracterizado por um aspecto constante ao longo do tempo atingindo um leve decaimento a partir de 150 h.

Por outro lado, as bactérias *Clostridium butyricum* e *Shewanella oneidensis* apresentaram as fases de desenvolvimento detectadas pela produção de bioeletricidade, tal como a fase de adaptação de 60 h e 150 h, fase de crescimento exponencial de 60 h e 66 h, e fase de morte celular, embora não tenha sido visualizado as respectivas fases estacionárias em ambas culturas, resultando no tempo de retenção hidráulica de 24 h, 120 h e 200 h para *Shewanella putrefaciens*, *Clostridium butyricum* e *Shewanella oneidensis*, antes da fase de morte celular.

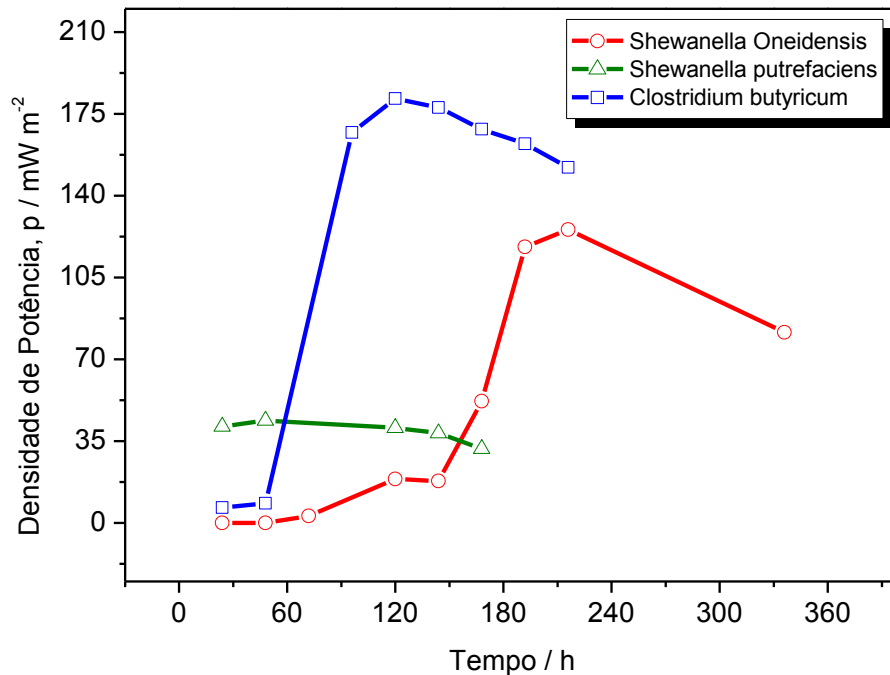


Figura 5.4 – Curva da potência gerada em relação com o tempo de operação para as bactérias *Clostridium butyricum*, *Shewanella putrefaciens* e *Shewanella oneidensis* em CCM alimentada com vinhaça enriquecida e com acetato.

Em comparação com dados da literatura, os valores máximos de potência gerada atingidos neste estudo de $43,5 \text{ mW m}^{-2}$ ($0,25 \text{ W m}^{-3}$) para *Shewanella putrafaciens*, $125,7 \text{ mW m}^{-2}$ ($0,65 \text{ W m}^{-3}$) para *Shewanella oneidensis* e $181,6 \text{ mW m}^{-2}$ ($0,93 \text{ W m}^{-3}$) para *Clostridium butyricum* foram próximos ou até maiores do que alguns encontrados na literatura. Por exemplo, a potência de $55,0 \text{ mW m}^{-2}$ foi gerada em CCM com efluente de óleo de palma inoculados com consórcio de bactérias isolada em estação de tratamento de esgoto doméstico (MOKHTARIAN, et al., 2012), potências de $50,0 \text{ mW m}^{-2}$ e $250,0 \text{ mW m}^{-2}$ em CCM com efluentes de produção de vinho tinto e branco, respectivamente, e consórcio de bactérias desnitrificadoras (SCIARRIA, et al., 2015) e potência de $150,0 \text{ mW m}^{-2}$, usando vinhaça em CCM inoculada com consórcio isolada de lodo de digestão (SAKDARONNARONG, et al., 2015), $0,44 \text{ W m}^{-3}$ e $0,45 \text{ W m}^{-3}$ utilizando percolado de alimento oriundo de aterro controlado em CCM cultivada com consórcio de lodo anaeróbico e consórcio isolado da clarificação (LI et al., 2013) e $18,2 \text{ mW m}^{-2}$ e $71,6 \text{ mW m}^{-2}$ de CCM com meio de cultura de glicose e lactato, respectivamente e inóculo de *Shewanella sp.* HN-41 (WU et al., 2013) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Potência máxima alcançada por CCM em diferentes inóculos alimentadas com efluentes industriais.

CCM (inoculo)	p_{\max}	Referência
<i>Shewanella putrafaciens</i>	43,5 mW m ⁻² (0,25 W m ⁻³)	
<i>Shewanella oneidensis</i>	125,7 mW m ⁻² (0,65 W m ⁻³)	Nesta Dissertação
<i>Clostridium butyricum</i>	181,6 mW m ⁻² (0,93 W m ⁻³)	
Consórcio de esgoto	55,0 mW m ⁻²	MOKHTARIAN et al., 2012
Consórcio de desnitrificadoras	50,0 mW m ⁻² 250,0 mW m ⁻²	SCIARRIA et al., 2015
Consórcio de lodo de digestão	150,0 mW m ⁻²	SAKDARONNARONG et al., 2015
Consórcio de lodo	0,44 W m ⁻³	LI et al., 2013
Consórcio de clarificação	0,45 W m ⁻³	
<i>Shewanella sp.</i> HN-41	18,2 mW m ⁻² 71,6 mW m ⁻²	WU et al., 2013

Estes resultados mostram que o protótipo da CCM com material anódico de carbono vítreo, cultivada com inóculos puros em vinhaça atingiu valores expressivos. Neste caso revelando o potencial desta tecnologia para produção de bioeletricidade. Entretanto estes resultados podem ser melhorados, por exemplo explorando ensaios com consórcio ou co-culturas como inóculo da vinhaça, visto que a eficiência em consórcios microbianos poder ser superior (BOURDAKOS et al., 2014).

5.2.2. CO-CULTURA DE *SHEWANELLA ONEIDENSIS* E *CLOSTRIDIUM BUTIRYCUM* EM CCM ALIMENTADA COM VINHAÇA

Os cultivos com uma espécie são denominados sementeiras puras, por outro lado, existem as sementeiras mistas (consórcios) ou co-culturas, que respectivamente são o cultivo de várias espécies ou de apenas duas. Em estudos com CCM os melhores desempenhos bioeletrocatalíticos foram observados em cultivos de consórcios ou co-culturas, esta hipótese foi relatada em

consideração que existe uma sinergia entre os microrganismos cultivados que melhoram o processo de transferência de elétrons, ou seja, uma interação metabólica entre as bactérias ou com excreção substâncias auxiliares (RAGHAVULU et al., 2013; KIM et al., 2008). Para avaliar esta hipótese foi realizado um ensaio com CCM cultivada com a co-cultura de *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum* com substrato de vinhaça enriquecida com acetato.

Neste sentido, a Figura 5.5 apresenta as curvas de polarização eletroquímica e densidade de potência, respectivamente, para a co-cultura de *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum* em CCM alimentada com vinhaça enriquecida com acetato no período de operação de 384 h.

Notadamente, observa-se na Figura 5.5 que a co-cultura ocasionou um aumento gradativo no OCP, mudando 0,15 V em 24 h para o valor máximo de 0,75 V (OCP_{max}) em 120 h, mas o OCP diminuiu, tal que decaiu até 0,43 V no período final de 384 h. Nota-se também, que a densidade de corrente seguiu este o mesmo comportamento aumentando gradativamente até $i_{\text{máx}}$ de 0,1160 mA cm⁻² em 120 h se reduziu até 0,074 mA cm⁻² no período final.

Enquanto, que a potência gerada visualizada no segundo eixo da Figura 5.5, apresentou um desempenho evolutivo resultante do comportamento da curva de polarização, com isso, a densidade de potência máxima inicialmente era de 10,6 mW m⁻² (0,05 W m⁻³) e atingiu o seu valor máximo em 120 h com 204,6 mW m⁻² (1,05 W m⁻³), entretanto, a potência gerada reduziu seu valor para 71,0 mW m⁻² (0,37 W m⁻³) no período final mensurado. Esta redução na densidade de potência gerou uma perda no rendimento de 65% em 264 h de operação. Verificou-se que não houve grandes variações das resistências internas, em relação às culturas puras, calculados nos diferentes tempos de inoculação, R_{int} de 34,8 Ω, 44,4 Ω e 44,6 Ω, para os períodos de 24 h, 120 h e 384 h, respectivamente.

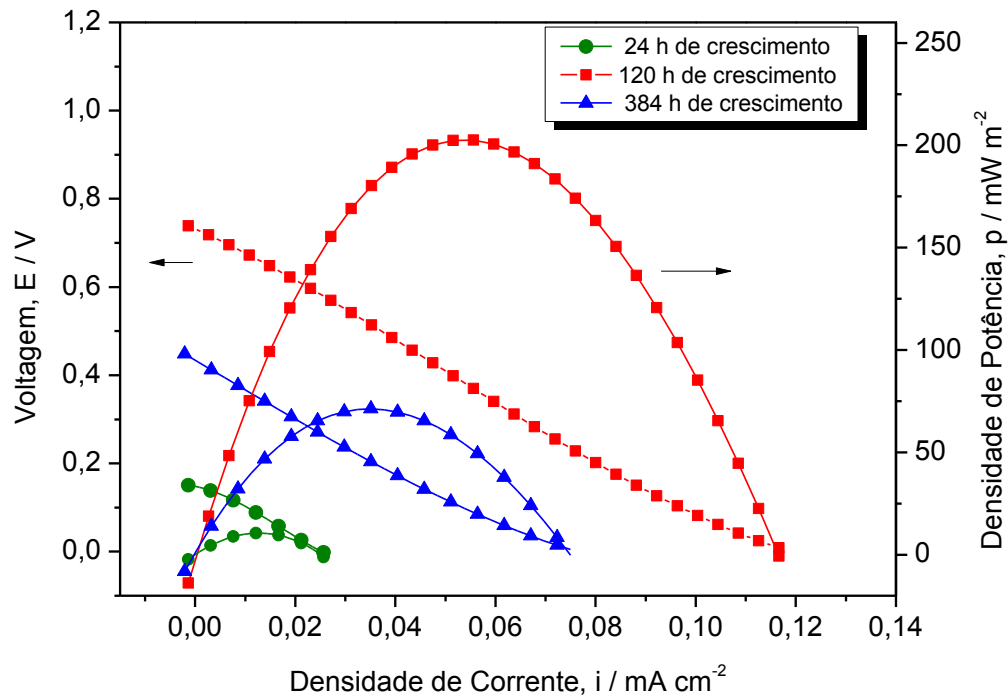


Figura 5.5 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum* em vinhaça enriquecida e com acetato no período de 384 horas de operação

Estes resultados para co-cultura quando comparados com o cultivo puro em vinhaça, nota-se que atingiram valores maiores para OCP_{max} e densidade de potencia máxima (TABELA 5.5), consolidando a hipótese de co-culturas terem melhor desempenho bioeletroquímicos do que cultivos puros.

Assim, foi relatado o valor expressivo de OCP igual a 0,75 V (TABELA 5.5) para a co-cultura sendo 0,10 V e 0,25 V maior do que os cultivos puros de *Clostridium butyricum* e *Shewanella oneidensis*, respectivamente, em consequência o co-cultivo alcançou a maior potência gerada por volume de efluente de $1,05 \text{ W m}^{-3}$. No entanto, observa-se que a resistência interna (R_{int}) do sistema atingiu um valor maior do que os cultivos puros e o desempenho não é mantido, assim, a produção de bioeletricidade se reduz ao longo do tempo e totalizando em 65 % em perdas até o período final de operação, a maior perda relatada.

Deste modo, pode constatar na Tabela 5.5, que quando a co-cultura está em desenvolvimento do biofilme, resulta em altos valores de densidade de potência. Porém quando chega a um longo período de operação, fase em que possivelmente tem competição por nutrientes e alta liberação de substâncias excretadas, o rendimento da CCM se reduz bruscamente, pois que estas podem ser novas ao metabolismo. Isto resulta em uma densidade de potência menor em relação aos cultivos puros, então os valores de densidade potência atingem $0,37 \text{ W m}^{-3}$; $0,78 \text{ W m}^{-3}$ e $0,42 \text{ W m}^{-3}$ para a co-cultura, *Clostridium butyricum* e *Shewanella oneidensis*, respectivamente.

Tabela 5.5 – Parâmetros bioeletroquímicos em CCM para cultivo puro e co-cultura alimentados com vinhaça.

CCM (inóculo)	OCP _{max} (V)	P _{max} (W m ⁻³)	Perdas da Potência (%)	R _{int} (Ω)
<i>Shewanella oneidensis</i>	0,50	0,65	35	34,9
<i>Clostridium butyricum</i>	0,66	0,93	16	41,1
Co -cultura	0,75	1,05	65	44,3

Além de alcançar um bom desempenho na produção de bioeletricidade comparado com os cultivos puros, a co-cultura de *Clostridium butyricum* /*Shewanella oneidensis* alcançou bons resultados comparados com as co-culturas encontrados na literatura (TABELA 5.6). Este comportamento pode ser visto na Tabela 5.8, em que a densidade de potência máxima atingida pela co-cultura foi de $204,6 \text{ mW m}^{-2}$, ou seja, 4,5 e 3,2 vezes maior do que os valores de co-cultura com *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* (RAGHAVULU et al., 2013) e *Geobacter sulfurreducens* e *E. coli* (BOURDAKOS et al., 2014), respectivamente.

Tabela 5.6 – Potência Máxima alcançada por CCM em diferentes Co-culturas.

CCM (inoculo)	P_{\max} (mW m ⁻²)	Referência
<i>Clostridium butyricum</i> e <i>Shewanella oneidensis</i>	204,6	Neste estudo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	45,0	RAGHAVULU et al., 2013
<i>Geobacter sulfurreducens</i> e <i>E. coli</i>	63,0	BOURDAKOS et al., 2014

5.2.3. CULTURAS COM *SHEWANELLA ONEIDENSIS* OU *CLOSTRIDIUM BUTIRYCUM* EM CCMs ALIMENTADAS COM EFLUENTES LÁCTEOS

Assim como a vinhaça, os efluentes lácteos (soro de leite e água residuária) também apresentaram características de substrato para serem empregados em CCM. Pois possuem altas concentrações de carga orgânica, nitrogênio e metais essenciais para o crescimento de microrganismo, e por outro lado também são passivos ambientais.

Para avaliar o desempenho na produção de bioeletricidade em CCM alimentada com soro de leite foram realizados ensaios de polarização eletroquímica com diferentes tempos de crescimento do biofilme bacteriano empregando-se cepas da bactérias *Shewanella oneidensis*. O mesmo tipo de ensaio foi realizado com água residuária, porém neste caso empregou-se cepas da bactéria *Clostridium butyricum*.

Assim, Figura 5.6 apresenta as curvas de polarização (E_{xi}) e as curvas de densidade de potência (p_{xi}) pela densidade de corrente, para bactéria *Shewanella oneidensis* em tempos de crescimento de 24 h, 160 h e 360 h em CCM alimentada com soro de leite enriquecido com acetato.

Deste modo, observa-se na Figura 5.6 que o OCP_{\max} foi obtido em menor tempo de operação, com 24 h e com um valor de 0,43 V, entretanto este valor não se manteve, e logo foi diminuindo com tempo de operação até atingir 0,24 V, após 360 h, diferentemente do sistema alimentado com vinhaça, que manteve o OCP acima de 0,40 V até o tempo final de operação. Nota-se a ausência da fase de adaptação da bactéria no sistema. Outro fator importante observado

foi que a curva de polarização após 24 h apresentou o comportamento linear, que retrata predominante a lei de Ohm das perdas eletroquímicas. Porém este perfil com evolução do tempo foi se transformando em mais curvilíneo perdendo a linearidade nos tempos de 160 h e 360 h, este resultado é normalmente verificado devido aumento de perdas nas reações eletroquímicas exibidas nas curvas de polarizações, característico principalmente por perdas por transporte de massa em a curva apresenta um decaimento exponencial,.

No segundo eixo vertical (p_{xi}) da Figura 5.6 verifica-se que a potência gerada atingiu o valor máximo de $191,4 \text{ mW m}^{-2}$ ($0,98 \text{ W m}^{-3}$) em 24 h e foi decaindo com o tempo de crescimento até os valores de $74,3 \text{ mW m}^{-2}$ ($0,38 \text{ W m}^{-3}$) em 168 h e $42,7 \text{ mW m}^{-2}$ ($0,22 \text{ W m}^{-3}$) em 360 h. A redução da atividade eletroquímica causou uma perda de potência gerada no sistema que alcançou 78 % com 360 h de operação, de maneira que este resultado pode ser explicado em função das perdas na bioeletroatividade causadas pela resistência ao transporte de massa. As perdas ôhmicas foram caracterizadas pelo aumento sucessivo da resistência interna de $16,57 \Omega$ em 48 h, $20,17 \Omega$ em 168 h e $21,74 \Omega$ em 360 h de operação.

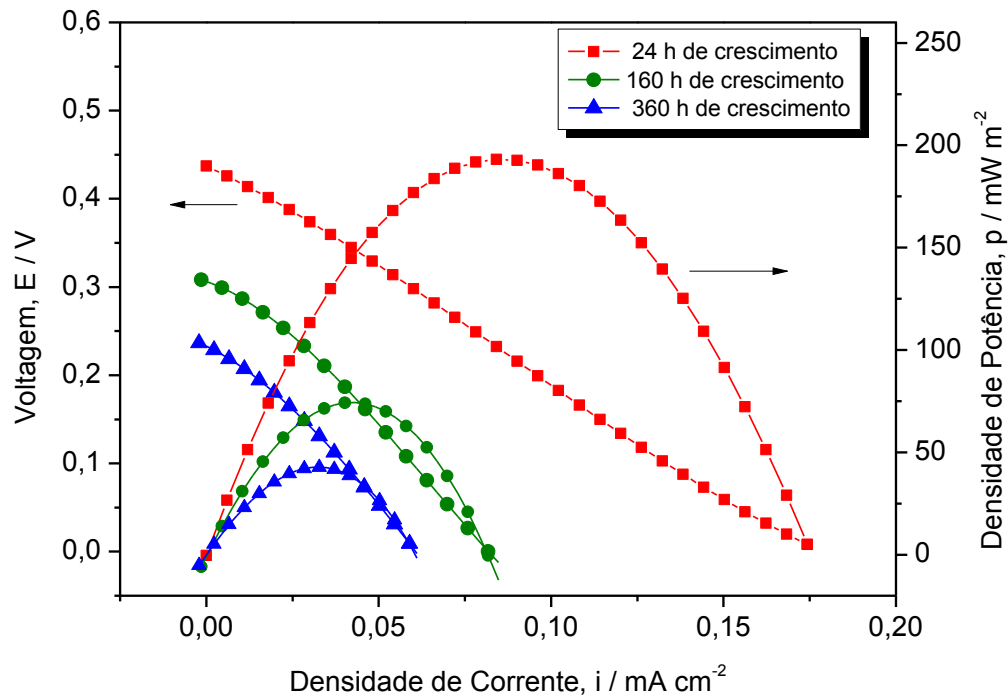


Figura 5.6 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com *Shewanella oneidensis* em efluente lácteo enriquecido e com acetato no período de 360 horas de operação.

A curva de polarização para o sistema alimentado com água residuária, inoculado com *Clostridium butyricum* pode ser visualizada na Figura 5.7, onde mostram as curvas de polarização (E_{xi}) e densidade de potência (p_{xi}), pela densidade de corrente nos tempos de crescimento de 48 h, 192 h e 336 h.

Observa-se no gráfico, E_{xi} na Figura 5.7 que este arranjo, apresentou após 48 h de crescimento OCP de 0,69 V e i_{max} de 0,2190 mA cm⁻². Contudo, estes números mudaram para valores menores, após 192 h, quando foi detectado OCP de 0,40 V e registrado i_{max} de 0,0900 mA cm⁻². Após 336 h verificou-se que o OCP havia se mantido em 0,40 V e registrou-se i_{max} de 0,1080 mA cm⁻², portanto superior à medida em 192 h. O que sugere que sejam feitos mais ensaios para verificar se está havendo reaproveitamento de metabólitos gerados pelas bactérias para retroalimentar o sistema.

O perfil da densidade de potência para *Clostridium butyricum* pode ser visualizado no gráfico p_{xi} , da Figura 5.7, no qual se observa que a potência máxima atingida pela CCM foi de $391,5 \text{ mW m}^{-2}$ ($2,02 \text{ W m}^{-3}$) em 48 h de crescimento, assim como para os outros casos estudados a densidade de potência se reduz para $102,6 \text{ mW m}^{-2}$ em 192 h, entretanto aumentou para $124,7 \text{ mW m}^{-2}$ em 336 h, fenômeno não esperado, mas que conforme discussão anterior merece mais ensaios para melhor avaliação. Neste sistema, a maior perda eletroquímica significou redução da potência gerada em 68 %. Verificou-se que nestes ensaios a resistência ôhmica mudou de $21,1 \Omega$ (48 h) para $27,1 \Omega$ (192 h), mas devido a este comportamento inesperado reduziu-se para $22,3 \Omega$ (336 h).

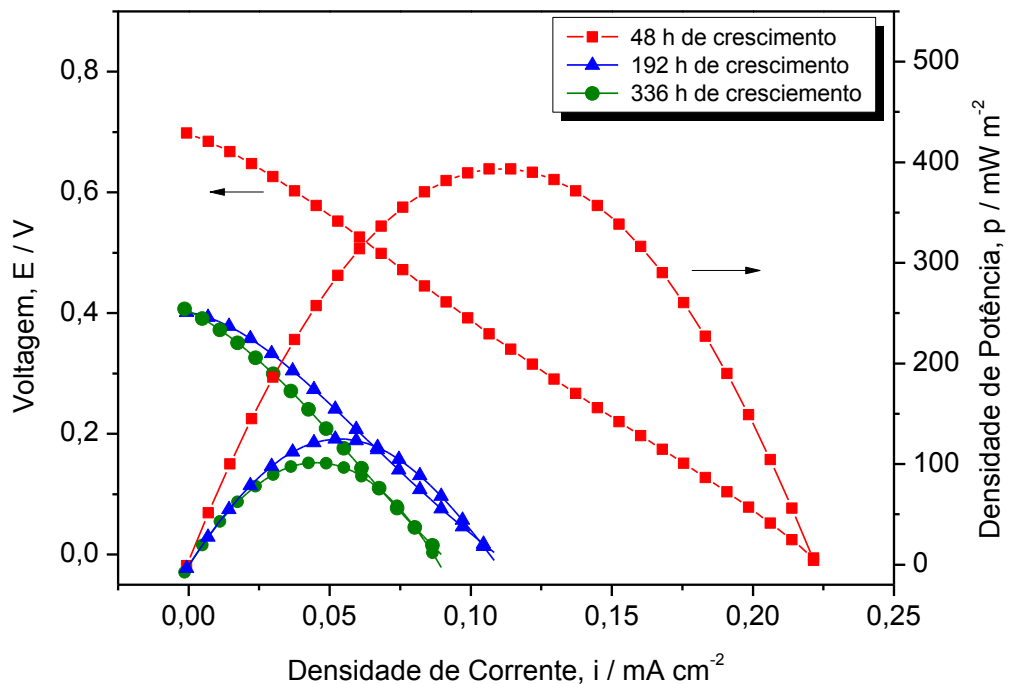


Figura 5.7 – Polarização eletroquímica para CCM inoculada com *Clostridium butyricum* em efluente lácteo enriquecido e com acetato no período de 336 horas de operação.

Para comparar os valores obtidos nos ensaios de polarização eletroquímica entre os sistemas soro de leite/ *Shewanella oneidensis*, água residuária/ *Clostridium butyricum* também foi

realizado análise de variância para as principais variáveis testadas. Neste caso, a Tabela 5.7 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) para os dois sistemas. Avaliou-se os resultados do $OCP_{m\acute{a}x.}$, $i_{m\acute{a}x.}$ e densidade de potência máxima, usando o teste de Tukey em 95 % de nível de confiança. E assim, verificou-se que realmente existe uma diferença significativa para os tratamentos estudados nas variáveis OCP_{max} ($p = 0,000$), i_{max} ($p = 0,000$) e p_{max} ($p = 0,000$).

Desta maneira observa-se na Tabela 5.7, que o sistema água residuária/ *Clostridium butyricum*, apresentou melhor desempenho bioeletroquímico em relação ao sistema soro de leite/ *Shewanella oneidensis*, pois gerou uma densidade de potência máxima duas vezes maior. Entretanto, a potência máxima gerada ao longo de todo o tempo de operação para os dois inóculos foi alcançada mais rapidamente pela bactéria *Shewanella oneidensis* com 24 h de operação.

Tabela 5.7 – Resultados estatístico para as principais variáveis eletroquímica do sistema junto com desvio padrão, para o respectivo período de operação.

CCM (inóculo)	OCP_{max} (V)	i_{max} (mA cm ⁻²)	p_{max} (mW m ⁻²)	Δt (h)
Soro de leite / <i>Shewanella oneidensis</i>	0,43 (0,00)	0,1724 (0,0004)	191,1 (0,2)	24
Água residuária / <i>Clostridium butyricum</i>	0,69 (0,00)	0,2186 (0,0006)	391,5 (1,3)	48

Os valores que estão entre parenteres são os erros.

A geração de potência apresenta um comportamento dependente do desenvolvimento dos biofilmes inoculados no efluente lácteo, a Figura 5.8, exhibe a evolução da densidade de potência máxima atingidas em todos os ensaios de polarização com os dois sistemas lácteos.

Observa-se na figura 5.8 que as bactérias testadas tiveram comportamentos distintos na produção de bioeletricidade nos meios estudados, e nota-se que a *Shewanella oneidensis* teve uma rápida adaptação alcançando o máximo de densidade de potência em 24 h, por outro lado a *Clostridium butyricum* apresentou uma fase de adaptação a qual alcançou seu máximo de potência gerada em 48 h de desenvolvimento.

No entanto, pode ser notado na Figura 5.8, que após atingir o máximo de densidade de potência ambas as bactérias atingiram um perfil semelhante em que apresentou duas fases, a primeira de decaimento depois uma segunda fase com uma certa estabilidade da densidade de potência média de $75,0 \text{ mW m}^{-2}$ e $125,0 \text{ mW m}^{-2}$, para *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*, respectivamente.

Este perfil, diferentemente do perfil obtido para os testes com a vinhaça, mostra que os maiores valores de potência não se mantêm e em um curto periodo a densidade de potência decai, diminuindo eficiência no processo de obtenção de energia elétrica.

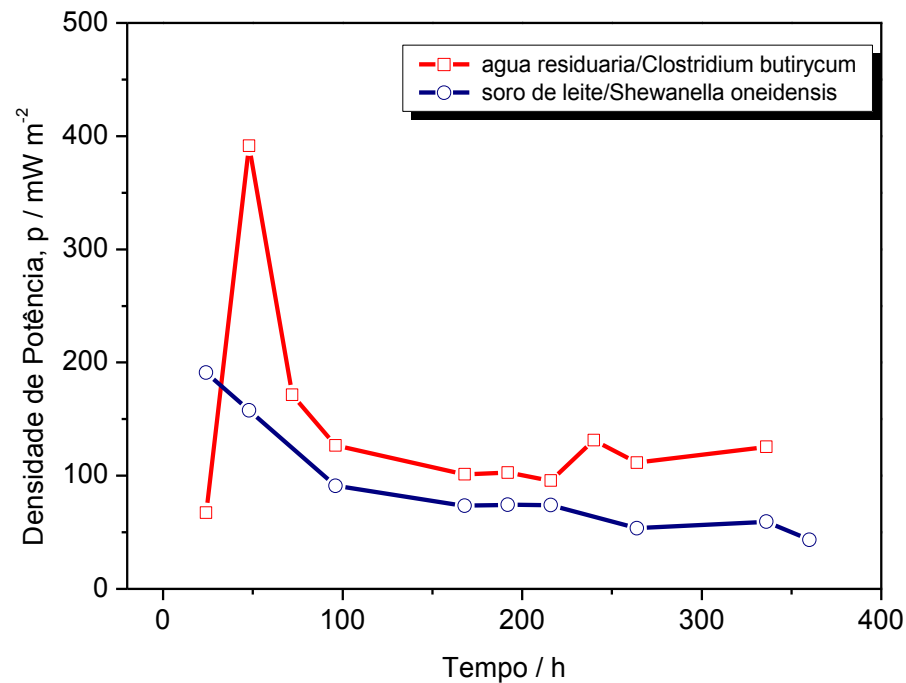


Figura 5.8 – Curva de geração de potência com os respectivos tempos de ensaio de polarização para CCM inoculadas com as bactérias *Clostridium butyricum* e *Shewanella oneidensis* em efluentes lácteos.

Os valores obtidos das potências máximas para CCM alimentada com efluente lácteo, foram igual a $2,02 \text{ W m}^{-3}$ para a *Clostridium butyricum* e $0,98 \text{ W m}^{-3}$ para a *Shewanella oneidensis*. Estes valores são próximos aos encontrados na literatura (TABELA 5.8). Por

exemplo, Kelly e He (2014) estudou a aplicação de CCM alimentada com diferentes efluentes da indústria de queijo, a CCM em estudo foi inoculada com consórcio de bactérias de lodo de digestão e alcançou os valores de $3,0 \text{ W m}^{-3}$ e $1,3 \text{ W m}^{-3}$ para os efluentes, água residuária da estabilização e soro de leite. Elakkiya e Matheswaran (2013), atingiu o valor de potência gerada de $2,7 \text{ W m}^{-3}$ com uma CCM inoculada com bactérias isoladas de efluente lácteo e alimentada com efluente do processamento de leite. Em contraste, um alto valor de energia foi atingido com efluente lácteo por Kim et al. (2015), que utilizou uma CCM ao ar com inóculo de bactérias consorciadas e isolada de uma estação de tratamento no processo de lodo ativado, a CCM foi alimentada com efluente lácteo oriundo do processamento de leite e obteve a máxima densidade de potência de $24,9 \text{ W m}^{-3}$, com a circulação do efluente no anodo. Esta perspectiva mostra que o efluente lácteo empregado como substrato possui características singulares para obtenção de potências mais altas em sistemas bioeletroquímicos.

Tabela 5.8 – Potências máximas obtidas por CCM alimentadas com efluentes de indústria láctea.

CCM (inoculo)	Industria láctea	p_{\max}	Referência
<i>Clostridium butyricum</i>	Leite	$391,5 \text{ mW m}^{-2}$ ($2,0 \text{ W m}^{-3}$)	Neste estudo
<i>Shewanella oneidensis</i>	Queijo	$191,1 \text{ mW m}^{-2}$ ($1,0 \text{ W m}^{-3}$)	
Consórcio de bactérias de lodo ativado	Leite	$24,9 \text{ W m}^{-3}$	KIM et al., 2015
Consórcio de bactérias de lodo de digestão	Queijo / estabilização	$3,0 \text{ W m}^{-3}$	KELLY e HE, 2014
Consórcio de bactérias de lodo de digestão	Queijo/Soro	$1,3 \text{ W m}^{-3}$	KELLY e HE, 2014
Bacteria isolada de efluente lácteo	Leite	$2,7 \text{ W m}^{-3}$	ELAKKIYA e MATHESWARAN, 2013

5.3. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA PARA O TRATAMENTO DOS EFLUENTES

5.3.1. REMOÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) E ANÁLISE DA EFICIÊNCIA COULUMBICA (EC)

A Célula a Combustível Microbiana além de produzir bioeletricidade pode atuar como um biorreator para tratamento de efluentes por meio de reações biológicas e eletroquímicas, quando submetido a uma resistência externa que permite o fluxo de elétrons continuamente durante o período de operação. Este processo remove quantidades significativas de substâncias poluentes através das interações entre biofilme e o material anódico (ZHANG et al., 2015; RABAEY, 2010).

Para avaliar o desempenho quantitativamente da degradação dos efluentes em CCM, ou seja, as remoções das substâncias oxidáveis, foram feitas medições de DQO antes e após o tempo de operação em CCM inoculada com *Clostridium butyricum*, *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella oneidensis* e co-cultura de *Clostridium butyricum*/*Shewanella oneidensis*. E ainda, foram calculados a eficiência coulômbica (EC), para avaliar a bioeletrocatalise da vinhaça e dos efluentes lácteos, soro de leite e água residuária, em CCM, como descritos na Tabela 5.9.

Neste caso, verifica-se na Tabela 5.9, que quando os efluentes vinhaça, soro de leite e água residuária foram enriquecidos com acetato, tiveram seus valores de DQO aumentados para; $36436 \pm 1197 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, $68797 \pm 1504 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ e 11955 ± 425 , respectivamente. Estes valores de DQO para os efluentes enriquecidos foram usados para calcular a remoção de DQO e a eficiência coulômbica para todos os tratamentos (TABELA 5.9). Em todos os tratamentos estudados foi possível observar redução de DQO, embora com índices de remoção diferentes.

Desta maneira, nota-se na Tabela 5.9, que o modelo de CCM proposto alcançou bons desempenhos referentes à remoção de DQO, em que para o efluente vinhaça os tratamentos com *Shewanella oneidensis* e com co-cultura foram os mais eficiente para remover a carga orgânica, resultando na remoção de 42 % e 57 % de DQO, respectivamente. Por outro lado, os menos eficientes foram os tratamentos com *Clostridium butyricum* (com acetato) e *Shewanella putrefaciens* (sem acetato), com o valor de remoção de DQO 22 % e 27 %, respectivamente.

Em termos de eficiência coulômbica (EC) usando o efluente vinhaça, a CCM atingiu baixos valores, com o melhor resultado de 5,6 % para co-cultura, e nos sistemas de cultura pura os melhores resultados foram das CCMs inoculadas com *Clostridium butyricum* com o valor de 4,9 % e *Shewanella oneidensis* com o valor de 3,9 %

Este comportamento mostra que o inoculo bacteriano influencia também no desempenho da CCM quanto ao tratamento do efluente, sendo que as causas prováveis podem ser nutricionais ou capacidade de transferência de elétrons de cada biofilme, assim podendo ser otimizadas com a co-cultura.

Também foi observado um comportamento particular para a bactéria *Clostridium butyricum*, que obteve baixo desempenho quanto à remoção de DQO, mas atingiu uma EC satisfatória para o sistema em estudo.

Na literatura foram encontrados dados referentes à remoção de DQO em CCM de 45 % e EC de 35 % para vinhaça, porém com baixa carga orgânica de 1000 mgO₂ L⁻¹ e cultivo de bactérias consorciadas (HA et al., 2012), e para efluentes do processamento fermentativo do vinho foram relatados os valores de 27,0 e 9,0 para ηDQO e EC, respectivamente, usando com a carga orgânica de 10100 mgO₂ L⁻¹; e 95,0 e 15,0 para ηDQO e EC, respectivamente, neste caso usando carga orgânica de 6400 mgO₂ L⁻¹ (SCIARRIA et al., 2015), confrontando com os dados experimentais alcançados verifica-se que a CCM alimentada com a vinhaça com alta carga orgânica teve um bom desempenho. E ainda, os resultados da literatura mostram uma tendência em que quanto maior o valor da DQO do efluente, menor é o desempenho do sistema.

Para os efluentes lácteos pode ser verificado na Tabela 5.9, que os inoculos de *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum* obtiveram bons desempenhos também para remoção de DQO embora apresentassem baixa eficiência coulômbica, porque se empregou os efluentes com altas concentrações de DQO (68700 mgO₂ L⁻¹, soro de leite e 11900 mgO₂ L⁻¹, água residuária), resultando nos valores de 43 % e 74 % para remoção de DQO e 3,2 e 13,0 para EC, respectivamente. Com destaque para sistema água residuária/*Clostridium butyricum* que apresentou a melhor performance do protótipo. Comparando com estudos de outros autores, as análises da CCM com os efluentes lácteos retratam uma performance satisfatória, por exemplo, Kelly et al. (2014), estudaram CCMs alimentadas com diferentes efluentes lácteos, sendo que obteve os melhores resultados quando empregou efluentes com DQO de 2200 mgO₂ L⁻¹ e 11300

$\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, os quais atingiram a remoção de DQO de 80 % e 59 % e EC de 6,1 e 2,2. Isto pode indicar que utilizar as culturas identificadas como eletrogênicas e o carbono vítreo distribuído por todo o volume anódico pode estar exercendo um papel para melhorar a eficiência da CCM com efluentes de altas DQO.

Verifica-se na Tabela 5.9 que a bactéria *Clostridium butyricum* inoculada em CCM com vinhaça e água residuária, com as respectivas DQO de $36400 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ e $11900 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, alcançou um aumento de 52 % quando avaliada a remoção de DQO e aumento 8,1 % na EC. Quando comparada a eficiência da *Shewanella oneidensis* nos sistemas com soro de leite e vinhaça (DQO de $68700 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ e $36400 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, respectivamente) nota-se que não resultou em mudanças significativas no tratamento.

Quanto ao tratamento dos efluentes estes resultados mostram que a CCM em estudo pode ser empregada como um sistema de remediação em que pode atuar com efluentes de altas e baixas carga orgânicas (DQO), embora a eficiência pode depender do inóculo.

Tabela 5.9 – Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Eficiência coulômbica (EC) antes e após o tratamento em CCM.

	DQO (mg O ₂ /L)	ηDQO (%)	Eficiência Coulômbica (EC)
CCM/ Vinhaça			
Vinhaça Enriquecida	36436 ± 1197		
Depois da CCM (acetato) com <i>Clostridium butyricum</i>	28245 ± 828	22	4,9
Depois da CCM (acetato) com <i>Shewanella putrefaciens</i>	25997 ± 94	28	1,1
Depois da CCM (s/acetato) com <i>Shewanella putrefaciens</i>	26529 ± 470	27	0,2
Depois da CCM (acetato) com <i>Shewanella oneidensis</i>	21276 ± 301	42	3,9
Depois da CCM (acetato) com <i>Shewanella oneidensis e</i> <i>Clostridium butyricum</i>	15790 ± 1053	57	5,6
CCM/ Efluente lácteo			
Soro de leite	68797 ± 1504		
Depois da CCM (acetato) com <i>Shewanella oneidensis</i>	38910 ± 798	43	3,2
Água residuária	11955 ± 425		
Depois da CCM (acetato) com <i>Clostridium butyricum</i>	3108 ± 285	74	13,0

5.3.2. AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DESCOLORAÇÃO POR ESPECROSCOPIA UV-VIS

A análise da varredura espectral em espectrofotômetro foi empregada para avaliar qualitativamente a capacidade de tratamento dos efluentes através das curvas de absorvância pela variação do comprimento de onda no espectro visível. A partir da construção das curvas foram extraídos os índices de descoloração.

Esta técnica pode ser usada para avaliar o tratamento de efluentes que impedem a passagem de luz, ou seja, a técnica avalia as substâncias presente no efluente que absorvem a luz em uma faixa de comprimento de onda. O tratamento indevido desses efluentes pode causar sérios impactos ambientais nos corpos hídricos receptores, sendo que muitos organismos aquáticos necessitam de fonte luminosa.

O bloqueio da passagem de luz é causado pela coloração em consequência da presença de compostos orgânicos ou pigmentos. Por exemplo, na vinhaça a coloração marrom escura é principalmente proveniente de reações não enzimáticas (reação Millard) entre açúcares e compostos aminos que geram melanoidina (KAHRAMAN e YESILADA, 2003; FERREIRA et al., 2011; TAPIA-TUSSELL et al., 2015).

A melanoidina ($C_{17-18}H_{26-27}O_{10}N$) é um polímero de difícil biodegradação, ou seja, é um composto recalcitrante que principalmente provoca na vinhaça a característica de cor marrom escura. Então a descoloração é uma maneira de avaliar a degradação destes tipos de composto que causam a coloração do efluente, como a melanoidina. Para este fim normalmente usa-se a medição da absorvância antes e pós o tratamento (KRZYWONOS e SERUGA, 2012; DAVID et al., 2015).

A Figura 5.9 apresenta as varreduras espectrais mensuradas entre os comprimentos de ondas de 350 nm e 900 nm, após diferentes período de incubação da vinhaça em CCM, sem inoculação (controle) e inoculadas com *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*.

Com análise da Figura 5.9 verifica-se, que a curva espectral para a vinhaça enriquecida obteve altos valores de absorvância em que apresentou um decaimento brusco, com o final no comprimento de onda de aproximadamente 480 nm, em sequência a curva de absorvância adquiriu certa estabilidade formando um patamar de absorvância igual a 1,1 D.O. para vinhaça. De modo que, este desempenho pode ser verificado em um estudo do tratamento da vinhaça por fotodegradação feito por Santana e Machado (2008), o qual a vinhaça controle apresentou o perfil semelhante de decaimento brusco da absorvância chegando a estabilidade em 425 nm.

A partir do resultado para vinhaça pura, observa-se na Figura 5.9, que todos os tratamentos obtiveram o mesmo perfil de curva, com duas fases definidas em que a primeira é destacada por possuir um decaimento brusco e a segunda definida por uma certa estabilidade.

Porém, nota-se que os tratamentos em todos os casos, a primeira fase teve o final estendido até uma faixa entre 475 e 500 nm, e ainda mais a presença de reduções significativas da absorvância entre os tratamentos ao longo das varreduras espectrais (FIGURA 5.9).

Estas diferenças significativas entre as curvas de vinhaça e as dos tratamentos em CCM (FIGURA 5.9) era esperada, pois a bioeletroatividade na CCM degradam e convertem diversos tipos de compostos que causam uma coloração do efluente, com isso o efluente se torna mais límpido reduzindo os compostos que causam os valores mais altos da absorvância fazendo com que a vinhaça perca cor.

Com isso, observa-se (FIGURA 5.9) primeiramente que o desempenho da redução de absorvância foi aumentado com a incorporação de acetato na vinhaça, de tal modo que o tratamento com *Shewanella putrefaciens* sem acetato obteve maiores valores para absorvância do que o tratamento com *Shewanella putrefaciens* com acetato. Por este motivo o acetato foi utilizado para todos os outros experimentos. Já comparando os desempenhos entre as bactérias, nota-se que o tratamento de CCM inoculada com *Clostridium butyricum* obteve o melhor resultado, embora que em *Shewanella oneidensis* alcançou um bom resultado ficando próximo da *Clostridium butyricum*, e por último o tratamento com *Shewanella putrefaciens* que reduziu menos absorvância.

Para calcular a eficiência deste comportamento foi utilizado a descoloração do efluente no espectro visível, ou seja, a remoção da absorvância no comprimento de onda de estabilização inicial (480 nm). Logo, dentre os tratamentos o melhor desempenho foi confirmado sendo a CCM inoculada com bactéria *Clostridium butyricum* que alcançou o maior valor de descoloração de 70 %, e os outros tratamentos atingiram os seguintes valores de 33 % (S.p. sem acetato), 48 % (S.p. com acetato) e 62 % (S.o.), com isto a CCM além de produzir bioeletricidade também realizar a descoloração que é remoção de substâncias que causam a cor predominante da vinhaça.

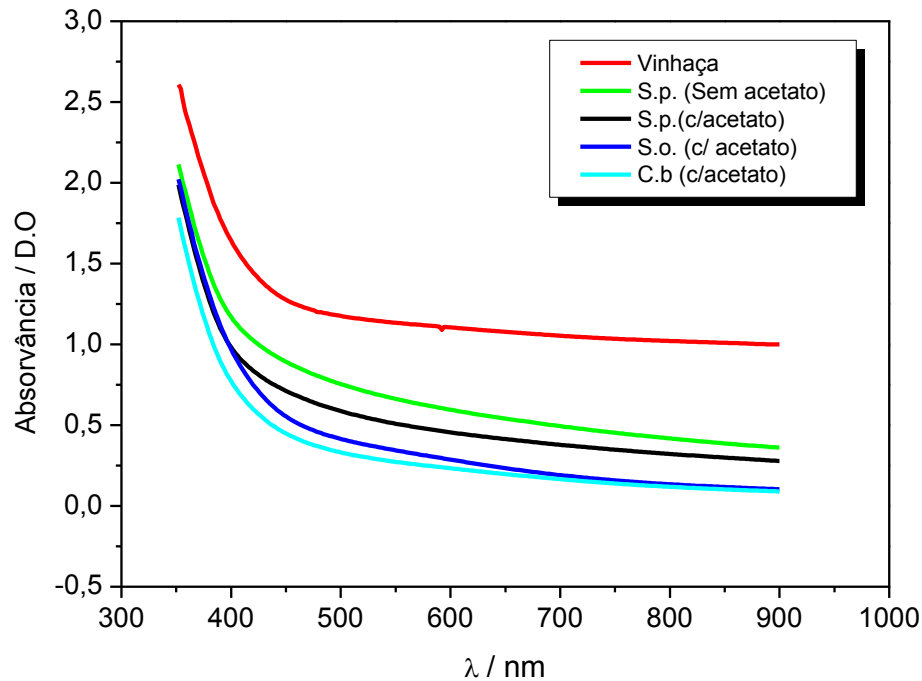


Figura 5.9 – Varredura espectral da vinhaça antes (enriquecida) e depois do tempo de operação em CCM cultivada com cultura pura de: *Shewanella putrefaciens* (S.p.), *Shewanella oneidensis* (S.o.) e *Clostridium butyricum* (C.b).

A descoloração da vinhaça em CCM foi satisfatória quando empregou-se a *Clostridium butyricum* (70 %) e *Shewanella oneidensis* (62 %), estes números estão de acordo com os resultados obtidos em outros tipos de sistemas biotecnológicos, por exemplo Kahraman e Yesilada (2003), obtiveram uma máxima remoção da cor da vinhaça de 71 % (em OD₄₇₅) com o fungo *Coriolus versicolor*, em cultivo com um solução de vinhaça diluída em 10 vezes. Ferreira et al. (2011) conseguiram 99 % de remoção de cor com uma biodegradação usando o fungo *Pleurotus sajor-caju* com incubação agitada em 180 rpm sem a influência de luz. Recentemente, Tapia-Tussell et al. (2015) utilizou o fungo *Trametes hirsuta* para o tratamento biológico da vinhaça, que removeu 72 % da cor em 192 horas de cultivo com a concentração de 10 % de vinhaça. Entretanto estes sistemas descritos anteriormente não permitem a recuperação de parte da energia, como acontece nas CCMs.

Por consequência da CCM ser uma Tecnologia emergente foram encontrados poucos estudos com efluente vinhaça e não foram encontrados ensaios de descoloração para CCM alimentada com vinhaça.

No caso dos efluentes lácteos a remoção da cor é caracterizada pela degradação das substâncias que causam a coloração branca ou branca amarelada, bem como, as leituras de absorvância derivam da concentração de proteínas, açúcares e gorduras os quais são os principais constituintes destes efluentes (SATO e SAITO, 2013). A Figura 5.10 apresenta o espectro de absorvância para os efluentes lácteos in natura e tratado em CCM inoculada com *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*.

Os efluentes lácteos estudados mostraram comportamentos distintos quanto a varredura espectral, de modo que o soro de leite, que possui maior DQO ($68700 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$) teve maiores valores de absorvância apresentando uma curva de decaimento sem a presença da fase de estabilização. Por outro lado, água residuária, de menor DQO ($11900 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$) resultou em valores mais baixos de absorvância com perfil de curva de decaimento mais suave apresentando um patamar próximo de 0,18 D.O. a partir de 750 nm, e também se relata um pico levemente acentuado em 600 nm (FIGURA 5.10). Em virtude destes resultados, o comprimento de onda do índice descoloração foi calculado, resultando em 600 nm para os dois casos, ao longo do espectro visível que esta na faixa de 400 nm a 800 nm.

Para os efluentes lácteos *in natura*, observa-se na Figura 5.10 que os comportamentos das varreduras espectrais foram semelhantes às curvas de decaimento para cada efluente lácteo sem tratamento. No entanto, os valores da D.O foram menores, indicando que houve degradação das substâncias contidas nos efluentes. Desta forma, a degradação de substâncias no comprimento de onda 600 nm promoveu um índice relativo de descoloração (D_{600}) de 25 % e 46 % para CCM inoculada com *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*, respectivamente. Portanto, a CCM alimentada com água residuária e inoculada com *Clostridium butyricum* obteve o melhor desempenho de remoção de cor.

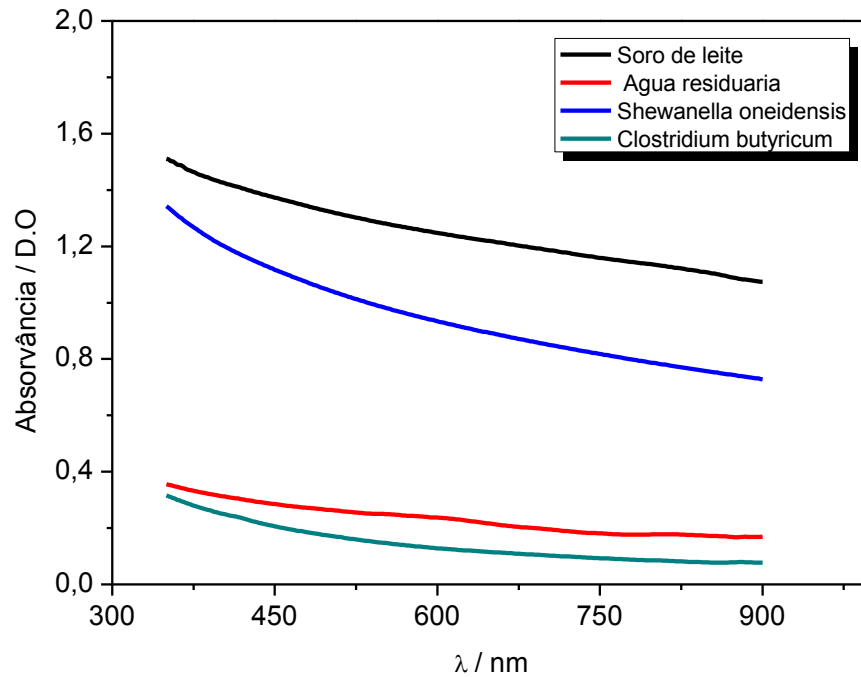


Figura 5.10 – Varredura espectral para o soro de leite e água residuária antes (enriquecido) e depois do tempo de operação em CCM cultivada com cultura pura de: *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*.

5.4. PRODUÇÃO DE BIOELETRICIDADE X TRATAMENTO DE EFLUENTE EM CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA (CCM)

A Célula a Combustível Microbiana como tecnologia ambiental produz bioeletricidade simultaneamente em que realiza o tratamento do efluente empregado como substrato (RABAEY, 2010; ZHANG et al., 2015). A produção de energia elétrica é avaliada com a utilização da polarização eletroquímica que resulta principalmente nos parâmetros $OCP_{máx}$, $p_{máx}$, R_{int} , e $i_{máx}$, porém o $i_{máx}$ foi utilizado para calcular a eficiência coulômbica (EC).

A Tabela 5.10 apresenta os principais parâmetros eletroquímicos avaliados e a EC para CCM alimentada com os efluentes vinhaça e lácteo, de acordo com o respectivo inóculo. Os resultados da Tabela 5.10 mostram que a $OCP_{máx}$, potência gerada, R_{int} e EC em CCM foram todos diferentes entre as cepas bacterianas utilizadas, estes resultados podem estar principalmente

interligados à adaptação metabólica de cada bactéria em cada efluente e os mecanismos de transferência de elétrons para aceptor de carbono vítreo.

Dentre estes resultados, nota-se na Tabela 5.10, que o protótipo da CCM em estudo atingiu principalmente os melhores resultados para todas as variáveis quando foi utilizado a bactéria *Clostridium butyricum* tanto para vinhaça quanto para o efluente lácteo, porém na geração de potência, R_{int} e EC destaca-se esta bactéria quando crescida no efluente lácteo.

Além disso, pode ser notado fatores de correlação entre os parâmetros eletroquímicos avaliados, assim como (TABELA 5.10):

(1) Verifica-se que a potência gerada depende mais da R_{int} do que OCP, mesmo que seja necessário um valor significativo de OCP, por exemplo a bactéria *Clostridium butyricum* em efluente lácteo comparada com o co-cultura em vinhaça, alcançou o maior valor de densidade de potência, aproximadamente o dobro, mesmo apresentando o OCP_{max} menor, no entanto a diferença da R_{int} foi aproximadamente o dobro. Este comportamento também é observado quando se compara os dois cultivos puros de *Shewanella oneidensis*, onde que OCP_{max} de 0,50 V em vinhaça foi maior do que em efluente, o qual foi de 0,43 V, porém a maior densidade potência relatada foi de $0,98 \text{ W m}^{-3}$ para o efluente soro de leite com R_{int} de $16,6 \Omega$ e $0,65 \text{ W m}^{-3}$ para vinhaça com R_{int} de $34,9 \Omega$.

(2) Observa-se para a CCM alimentada com vinhaça, que a co-cultura foi a que teve maior perda de potência com índice de 65 % ao longo do período de operação, sendo aproximadamente duas e quatro vezes maiores do que as perdas de potências das respectivas culturas puras de *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*. E ainda foi relatado que os cultivos puros em vinhaça tiveram os menores valores para perdas na potência.

(3) Para CCM alimentada com efluente lácteo nota-se que foram obtidas as menores R_{int} dos sistemas em estudo, este fato pode ser característico da composição do efluente e desenvolvimento do biofilme. Por exemplo, a CCM com inoculo de *Shewanella oneidensis* teve R_{int} de $16,6 \Omega$ e $34,9 \Omega$ para os efluentes soro de leite e vinhaça. Esta diferença da R_{int} pode ser caracterizada pelo o efluente lácteo ter maior concentração de açúcar redutor do que a vinhaça, sendo uma fonte carbono nobre para o crescimento microbiano, a concentração foi de $49,4 \text{ mg L}^{-1}$ e $5,3 \text{ mg L}^{-1}$, embora a condutividade do sistema foi relatada bem próxima, $20,1 \text{ mS cm}^{-1}$ e $21,8$

mS cm⁻¹, por consequência do crescimento bacteriano a densidade de potência gerada foi de 0,98 W m⁻³ e 0,65 W m⁻³.

Tabela 5.10 – Parâmetros bioeletroquímicos de CCM em diferentes inoculos em substrato de vinhaça e efluente lácteo.

CCM (inóculo)	OCP _{max} (V)	p_{max} (W m ⁻³)	Perdas da Potência (%)	R _{int} (Ω)	EC (%)
Efluente vinhaça					
<i>Shewanella putrafaciens</i>	0,39	0,25	27	61,2	1,1
<i>Shewanella oneidensis</i>	0,50	0,65	35	34,9	3,9
<i>Clostridium butyricum</i>	0,66	0,93	16	41,1	4,9
Co-cultura (<i>C.b. e S.o.</i>)	0,75	1,05	65	44,3	5,9
Efluente lácteo					
Soro de leite / <i>Shewanella oneidensis</i>	0,43	0,98	78	16,6	3,2
Água residuária / <i>Clostridium butyricum</i>	0,69	2,02	68	21,1	13,0

Para uma análise mais completa de uma CCM aplicada como tecnologia ambiental é necessário avaliar a performance do sistema comparando-se os parâmetros eletroquímicos e ambientais. Os quatros principais parâmetros ambientais avaliados foi organizado na Tabela 5.11 para confrontar com os parâmetros eletroquímicos da Tabela 5.10.

Na Tabela 5.11, verifica-se que o melhor desempenho foi da co-cultura em vinhaça em que atingiu valores de 57 % e 64 % para remoção de DQO e cor e manteve o pH próximo de 7,0. De qualquer forma outras bactérias tiveram bom também resultados também, como *Shewanella oneidensis* em vinhaça, *Clostridium butyricum* e efluente lácteo.

Em relação a cada parâmetro avaliado, pode ser notado que a condutividade em todas CCMs foi aumentada dos valores iniciais dos efluentes 21,8 mS cm⁻¹ para vinhaça; 20,1 mS cm⁻¹ para o soro de leite e 7,09 mS cm⁻¹ para água residuária. O pH manteve-se próximo de 7,0 com

exceção para *Shewanella putrefaciens* em vinhaça e *Shewanella oneidensis* nos efluente lácteos. E ainda relata-se um melhor índice de remoção de cor para o efluente vinhaça.

Além disso, foi constatado que a eficiência da remoção de DQO e de cor é dependente da bactéria utilizada, este fato pode ser notado quando compara a CCM alimentada com vinhaça inoculada com *Clostridium butyricum* e *Shewanella oneidensis*, assim alcançando os valores de 22 e 42 para η DQO e 70 % e 62 % para descoloração. E quando foi usado uma co-cultura destes mesmos microrganismos observa-se um aumento no potencial oxidativo da CCM, que resultou em 57 % de remoção de DQO.

Alguns resultados atingidos para CCM chegaram a serem equiparáveis a estudos em sistemas convencionais para tratar vinhaça, por exemplo, Campos et al. (2014) conseguiram remover 66 % de DQO e 90 % de remoção de cor em um sistema com três fases de tratamento, composto por filtração, tratamento químico e biológico, nesta dissertação, a CCM que possui apenas uma fase de tratamento alcançou os 57 % e 64 % de remoção de DQO e cor com a co-cultura.

Syaichurrozi e Budiyono (2013), utilizaram biodigestores anaeróbicos e chegaram ao valor mínimo de 31 % e máximo de 38 % para a remoção de DQO, para a CCM estes valores foram de 22 % e 57 %, concretizando a CCM como um sistema de tratamento de efluentes.

Quanto à relação entre as Tabelas 5.10 e 5.11, observa-se para o efluente vinhaça que a co-cultura obteve os maiores OCP e densidade de potência que resultaram na maior remoção de DQO (57 %) e uma alta descoloração de 62 % com uma EC de 5,9 %, por outro lado a bactéria *Clostridium butyricum*, que teve uma boa performance eletroquímica, removeu 70 % da cor e apenas 22 % de DQO.

No entanto, a CCM alimentada com soro de leite, portanto com alta carga orgânica, sofreu entupimento da membrana Nafion, por colonização local, resultando no baixo valor de pH (3,5) (TABELA 5.11) e altas perdas na potência de 78 % (TABELA 5.10). No caso da água residuária com inóculo de *Clostridium butyricum*, o protótipo alcançou os melhores valores, com o pH mantendo o valor perto da neutralidade acarretando na maior potência gerada de $2,02 \text{ W m}^{-3}$ e EC de 13,0 % (TABELA 5.10), e para remoção de DQO de 74 % (TABELA 5.11).

Tabela 5.11 – Parâmetros Ambientais para tratamento dos efluentes em CCM inoculadas com diferentes inoculos.

CCM (inóculo)	η DQO(%)	Condutividade (mS cm ⁻¹)	Descoloração(%)	pH
Efluente vinhaça				
<i>Shewanella putrefaciens</i>	28	*	48	4,4 ± 0,2
<i>Clostridium butyricum</i>	22	22,6 ± 0,6	70	6,7 ± 0,3
<i>Shewanella oneidensis</i>	42	22,9 ± 0,6	62	6,9 ± 0,3
Co-cultura	57	24,9 ± 0,6	58	6,9 ± 0,4
Efluente lácteo				
Soro de leite / <i>Shewanella oneidensis</i>	43	26,5 ± 0,7	25	3,5 ± 0,2
Água residuária / <i>Clostridium butyricum</i>	74	8,9 ± 0,2	46	6,6 ± 0,3

*Não foi avaliado

5.5. ANÁLISE DO BIOFILME POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Algumas bactérias crescem e formam uma estrutura de material polimérico e aderidas a outras células bacterianas, esta estrutura é denominada biofilme. O biofilme é principal mecanismo de defesa de certas espécies bacterianas, as quais possuem diversos interesses, como, industriais, médicos e ambientais. No biofilme formado a espécie bacteriana cria-se um ambiente onde as células ficam aderidas umas as outras, enquanto materiais poliméricos excretados formam um encapsulamento. Este encapsulamento permite a bactéria se proteger de condições ambientais adversas, captar mais nutrientes por área e beneficiar com associações em comunidade.

A associação de bactérias que formam biofilme tem a capacidade de crescer e desenvolver em efluentes, com isso consumir a matéria orgânica e outros elementos para seu crescimento e por fim realizar o tratamento do efluente.

O desenvolvimento do biofilme pode ser analisado por Microscopia de Força Atômica, onde com uma alta resolução o microscópio utiliza uma nano ponteira para fazer uma varredura da superfície, em três diferentes modos: contato, não contato e contato intermitente. Na varredura do modo intermitente (*Tapping mode*), que foi empregado neste estudo, aplica-se uma curva de força/distância pontualmente, que avalia as interações da superfície construindo um mapeamento. E uma das vantagens da técnica MFA é realizar as análises com condições integras da amostra (LIM et al., 2008; LIU e WANG, 2010; ALSTEENS et al., 2013).

A Figura 5.11, mostra a imagem de força de pico em MFA da co-cultura (*Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum*) após o período de operação em CCM alimentada com vinhaça enriquecida.

Observa-se na Figura 5.11, que o biofilme formado tem a presença de bactérias aderidas entre as extremidades laterais da membrana, e que possuem formas de bastonetes longos e curtos. Destaque-se uma variação dos picos de força em -697,4 pN a 697,3 pN, e que as maiores forças de pico mensuradas de aproximadamente 697,3 pN localiza-se nas extremidades da membrana que não estão em contato, ou seja, a parte exposta da membrana teve maiores forças de interações.

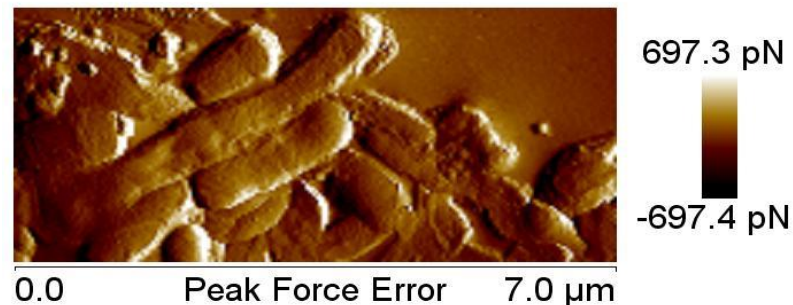


Figura 5.11 – Imagem de Microscopia de Força Atômica do Biofilme de *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum* após ser cultivada em CCM com vinhaça, usando o modo Peak Force QMN.

Em consequência da identificação de poucas células bacterianas na imagem anterior, a varredura para construção da imagem de topografia foi realizada em outra área da mesma amostra. Assim, a Figura 5.12, apresenta a imagem da topografia (altura) em outra área da amostra de co-cultura em CCM alimentada com vinhaça enriquecida pós o período de incubação.

Nota-se na Figura 5.12, que o biofilme formado teve alta densidade celular com estrutura bem formada do tipo bastonete curto e que as bactérias estão aderidas entre as membranas nas partes laterais, nas extremidades polares e em empilhamento. E com altura máxima de 288,4 nm e com comprimento variando entre 1 μm a 1,3 μm .

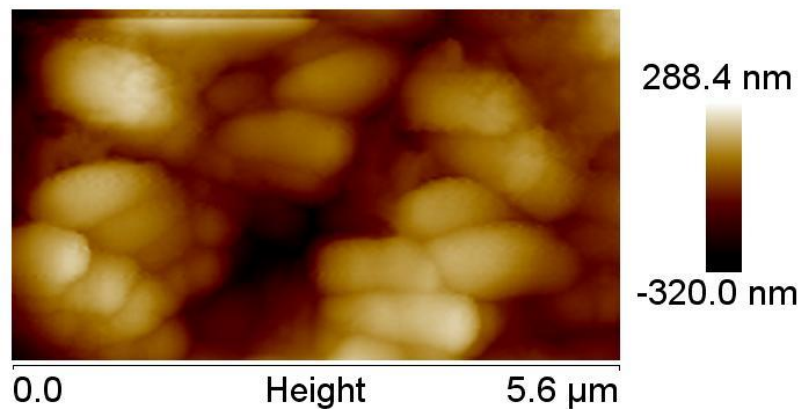


Figura 5.12 – Imagem de topografia em Microscopia de Força Atômica do Biofilme de *Shewanella oneidensis* e *Clostridium butyricum* após ser cultivada em CCM com vinhaça enriquecida após o período de incubação fixada em lâminas de vidro.

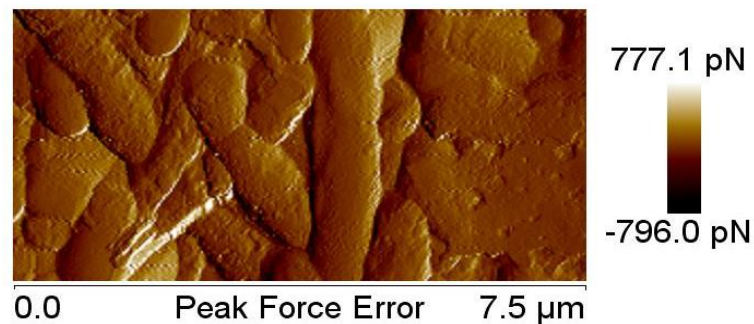
A análise de microscopia de força atômica para CCM alimentada de efluente lácteo foi realizada com inóculo de *Shewanella oneidensis*, assim, construindo uma imagem de força de pico (FIGURA 5.13 – A) e uma imagem de topografia/altura (FIGURA 5.13 – B) na mesma área da amostra.

Observa-se que as células bacterianas não apresentaram uma forma estrutural bem definida (FIGURA 5.13 – A e B) como no caso das amostras com vinhaça, da mesma forma para vinhaça

as células bacterianas presentes na Figura 5.13 – A, mostram a variação da força de pico em 777,1 pN a -796 pN, e que os maiores picos de forças estão nas extremidades expostas com um máximo de 777, 1 pN e podendo chegar em alguns locais das extremidades em a aproximadamente 600 pN, estes maiores valores mostram que estes locais tiveram as maiores forças de interações.

E na Figura de topografia (FIGURA 5.13- B), as células bacterianas apresentaram uma variação de altura maior do que apresentada para vinhaça, e chegando à escala de micrometros e como as células não indicaram um padrão do comprimento, logo não foi analisado. Portanto, foi realizado uma visualização desta imagem em 3D, com intuito de uma melhor análise.

(A)



(B)

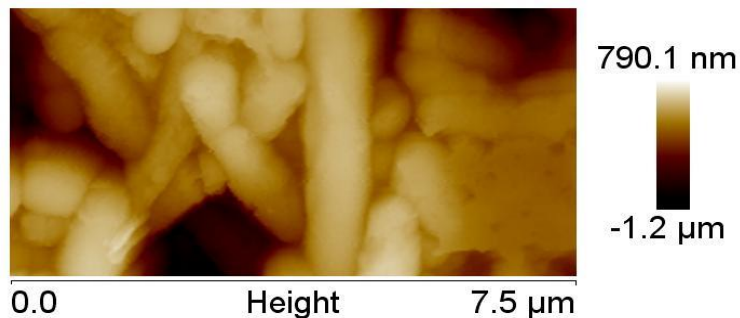


Figura 5.13 – Imagem em Microscopia de Força Atômica do Biofilme de *Shewanella oneidensis* após ser cultivada em CCM com soro de leite enriquecida, (A) imagem de força, (B) imagem da topografia.

A Figura 5.14, exibi a visualização 3D da imagem topográfica para amostra de efluente lácteo inoculada com *Shewanella oneidensis*, logo se percebe que o biofilme formado possuem células bacterianas com diferentes alturas e com diferentes tamanhos de comprimento, e destaca-se uma célula em fase de alongamento. No entanto, é necessário realizar mais experimentos para avaliar as mudanças nas ultraestruturas quando são submetidas as condições de uma célula a Combustível Microbiana (CCM).

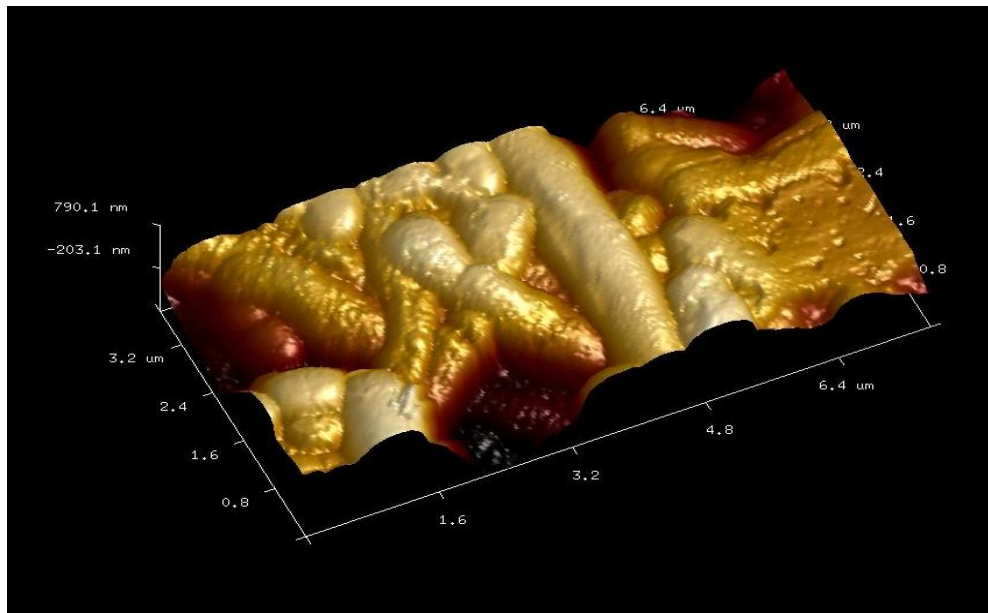


Figura 5.14 – Imagem em 3D de topografia em Microscopia de Força Atômica do Biofilme de *Shewanella oneidensis* após ser cultivada em CCM com efluente lácteo enriquecida.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta dissertação foi verificado que o protótipo da Célula a Combustível Microbiana (CCM) ao ar, alimentado com efluentes industriais pode gerar energia elétrica direta, simultaneamente com o tratamento do efluente empregado como substrato.

Em termos de geração de energia elétrica foi constatado que o sistema mais eficiente foi o água residuária/*Clostridium butyricum*, com os valores de $p_{\text{máx}}$, $2,02 \text{ W m}^{-3}$, $\text{OCP}_{\text{máx}}$ de $0,69 \text{ V}$ e EC de $13,0 \%$ e os ensaios com diferentes inoculos para a vinhaça mostrou que o emprego da co-cultura aumentou a potência gerada em comparação com a cultura pura.

Quanto aos parâmetros ambientais testados, a CCM removeu DQO mais eficientemente nos sistemas vinhaça/co-cultura com 57% e água residuária/*Clostridium butyricum* com 74% . E também foi verificado que todos os sistemas aumentaram a condutividade dos efluentes pós tratamento.

Para remover a cor dos efluentes as CCMs atingiram os melhores valores para o efluente vinhaça, e dentre as bactérias empregadas, a *Clostridium butyricum* teve melhor índice de descoloração (70%).

Enfim, a CCM pode atuar como tecnologia ambiental para recuperar energia química dos efluentes e ainda realizar o tratamento eficientemente dos efluentes, removendo a DQO dos mesmos.

Entretanto, existem muitas variáveis envolvendo as interações eletroquímicas do biofilme com a superfície do eletrodo, pois estes sistemas dependem das interações das bactérias com a mistura complexa que é o efluente, e também das reações eletroquímicas catódicas, que não foram objeto de estudo neste trabalho. Portanto, para entender perfeitamente o mecanismo de geração de eletricidade e sua eficiência em CCM ainda é necessário estudos detalhados destes sistemas.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Selecionar culturas bactérias eletrogeradoras em meio de vinhça, que não necessitam de de complementação nutricional para realizar metabolismo;
- Selecionar culturas bactérias eletrogeradoras em meio de vinhça que se desenvolvam em temperautras abaixo de 30 °C;
- Realizar ensaios de geração de corrente e potência em células microbianas alimentadas com co-substratos oriundos de efluentes industriais;
- Fazer caracterização do biofilme por meio de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura;
- Comparar outros protocolos de polarização eletroquímica;
- Avaliar a resistência interna da célula por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Determinar as condições ótimas para imobilização das bacterias a fim de indentificar a presença de ultraestruturas na superfície destas bactérias, pela técnica da microscopia de força atômica;
- Estudar arranjos arquitetônicos para escalagem de potência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELAJA, O.; KESHAVARS, T.; KYAZZE, G. The effect of salinity, redox mediators and temperature on anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in microbial fuel cells. *Journal Hazardous Materials*, v. 283, p. 211 – 217, 2015.

ALLEN, R. M.; BENNETTO, H. P. Microbial fuel-cells: electricity production from carbohydrates. *Appl. Biochemistry Biotechnology*, v. 39, n. 40, p.27–40, 1993.

ALSTEENS, D.; TRABELSI, H.; PATRICE SOUMILLION, P.; DUFRÊNE, Y. F. Multiparametric atomic force microscopy imaging of single bacteriophages extruding from living bacteria. *Nature communications*, v. 4, n. 2926, Disponível em www.nature.com/naturecommunications, 2013. Acesso em novembro de 2015.

BAIRD, C.; CANN, M. *Química Ambiental*. 4 ed. Tradução: Marco Tadeu Grassi. Porto Alegre: Bookman, 2011, 844p.

BARTA, Z.; RECZEY, K.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of stillage treatment with anaerobic digestion in a softwood-to-ethanol process. *Biotechnology for Biofuels*. V. 3, p. 21 – 32, 2010.

BOND, D. R.; LOVLEY, D. R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environmental Microbiology*, v.69, p.1548–55, 2003.

BOND, D. R.; HOLMES, D. E.; TENDER, L. M.; LOVLEY, D. R. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*, v. 295, n. 483, p. 5, 2002.

BOURDAKOS, N.; MARSILI, E.; MAHADEVAN, R. A Defined Co-Culture of *Geobacter Sulfurreducens* and *Escherichia Coli* in a Membrane-Less Microbial Fuel Cell. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 111, n. 4, p. 709 – 718, 2014.

CAMPOS, C. R.; MESQUITA, V. A.; SILVA, C. F.; SCHWAN; R. F. Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. *Waste Management*. v. 34, p. 2036 – 2046, 2014.

CARMONA-MARTINEZ, A. A; HARNISCH, F.; FITZGERALD, L. A.; BIFFINGER, J. C.; RINGEISEN, B. R.; SCHRÖDER, U. Cyclic voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants. *Bioelectrochemistry*, v.81, p. 74 – 80, 2011.

CARMONA-MARTÍNEZ, A. A.; HARNISCH, F.; KUHLCHE, U.; NEU, T. R.; SCHRÖDER, U. Electron transfer and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* as function of anode potential. *Bioelectrochemistry*, v. 93, p. 23 – 29, 2013.

CHAUDHURI, S. K.; LOVLEY, D. R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, v.21, p.1229 – 1232, 2003.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management.*, v. 33, p. 2752 – 2761, 2013.

COHEN, B. The Bacterial Culture as an Electrical Half-Cell. *Journal of Bacteriology*, v. 21, p. 18–19, 1931.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de -açúcar. Brasília, v 2, p 1-33, 2015.

DAVID, C.; ARIVAZHAGAN, M.; BALAMURALI, M. N.; SHANMUGARAJAN, D. Decolorization of Distillery Spent Wash Using Biopolymer Synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Tannery Effluent. *BioMed Research International*, acesso em 25 de novembro de 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/195879>, p. 1-9, 2015.

DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Biofuel cells—recent advances and applications. *BiosensorBioelectronic*, v. 22, p. 1224 – 1235, 2007.

DELDUCA, M., G.; FRISCOE, J., M.; ZURILLA, R., W. Developments in Industrial Microbiology. *American Institute of Biological Sciences*, v. 4, p. 81 – 84, 1963.

ELAKKIYA, E.; MATHESWARAN, M. Comparison of anodic metabolisms in bioelectricity production during treatment of dairy wastewater in Microbial Fuel Cell. *Bioresource Technology*, v. 136, p. 407 – 412, 2013.

ELMEKAWY, A.; SRIKANTH, S.; BAJRACHARYA, S.; HEGAB, H. M.; NIGAM, P. S.; SINGH, A.; MOHAN, S. V.; PANT, D. Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): The synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment. *Food Research International*, v. 73, p. 2013 – 225, 2015.

FERREIRA, L. F. R.; .AGUIAR, M. M.; MESSIAS, G. T.; POMPEU, G. B.; LOPEZ, A. M. Q., SILVA, D. P.; MONTEIRO, R. T. Evaluation of sugar-canevinasse treated with *Pleurotussajorcaju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p.13 2– 137, 2011.

FUESS; L .T., GARCIA; M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impactsof fertigation. *Journal of Environmental Management.*, v. 145, p. 210 – 229, 2014.

GIL, G. C.; CHANG, I. S.; KIM, B. H.; KIM, M.; JANG, J. Y.; PARK, H. S. Operational parameters affecting the performance of a mediatorless microbial fuel cell. *Biosens Bioelectron*, v.18, p. 327-334, 2003.

GORBY, Y. A.; YANINA, S.; MCLEAN, J. S.; ROSSO, K. M.; MOYLES, D.; DOHNALKOVA, A.; BEVERIDGE, T. J.; CHANG, I. S.; KIM, B. H.; KIM, K. S.; et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sciences U. S. A.*, v. 103, n. 30, p. 11358 – 11363, 2006.

HA, P. T.; LEE, T. K.; RITTMANN, B. E.; PARK, J.; CHANG, I. S. Treatment of Alcohol Distillery WasteWater Using Bacteroidetes – Dominant Thermophilic Microbial Fuel Cell. *Environmental: Science & Technology*, v.46, p.3022 – 3030, 2012.

HUSSAIN, M. M. Self-powered functional device using on-chip power generation. *US Patent*, US20120019214A1, 2012.

IEROPOULOS, I. A.; GREENMAN, J.; MELHUIH, C.; HART, J. Comparative study of three types of microbial fuel cell, *Enzyme Microb. Tech.*, v. 37, p. 238 – 245, 2005.

INTANOO, P.; SUTTIKUL, T.; LEETHOCHAWALIT, M.; GULARI, E.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol wastewater with added fermentation residue by an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) under thermophilic operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 9611 – 9620, 2014.

JANICEK, A.; FANA, Y.; LIUA, H. Design of microbial fuel cells for practical application: a review and analysis of scale-up studies. *Biofuel*, n. 5, v. 1, p. 79 – 92, 2014.

JAYASHREE, C.; ARULAZHAGAN, P.; KUMAR, S. A.; KALIAPPAN, S.; YEON, I. T. Bioelectricity generation from coconut husk retting wastewater in fed batch operation microbial fuel cell by phenol degrading microorganism. *Biomass and Bioenergy*. v. 69, p. 249 – 254, 2014.

JIA, J.; TANG, Y.; LIU, B.; WU, D.; REN, N.; XING, D. Electricity generation from food wastes and microbial community structure in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 94 – 99, 2013.

KAHRAMAN, S.; YESILADA, O. Decolorization and Bioremediation of Molasses Wastewater by White-Rot Fungi in a Semi-Solid-State Condition. *Folia Microbiol.*, v. 48, n. 4, p. 525 – 528, 2003.

KARADAG, D.; KOROGLU, O. E.; OZKAYA, B.; CAKMAKCI, M. A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 262 – 271, 2015.

KARRA, U.; TROOP, E.; CURTIS, M.; SCHEIBLE, K.; TENAGLIER, C.; PATEL, N.; LI, B. Performance of plug flow microbial fuel cell (PFMFC) and complete mixing microbial fuel cell (CMMFC) for wastewater treatment and power generation. *Internacional Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 5383 – 5388, 2013.

KARUBE, I.; MATASUNGA, T.; SUZUKI, S.; TSURU, S. Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*. *Biochimica et Biophysica Acta.*, v.24, p.2 338–343, 1976.

KARUBE, I.; MATSUNAGA, T.; TSURU, S.; SUZUKI, S. Biochemical cells utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*. *Biotechnology and Bioengineering.*, v. 19, n. 11, p. 1727–1733, 1977.

KELLY, P. T.; HE, Z. Understanding the application niche of microbial fuel cells in a cheese wastewater treatment process. *Bioresource Technology*, v. 157, p. 154-160, 2014.

KIM, B. H.; KIM, H. J.; HYUN, M. S.; PARK, D. H. Direct electrode reaction of Fe (III) reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.9, p. 127 – 131, 1999a.

KIM, B. H.; PARK, D. H.; SHIN, P. K.; CHANG, I. S.; KIM, H. J. Mediator-less biofuel cell, US Patent 5976719, n. 2, 1999.

KIM, H. J.; PARK, H. S.; HYUN, M. S.; CHANG, I. S.; KIM, M.; KIM, B. H. A mediatorless microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*, *Enzyme Microb. Tech.*, v. 30, p. 45–52, 2002.

KIM, H.; KIM, B.; YU, J. Power generation response to readily biodegradable COD in single-chamber microbial fuel cells. *Bioresource Technology.*, v. 186, p. 136–140, 2015.

KIM, I. S.; CHAE, K-J.; CHOI, M-J.; VERSTRAETE, W. Microbial Fuel Cells: Recent Advances, Bacterial Communities and Application Beyond Electricity Generation. *Environ. Eng. Res.*, v. 13, n. 2, p. 51 – 65, 2008.

KRZYWONOS, M.; SERUGA, P. Decolorization of Sugar Beet Molasses Vinasse, a High-Strength Distillery Wastewater, by Lactic Acid Bacteria. *Pol. J. Environ. Stud.*, v. 21, n. 4, p. 943 – 948, 2012.

LAZARO, C. Z.; PERNA, V.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M. B. A.Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 6407 – 6418, 2014.

LEE, D. J.; LEE, C. Y.; CHANG, J. S. Treatment and electricity harvesting from sulfate/sulfite-containing wastewater using microbial fuel cell with enriched sulfate-reducing mixed culture. *Journal Hazardous Materials.*, v. 43, p. 67 – 72, 2012.

LEE, D-J.; LEE, C-Y.; CHANG, J-S. Treatment and electricity harvesting from sulfate/sulfide-containing wastewaters using microbial fuel cell with enriched sulfate-reducing mixed culture. *Journal of Hazardous Materials*, v. 243, p. 67– 72, 2012.

LI, X. M.; CHENGB, K.Y.; SELVAMA, A.; WONGA, J. W. C. Bioelectricity production from acidic food waste leachate using microbial fuel cells: Effect of microbial inocula. *Process Biochemistry*. v. 48, p. 283-288, 2013.

LIM, J.; LEE, K- M.; KIM, S. H.; NAM, S-W.; OH, Y. J.; YUN, H. S.; JO, W.; OH, S.; KIM, S- H.; PARK, S. Nanoscale Characterization of Escherichia coli Biofilm Formed under Laminar Flow Using Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). *Bull Korean Chem. Soc.*, v. 29, n. 11, 2008.

LIU H.; CHENG S. A; LOGAN, B. E. Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ SciTechnol*.v. 39, p. 658 – 662, 2005.

LIU, S.; WANG, Y. Application of AFM in Microbiology: A Review. *Scanning*, v. 32, p. 61 – 73, 2010.

LOGAN, B. E. Exoeletrogenic bacteria that power microbial fuel cell. *Nature Reviews Microbiology*., v. 7, p. 375 – 381, 2009.

LOGAN, B. E. *Microbial Fuel Cells*. Wiley-Interscience: New York, 2008.

LOGAN, B. E.; Extracting hydrogen and electricity from renewable resources A roadmap for establishing sustainable processes. *Environmental Science &Technology*., p.161-167, 2004.

LOGAN, B. E.; HAMELERS, B.; ROZENDAL, R.; SCHRÖDER, U.; KELLER, J.; FREGUIA, S.; AELTERMAN, P.; VERSTRAETE, W.; RABAEY, R. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science & Technology*., v. 40, n. 17, p. 5181-5192, 2006.

LOVLEY, D.R.; COATES , J.D.; BLUNT-HARRIS, E.L.; PHILLIPS, E.J.P.; WOODWARD, J.C. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, v. 382, p.445–448, 1996.

MARASSI, R. J.; SANTOS, J. M.; TEODORO, C. E. S.; SANTOS, F. S.; SILVA, G. C. Correlation between spectroscopy absorbance and biofilm to anode microbial fuel cell. Resumos In: PRIME 2012, 222nd Meeting of the Eelectrochemical Society, Honolulu, Hawaii USA, October 7th through October 12th 2012.

MARASSI, R.J.; TEODORO, C.E.S.; SANTOS, F.S.; SILVA, G.C. Behaviour of Clostridium butyricum in substrate to Microbial Fuel Cell - MFC. *4th International Microbial Fuel Cell Conference*. Cairns-Austrália. De 1 a 4 de setembro de 2013a.

MARASSI, R.J.; TEODORO, C.E.S.; SANTOS, F.S.; SILVA, G.C. Open circuit potential (OCP) of carbon vitreous/*Shewanella putrefaciens* interface in vinasse solutions. *4th International Microbial Fuel Cell Conference*. Cairns-Austrália. 1 a 4 de setembro de 2013b.

MARINHO, J. F. U.; CORREIA, J. E.; MARCATO, A. C. C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 110, p. 239 – 245, 2014.

MIN, B.; CHENG, S.; LOGAN, B.E. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Res.*, v. 39, p.1675 – 1686, 2005.

MOHANAKRISHNA, G.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. Bio-electrochemical treatment of distillery wastewater in microbial fuel cell facilitating decolorization and desalination along with power generation. *Journal of Hazardous Materials*. v. 177, p. 487 – 494, 2010.

MOKHTARIAN, N.; RAHIMNEJAD, M.; NAJAFPOUR, G. D.; DAUD, W. R. W.; GHOREYSHI, A. A. Effect of different substrate on performance of microbial fuel cell. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 14, p. 3363 – 3369, 2012.

MOTA, V. T.; SANTOS, F. S.; AMARAL, M. C. S.. Two-stage anaerobic membrane bioreactor for the treatment of sugarcane vinasse: Assessment on biological activity and filtration performance. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 494 – 503, 2013.

OLIVEIRA, B.G.; CARVALHO, J. L. N.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Greenhouse gas emissions from sugarcane vinasse transportation by open channel: a case study in Brazil. *Journal of Cleaner Production*, v. 94, p. 102 – 107, 2015.

OLIVEIRA, V. B.; SIMÕES, M.; MELO, L. F.; PINTO, A. M. F. R. Overview on the developments of microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal*, v. 73, p. 53 – 64, 2013.

PANDIT, S.; KHILARI, S.; ROY, PRADHAN, D. S.; DAS, D. Improvement of power generation using *Shewanella putrefaciens* mediated bioanode in a single chambered microbial fuel cell: Effect of different anodic operating conditions. *Bioresource Technology*, v. 166, p. 451 – 457, 2014.

PANT, D.; VAN BOAGAERT, G.; DIELS, L.; VANBROEKHOVEN, K. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1533 – 1543, 2010.

PARK, D. H.; ZEIKUS, J. G. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Appl. Environ. Microb.*, v. 66, p. 1292 – 1297, 2000.

POTTER, M. C. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Royal Society (Formerly Proceedings of the Royal Society)*, v. 84, p. 260 – 276, 1911.

RABAEY, K.; ANGENET, L.; SCHÖDER, U.; KELLER, J. *Bioelectrochemical Systems*. Londres: IWA, 2010, 488p.

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

RAGHAVULU, S. V.; MODESTRA, J. A.; AMULYA, K.; REDDY, C. N.; MOHAN, S. V. Relative effect of bioaugmentation with electrochemically active and non-active bacteria on bioelectrogenesis in microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 696 – 703, 2013.

REIMERS, C. E.; GIRGUIS, P.; STECHER, H. A.; TENDER, L. M.; RYCKELYNCK, WHALING, P. Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology*, v. 4, p. 123–136, 2006.

ROSENBAUM, M.; ZHAO, F.; QUAAS, M.; WULFF, H.; SHÖREDER, U.; SCHOLZ, F. Evaluation of catalytic properties of tungsten carbide for the anode of microbial fuel cells. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 74, p. 261–269, 2007.

ROY, J. N.; BABANOVA, S.; GARCIA, K. E. ; CORNEJO, J.; ISTA, L. K.; ATANASSOV, P. Catalytic biofilm formation by *Shewanella oneidensis* MR-1 and anode characterization by expanded uncertainty. *Electrochimica Acta*, v. 126, p. 3 – 10, 2014.

SAKDARONNARONG, C.; ITTITANAKAN, A.; TANUBUMRUNGSUK, W.; CHAITHONG, S.; THANOSAWAN, S.; SINBUATHONG, N.; JERAPUTRA, C. Potencial of Liginin as a mediator in combined systems for bomethane and electricity production from ethanol stillage wastewater. *Renawable Energy*, v. 76, p. 242 – 248, 2015.

SANTANA, V. S.; MACHADO, N. R. C. F. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. *Catalysis Today*, v. 133-135, p. 606-610, 2008.

SANTOS, J. M.; MARASSI, R. J.; TEODORO, C. E. S.; SANTOS, F. S.; SILVA, G. C. Sugarcane waste as substrate for microbial fuelcell. Resumos In: PRIME 2012, 222nd Meeting of the Electrochemical Society, Honolulu, Hawaii USA, October 7th through October 12th 2012.

SATO, K.; SAITO, T. A Newly Developed Wastewater Treatment by Using Solidification Reaction of Milk Fats and Proteins through Ozonation. *Chemical Engineering Transactions*, v. 32, p. 1 - 6, 2013.

SCHRÖDER, U., Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys. Chem. Chem. Phys.* v. 9, p. 2619–2629, 2007.

SCIARRIA, T.P., MERLINO, G.; SCAGLIA, B.,D'EPIFANIO, A.,MECHERI, B.,BORIN, S.,LICOCCIA, S.,ADANI, F. Electricity generation using white and red wine lees in air cathode microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*. v. 274, p. 393 – 399, 2015.

SELEMBO, P.A.; PEREZ, J.M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E. International Journal of *Hydrogen Energy*.v. 34, p. 5373 – 5381, 2009.

SEO, Y. H.; YEO-MYEONG YUN, Y. M.; LEE, H. HAN, J. I. Pretreatment of cheese whey for hydrogen production using a simple hydrodynamic cavitation system under alkaline condition. *Fuel*, v. 150, p. 202 – 207, 2015.

SEVDA, S.; DOMINGUEZ-BENETTON, X.; VANBROEKHOVEN, K.; WEVER, H.; SREEKRISHNAN, T. R.; PANT, D. High strength wastewater treatment accompanied by power generation using air cathode microbial fuel cell. *Applied Energy*, v. 105, p. 194 – 206, 2013.

SILES, J.A.; GARCÍA-GARCÍA, I.; MARTÍN, A.; MARTÍN, M.A. Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. *Journal of Hazardous Materials*, v.188, p. 247–253, 2011.

SILVA, G. C.; AZEVEDO, L. S.; TEODORO, C. E. S.; SANTOS, F. S. Isolation of electrochemically active bacteria from Municipal sewage sludge to use in microbial fuel cell, *3rd Microbial Fuel Cells Conference*, Leeuwarden Holanda, 06 a 08 de junho de 2011.

SILVA, G. C.; SANTOS, F. S.; TEODORO, C. E. S.; FARIA, J. S. Microbial fuel cell: A prospective technology for power production from wastewater *The 6th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry*, Foz do Iguaçu, Brasil, 16 a 19 de 2008.

SOUZA, W.; ROCHA, G. M.; MIRANDA, K.; BISCH, P. M.; WEISSMULLER, G. Atomic Force Microscopy as a tool for the study the ultrastructure of Trypanosomatid parasites. *Atomic Force Microscopy in Biomedical Research*, v. 739, p. 211 – 221, 2011.

STANDARD METHODS. For the examination of Water and Wastewater. 22 ed. Washington: American Public Health Association, 2012.

SUN, J., LI, W., LI, Y., HU, Y., ZHANG, Y. Redox mediator enhanced simultaneous decolorization of azo Dye and bioelectricity generation in air-cathode microbial fuel cell. *Bioresource Technology*. v. 142, p. 407 – 414, 2013.

SYAICHURROZI, I.; BUDIYONO, S. S. Predicting kinetic model of biogas production and biodegradability organic materials: Biogas production from vinasse at variation of COD/N ratio. *Bioresource Technology*, v. 149, p. 390 – 397, 2013.

TAO, Q.; ZHOU, S.; LUO, J.; YUAN, J. Nutrient removal and electricity production from wastewater using microbial fuel cell technique. *Desalination*, v. 365, p. 92 – 98, 2015.

TAPIA-TUSSELL, R.; PÉREZ-BRITO, D.; TORRES-CALZADA, C.; CORTÉS-VELÁZQUEZ, A.; ALZATE-GAVIRIA, L.; CHABLÉ-VILLACÍS, R.; SOLÍS-PEREIRA, S. Laccase Gene Expression and Vinasse Biodegradation by *Trametes hirsuta* Strain Bm-2. *Molecules*, v. 20, p. 15147 – 15157, 2015.

TOKUJI, I.; KENJI, K. Vioelectrocatalyses-based application of quinoproteins and quinprotein-containing bacterial cells in biosensors and biofuel cells. *Biochim. Biophys.Acta.*, v.1647, p.121–126, 2003.

TORRES, C. I.; MARCUS, A. K.; LEE, H. S.; PARAMESWARAN, P.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; RITTMANN, B. E. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 34, p .3–17, 2010.

VÁZQUEZ-LARIOS, A. L.; SOLORZA-FERIA, O.; POGGI-VARALDO, H. M.; GONZALEZ-HUERTA, R. G.; PONCE-NOYOLA, M. T.; RÍOS-LEAL, E.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N. Bioelectricity production from municipal leachate in a microbial fuel cell: Effect of two cathodic catalyts. *International Juornal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 16667 – 16675, 2014.

VEGA, C. A; FERNANDEZ, I. Mediating effect of ferric chelate compounds in microbial fuel cells with *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis*, and *Erwinia dissolvens*. *Bioelectrochem.Bioenerg.*, v.17, p. 217–222, 1987.

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G.. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. *Desalinazation*, v. 219, p. 190202, 2008.

WANG, X.; FENG, Y. J.; LEE, H. Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell. *Water Science & Technology*, v. 57, n. 7, p. 1117 – 1121, 2008

WANG, X.; FENG, Y.; REN, N.; WANG, H.; LEE, H.; LI, N.; ZHAO, Q. Accelerated start-up of two-chambered microbial fuel cell: Effect of anodic positive poised potencial. *Electrochemical Acta*, v. 54, n. 3, p. 1109 – 1114, 2009a.

WANG, X.; FENG, Y.; WANG, H.; QU., Y.; YU, Y.; REN, N.; LI, N.; WANG, E.; LEE, H.; LOGAN, B., E. Bioaugmentation for electricity generation from corn stover biomass using microbial fuel cell. *Enviromental Science e Technology*,v. 43, n.15, p. 6088 – 6093, 2009b.

WILKINSON, S. “Gastrobots” — benefits and challenges of microbial fuel cells in food powered robot applications. *Auton Robot.*, v. 9, p. 99–111, 2000.

WU, D.; XING, D.; MEI, X.; LIU, B.; GUO, C.; REN, N. Electricity generation by *Shewanella sp.* HN-41 in microbial fuel cells. *Internacional Journal of Hydrogen Energy*, v.38, p. 15568-73, 2013.

YANG, Y.; XIANG, Y; XIANG, C.; WU, M.; SUN, G.; XU, M. Physiological and electrochemical effects of different electron acceptors on bacterial anode respiration in bioelectrochemical systems. *Bioresource Technology*, v. 164, p. 270-275, 2014.

ZHANG, G.; ZHANG, H.; ZHANG, C.; ZHANG, G.; YANG, F.; YUAN, G.; GAO, F. Simultaneous nitrogen and carbon removal in a single chamber microbial fuel cell with a rotating biocathode. *Process Biochemistry*, v. 48, p.893 – 900, 2013.

ZHANG, L.; ZHU, X.; KASHIMA, H.; LI, J.; YE, D-D; LIAO, Q.; REGAN, J., M. Anolyte recirculation effects in buffered and unbuffered single-chamber air-cathode microbial fuel cells. *Bioresourcce Technology*, v. 179, p. 26 – 34, 2015.

ZHANG, X., HE, W., REN, L., STAGER, J., EVANS, P.J., LOGAN, B.E., 2015. COD removal characteristics in air-cathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, v. 176, p. 23 – 31, 2015.

ZHAO, F.; RAHUNEN, N.; VARCOE, J. R.; ROBRTS, A. J.; AVIGNONE-ROSSA, C.; THUMSER, A. E.; SLADE, R.C.T. factor a affecting performance of microbial fuel cell for sulfur pollutants removal. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, p. 1931 – 196, 2009.

ZHOU, M.; CHI, M.; WANG, H.; JIN, T. Anode modification by electrochemical oxidation: A new practical method to improve the performance of microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal.*, v .60, n. 15, p .151 – 155, 2012.

ZHUWEI, D.; HAORAN, L.; TINGYUE, G. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 464 – 482, 2007.