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

MARIELLA BELÉN GALEANO LÓPEZ

EFEITOS DO POTENCIAL APLICADO NA FORMAÇÃO DE BIOFILME ELETROATIVO PRIMÁRIO PRODUZIDO POR *Shewanella amazonensis* EM CÉLULA À COMBUSTIVEL MICROBIANA ALIMENTADA COM EFLUENTE DE BIODIESEL

> VOLTA REDONDA 2021

MARIELLA BELÉN GALEANO LÓPEZ

EFEITOS DO POTENCIAL APLICADO NA FORMAÇÃO DE BIOFILME ELETROATIVO PRIMÁRIO PRODUZIDO POR Shewanella amazonensis EM CÉLULA À COMBUSTIVEL MICROBIANA ALIMENTADA COM EFLUENTE DE BIODIESEL

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

Orientador: Prof. D. Sc. Gilmar Clemente Silva

Volta Redonda, RJ 2021

Ficha catalográfica automática - SDC/BEM Gerada com informações fornecidas pelo autor

L864e López, Mariella Belén Galeano Efeitos do potencial aplicado na formação de biofilme eletroativo primário produzido por Shewanella amazonensis em célula à combustível microbiana alimentada com efluente de biodiesel / Mariella Belén Galeano López ; Gilmar Clemente Silva, orientador. Volta Redonda, 2021. 63 f. : il. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.22409/PGTA.2021.m.09847989192 1. Sistemas bioeletroquímicos. 2. Biofilmes eletroativos. 3. Shewanella amazonensis. 4. Produção intelectual. I. Silva, Gilmar Clemente, orientador. II. Universidade Federal Fluminense. Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda. III. Título. CDD -

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

MARIELLA BELÉN GALEANO LÓPEZ

EFEITOS DO POTENCIAL APLICADO NA FORMAÇÃO DE BIOFILME ELETROATIVO PRIMÁRIO PRODUZIDO POR *Shewanella amazonensis* EM CÉLULA À COMBUSTIVEL MICROBIANA ALIMENTADA COM EFLUENTE DE BIODIESEL

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

Aprovada em 26 de março de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. D. Sc. Gilmar Clemente Silva – UFF Orientador

Fabiana Seary dos Santos

Profa. D.Sc. Fabiana Soares dos Santos - UFF



Prof. D. Sc. Daniel Clemente Vieira Rêgo da Silva - UNIFESSPA

Volta Redonda 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao *Pater*, por ter realizado o pequeno plano da minha vida até seus mínimos detalhes.

À minha mãe Hermelinda, meu pai Ursino (*In Memoriam*) e aos meus irmãos, pelo apoio e o amor de sempre.

Ao Prof. Gilmar Clemente Silva pela paciência, confiança e orientação. Muito obrigada Prof. Gilmar pelos conhecimentos que o senhor me passou durante todo o mestrado, vou levar eles comigo para sempre.

Ao Dr. Rodrigo José Marassi, pelas dicas e o apoio durante a pesquisa no laboratório de Eletroquímica e Energia da UFF, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa de Eletroquímica e Energia (Geuff), pela companhia e as dicas para a melhora do trabalho.

Aos Profs. Carlos Eduardo de Souza e Fabiana Soares dos Santos por ter disponibilizado equipamentos específicos e necessários para a realização dos experimentos.

Aos professores e colegas do Programa de Pos-Graduação em Tecnologia Ambiental, pelo apoio e os conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários da UFF que possibilitaram a realização da pesquisa nesse tempo de pandemia, muito obrigada.

Às autoridades da Universidade Federal Fluminense pela oportunidade de aprender nas salas de aula da UFF e facilitar os equipamentos e laboratórios para o êxito desta pesquisa.

Às autoridades da Faculdade de Engenharia da Universidade Nacional de Asunción pelo apoio e incentivo para a realização desse sonho.

À Organização dos Estados Americanos e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (OEA – GCUB) pela concessão da bolsa de estudos para a realização do programa de mestrado.

RESUMO

As células à combustível microbianas (CCMs) são dispositivos de vanguarda capazes de remover a matéria orgânica presente nos efluentes industriais ou esgoto doméstico e simultaneamente gerar energia elétrica. Nesses dispositivos, um componente dos mais importantes é a interface anodo/biofilme, pois é nesta superfície que consórcios de bactérias exoeletrogênicas crescem formando um biofilme eletroativo, o qual é responsável pela oxidação do substrato e transferência de elétrons gerando uma diferença de potencial. A presente pesquisa avaliou os efeitos do potencial externo aplicado na formação do biofilme eletroativo primário formado pela Shewanella amazonensis, numa CCM alimentada com efluente da indústria do biodiesel. Amostras desse efluente foram diluídas (2:10), suplementadas com sais minerais e acetato de sódio, inoculadas com cultura de S. amazonensis SB2BT e adicionadas numa célula eletroquímica de três eletrodos (trabalho, tecido de carbono; contra eletrodo, espiral de platina e referência Ag/AgCl KCl sat.). Utilizou-se as técnicas eletroquímicas de cronoamperometria (CA), voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para avaliar o comportamento eletroquímico. A cronoamperometria com potencial constante (+0,3 V) apresentou a formação de um biofilme eletroativo primário de S. amazonensis nas 245 horas de operação do dispositivo. A máxima densidade de corrente foi de ~22 µA cm⁻² decorridas 42 horas do experimento e a mínima densidade de corrente observada foi de 4,08 µA cm⁻² após 124 horas de operação. Na voltametria cíclica não se observaram picos definidos de oxidação e redução do substrato pela S. amazonensis no período de operação dos dispositivos sem ou com potencial aplicado, denominados CCM controle e CCM potencial, respectivamente. Entretanto, no final do experimento, as maiores densidades de corrente anódicas foram observadas na CCM controle. A técnica de EIE evidenciou uma diminuição da resistência de transferência de carga de elétrons à interface durante o experimento. Análises físico-químicas de demanda química de oxigênio (DQO) e cromatografia de íons para cátions foram realizadas para avaliar o desempenho de tratamento do biofilme. A eficiência na remoção da DQO foi de 86 % para a CCM controle e 84 % para a CCM potencial. Não foi observada durante a operação do experimento uma diminuição linear na concentração dos íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ nas amostras dos dispositivos controle e com potencial aplicado, provavelmente devido às flutuações na disponibilidade desses íons. Apesar desse estudo ter evidenciado a formação de biofilme eletroativo sob um potencial oxidativo, poderiam ser feitos outros estudos mais aprofundados aplicando outros potenciais, tanto oxidativos como redutivos, pois a cepa de S. amazonensis ainda é pouco estudada em CCMs.

Palavras-chaves: Voltametria cíclica. Cronoamperometria. Espectroscopia de impedância eletroquímica.

ABSTRACT

The Microbial fuel cells (MFCs) are cutting-edge devices capable of removing organic matter present in industrial effluents or domestic sewage and simultaneously generating electricity. One of the essential components in these devices is the anode/biofilm interface. On this surface, the consortia of exoelectrogenic bacteria grow to form a biofilm responsible for the substrate's oxidation and electron transfer, generating a potential difference. This research evaluated the effects of the external potential applied in forming the primary electroactive biofilm formed by Shewanella amazonensis in a MFC fed with effluent from the biodiesel industry. Samples of this effluent were diluted (2:10), supplemented with mineral salts and sodium acetate, inoculated with S. amazonensis SB2BT and added to an electrochemical cell three electrodes (work, carbon fabric; counter, platinum spiral, and reference Ag/AgCl sat. KCl). The electrochemical techniques of chronoamperometry (CA), cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used to evaluate the electrochemical behavior. Chronoamperometry with constant potential (+0,3 V) showed the formation of a primary biofilm of S. amazonensis in the 245 hours of operation of the device. The maximum current density was ~ 22 μ A cm⁻² after 42 hours of the experiment, and the minimum observed current density was 4.08 µA cm⁻² after 124 hours of operation. In cyclic voltammetry, no definite peaks of oxidation and reduction of the substrate by S. amazonensis in the operation of devices with or without applied potential, called MFC control and MFC potential, respectively. However, at the end of the experiment, the highest densities of anodic currents were observed in the MFC control. The EIS technique showed a decrease in electron charge transfer resistance to the interface during the experiment. Physical-chemical analyses of chemical oxygen demand (COD) and ion chromatography for cations were performed to evaluate the biofilm's treatment performance. The COD removal efficiency was 86 % for the MFC control and 84 % for the MFC potential. During the experiment operation, a linear decrease in the concentration of Na⁺, K^+ and Ca^{2+} ions was not observed in MFC control and MFC with applied potential, probably due to fluctuations in the availability of these ions. Although this study has evidenced the formation of electroactive biofilm under an oxidative potential, further studies could be carried out by applying other potentials, both oxidative and reductive, as the S. amazonensis strain is still poorly studied in CCMs.

Keywords: Cyclic voltammetry. Chronoamperometry. Electrochemical Impedance Spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Diferentes etapas da formação do biofilme eletroativo da bactéria exoeletrogênica *S. oneidensis* na superfície do eletrodo/ânodo, p. 18

Figura 2- Principais mecanismos de transporte de elétrons na superfície do ânodo de uma célula à combustível microbiana (CCM) da bactéria eletrogênicas *S. oneidensis* MR-1, p. 21

Figura 3- Comparação do efeito da polarização da superfície do eletrodo no desenvolvimento do biofilme, p. 26

Figura 4-Diagrama de Nyquist de resposta idealizada no plano complexo, R_{Ω} é a resistência ôhmica, Rsei é a resistência da interface eletrólito/eletrodo, Rct é a resistência de transferência de carga e a Zw é a impedância de Warburg, p. 30

Figura 5- Fluxograma típico de produção de biodiesel, via transesterificação em meio alcalino, p. 33

Figura 6- Esquema da célula de câmara única de três eletrodos utilizada para os experimentos. Eletrodo de referência utilizado foi Ag/AgCl KCl sat., p. 38

Figura 7- Geração de corrente bioeletrocatalitica pela formação de biofilme eletroativo primário de *S. amazonensis* na superfície do ânodo de tecido de carbono. O potencial aplicado ao eletrodo foi de 0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat. Co-substrato utilizado: acetato de sódio 30 mmol L⁻¹. As linhas divisórias indicam substituição de substrato no dispositivo durante os cinco ciclos de batelada alimentada, p. 41

Figura 8- Comportamento redox observado na interface eletrodo/biofilme eletroativo formado por *S. amazonensis* no dispositivo com potencial constante aplicado (CCM potencial) (a) e sem potencial (CCM controle) (b) durante o experimento. A taxa de varredura foi de 10 mV s⁻¹, p. 45

Figura 9- Comparativa do comportamento redox observado na interface eletrodo/biofilme eletroativo formado por *S. amazonensis* nos dispositivos nos dispositivos CCM controle e CCM potencial durante o experimento. O potencial aplicado foi de 0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat. A taxa de varredura foi de 10 mV s⁻¹, p. 46

Figura 10- Primeiras derivadas das curvas de voltametria cíclicas: a) CCM potencial e b) CCM controle após 245 horas do experimento. Taxa de varredura de 10 mV s⁻¹. Potencial oxidativo aplicado na CCM potencial +0,3 vs Ag/AgCl KCl sat., p. 48

Figura 11- Representação de Nyquist dos valores de impedância bioeletroquímica do processo de formação do biofilme eletroativo de *S. amazonensis* na superfície do ânodo da CCM controle durante um intervalo de 245 horas. Destaque com expansão de escala para o diagrama obtido a 0 (sem inóculo), 40, 83, 212 e 245 horas do experimento, p. 49

Figura 12- Representação de Nyquist dos valores de impedância bioeletroquimica do processo de formação do biofilme eletroativo de *S. amazonensis* na superfície do ânodo da CCM potencial durante um intervalo de 245 horas. Destaque com expansão de escala para o diagrama obtido a 0 (sem inóculo), 40, 83, 212 e 245 horas do experimento, p. 50

Figura 13- Concentração média da DQO (mgO₂ L⁻¹) das amostras decorridas 193 horas de experimento, p. 51

Figura 14- Concentração de íons Na^+ (a), K^+ (b) e Ca^{2+} (c) nas amostras da CCM alimentada com efluente de biodiesel, p. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Métodos eletroquímicos de interesse para caracterização dos biofilmes eletroativos, p. 27

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

А	Ampere
μA	Microampere
μA cm ⁻²	Microampere por centímetro quadrado
CA	Cronoamperometria
Ca ²⁺	Íon cálcio
ССМ	Célula à combustível microbiana
CL50	Concentração letal média 50 %
CV	Voltametria cíclica
DO	Densidade ótica
DQO	Demanda química de oxigênio
DQO _f	Demanda química de oxigênio final
DQOi	Demanda química de oxigênio inicial
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ETDI	Estação de tratamento de despejos industriais
i	Densidade de corrente elétrica
K^+	Íon potássio
kHz	Kilohertz
L	Litros
L/dia	Litros por dia
LD	Limite de detecção
mg L ⁻¹	Miligramas por litro
mgO_2L^{-1}	Miligramas de oxigênio por litro
mHz	Milihertz
mL	Mililitros
mV s ⁻¹	Milivolts por segundo
Na ⁺	Íon sódio
O&G	Óleos e graxas
pН	Potencial hidrogeniônico
Pt	Platina

OCV	Potencial do circuito aberto
Re	Resistência da solução
Rct	Resistência de transferência de carga
sat.	Saturado
SMWW	Standard Methods for analysis for water and wastewater
SS	Sólidos suspensos
UFF	Universidade Federal Fluminense
V	Volts
W	Watts
Ω	Ohm
Ω cm ⁻²	Ohm por centímetro quadrado
е-	Elétron
m ³	Metro cúbico
ηDQO	Percentual de remoção de demanda química de oxigênio

SUMÁRIO

- 1 INTRODUÇÃO, p. 14
- 2 <u>OBJETIVOS</u>, p.16
- 2.1 OBJETIVO GERAL, p. 16
- 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 16
- 3 <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>, p.17
- 3.1 FORMAÇÃO DE BIOFILMES ELETROATIVOS EM CÉLULAS À COMBUSTIVEL MICROBIANAS, p. 17
- 3.2 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS EXOELETROGÊNICOS EM BIOFILMES, p. 19
- 3.3 MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS NA INTERFACE ELETRODO/BIOFILME ELETROATIVO, p. 20
- 3.3.1 Transferência mediada de elétrons (MET), p. 21
- 3.3.2 Transferência direta de elétrons (DET), p. 23
- 3.4 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS APLICADAS AO ESTUDO DE BIOFILMES ELETROATIVOS, p. 25
- 3.5 EFLUENTES COMO SUBSTRATO PARA AS CÉLULAS À COMBUSTIVEL MICROBIANAS, p. 31
- 3.5.1 Efluentes da produção de biodiesel e geração de bioeletricidade nas CCMs, p. 32
- 4 MATERIAIS E MÉTODOS, p. 36
- 4.1 EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL E SUBSTRATO DA CCM, p. 36
- 4.2 CEPA BACTERIANA, CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E INOCULAÇÃO NA CCM, p. 36
- 4.3 CONFIGURAÇÃO E OPERAÇÃO DA CÉLULA BIOELETROQUÍMICA, p. 37
- 4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS, p. 39
- 4.5 ANÁLISES BIOELETROQUÍMICAS, p. 39
- 5 <u>RESULTADOS E DISCUSSÕES</u>, p. 41

5.1 GERAÇÃO DE CORRENTE BIOELETROCATALITICA PELO BIOFILME ELETROATIVO PRIMÁRIO FORMADO POR *Shewanella amazonensis*, p. 41

5.2 COMPORTAMENTO REDOX NA INTERFACE ELETRODO/BIOFILME, p. 44

5.3 PROCESSOS RELACIONADOS À IMPEDÂNCIA ELETROQUIMICA NA FORMAÇÃO DO BIOFILME ELETROATIVO DE Shewanella amazonensis, p. 49

5.4 CAPACIDADE DE OXIDAÇÃO DO BIOFILME POR MEIO DA REMOÇÃO DE

DQO NA CÉLULA À COMBUSTIVEL MICROBIANA, p. 51

5.5 REMOÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Na⁺, K⁺ E Ca²⁺ NO PROCESSO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME PRIMÁRIO DE *S. amazonensis*, p. 52

6 <u>CONCLUSÃO</u>, p. 55

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS, p. 55

8 <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>, p. 57

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade as pesquisas sobre a geração alternativa de energia renovável tornaramse uma prioridade, devido à crescente demanda energética pela população mundial bem como devido a poluição dos recursos hídricos pelas atividades econômicas não sustentáveis que afetam a qualidade do recurso e dos seus serviços ambientais. Uma grande atenção tem sido dada às células a combustível microbianas (CCMs), dispositivos com diversas aplicações (remediação de ambientes poluídos; tratamento de efluentes, sedimentos e solo) (LI; LI; ZHOU, 2020), que produzem bioeletricidade.

Nas CCMs a geração de energia é possibilitada por catalisadores microbianos no ânodo que, no geral, são bactérias anaeróbias obtidas de solos, sedimentos, digestores anaeróbicos ou efluentes industriais (FARBER *et al.*, 2019). As substâncias orgânicas são oxidadas por microrganismos, logo depois os elétrons liberados passam por um circuito elétrico externo para o cátodo, enquanto os prótons resultantes da reação bioeletroquímica se difundem por meio de uma membrana de troca de prótons (PEM pela sigla em inglês) para a câmara do cátodo, onde ocorre a redução dos receptores de elétrons juntamente com elétrons e prótons (AL LAWATI *et al.*, 2019; HEYDORN *et al.*, 2020). Há diversas configurações de CCMs, todas elas variando os materiais dos eletrodos, membranas e eletrólitos (ANTOLINI, 2015; CAI *et al.*, 2020; DAS *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2018), entretanto um ponto crucial em todas elas é a formação do biofilme eletroativo, pois ele é o responsável pela oxidação dos substratos.

Esses biofilmes, também denominados biofilmes eletroquimicamente ativos (EABs pela sigla em inglês), são formados principalmente por microrganismos eletroativos (tipicamente bactérias exoeletrogênicas) e possuem a capacidade de liberar elétrons oriundos do seu metabolismo para um condutor externo no estado sólido, como por exemplo óxidos metálicos em ambientes naturais, ou eletrodos em CCMs (CHIRANJEEVI; PATIL, 2020; VIRDIS; DENNIS, 2017). Bactérias exoeletrogênicas como *Geobacter* spp. e *Shewanella* spp. têm sido amplamente estudadas em termos de mecanismos de transferência de elétrons (EET), por sua capacidade de realizar a transferência direta e mediada (LOGAN *et al.*, 2019; MOSCOVIZ *et al.*, 2020). Apesar dos esforços atuais para descrever esses mecanismos de transferência, ainda existem vários pontos não explorados sobre o mecanismo completo, por exemplo a função da matriz de substâncias extracelulares poliméricas secretada pelos microrganismos do biofilme (KIPF *et al.*, 2018).

Para a realização da transferência de elétrons, as bactérias exoeletrogênicas utilizam uma variedade interessante de substratos. Efluentes industriais e esgoto doméstico são considerados fontes importantes para o enriquecimento de biofilmes eletroativos na superfície do ânodo e podem ser usados como um substrato adequado ou fonte de inóculo para a geração de bioeletricidade nos dispositivos, porém, a produção de bioeletricidade depende também dos processos metabólicos dos microrganismos que se desenvolvem nos dispositivos (TANG *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2019).

Uma indústria que gera um grande volume de efluentes altamente poluentes caracterizados por altos teores de demanda química de oxigênio (DQO), demanda biológica de oxigênio (DBO₅), óleo, metanol, sabões de potássio e sódio e glicerol, é a produtora de biodiesel (DAUD *et al.*, 2015). Alguns estudos têm se referido ao uso de efluentes da produção de biodiesel como substrato em CCMs (BOSE *et al.*, 2018; FENG *et al.*, 2011; LI; LESNIK; LIU, 2013; NIMJE *et al.*, 2011; SUEHARA *et al.*, 2005; SUKKASEM *et al.*, 2011; SUKKASEM; LAEHLAH, 2013). No entanto, muitos desses trabalhos estão mais focados no tratamento global de efluente e geração de energia e não dão ênfase à formação do biofilme, o precursor de todo o metabolismo. Por isto é necessário aprofundar os estudos dos processos bioeletroquímicos produzidos por estes microrganismos exoeletrogênicos capazes de utilizar o efluente como substrato para os seus processos metabólicos.

Um microrganismo exoeletrogênico com um potencial catalisador para tecnologias CCMs é a *Shewanella* spp. Este microrganismo possui adaptabilidade para vários substratos, devido à sua notável versatilidade respiratória, capacidade de oxidar substratos orgânicos complexos de efluentes, inclusive produtos fermentativos ou subprodutos (CHENG *et al.*, 2020; NIMJE *et al.*, 2012). Entretanto, atualmente não existem estudos acabados da natureza e mecanismos de transferência de elétrons da cepa de *Shewanella amazonensis* às superfícies de eletrodos em CCMs, tão pouco utilizando o efluente de biodiesel como substrato. Pesquisas sobre esses aspectos permitirão conhecer os processos metabólicos que envolvem a geração de bioeletricidade e oxidação de substâncias orgânicas pela *S. amazonensis*, podendo incorporar melhorias e aumentar a eficiência dos dispositivos CCMs no futuro.

Por fim, a presente pesquisa pretende aprofundar questões relacionadas à formação do biofilme, estudando a adaptabilidade a um substrato pobre em micronutrientes para crescimento bacteriano, avaliando os efeitos da aplicação de um potencial oxidativo constante no ânodo da CCM alimentada com efluente proveniente da produção de biodiesel e inoculada com *S. amazonensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos do potencial aplicado no ânodo na formação de um biofilme eletroativo primário produzido por *S. amazonensis*, em célula à combustível microbiana alimentada com efluente de biodiesel.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a formação de biofilme eletroativo primário desenvolvido por S.
 amazonensis na superfície do ânodo da CCM a partir da geração de corrente eletrocatalítica;

 Identificar o comportamento redox na interface eletrodo/biofilme eletroativo sob o potencial aplicado ao sistema;

 Identificar os processos de impedância durante a formação do biofilme eletroativo de *S. amazonensis* na superfície do ânodo;

Determinar a capacidade de oxidação do biofilme por meio da remoção de DQO na CCM;

 Avaliar a remoção de íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ durante o processo de formação do biofilme primário na CCM alimentada com efluente de biodiesel.

3 <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>

3.1 FORMAÇÃO DE BIOFILMES ELETROATIVOS EM CÉLULAS À COMBUSTIVEL MICROBIANAS

Os biofilmes naturais são grupos de microrganismos agregados constituídos por uma ou várias espécies microbianas formadas pela fixação dos microrganismos planctónicos à superfície biótica ou abiótica (ARUNASRI; MOHAN, 2019). No caso do biofilme formado na superfície do eletrodo por microrganismos eletroquimicamente ativos é referido como biofilme eletroativo (KIRAN; PATIL, 2019). A adesão microbiana a uma superfície biótica ou abiótica é uma primeira etapa essencial durante a formação do biofilme eletroativo (SEMENEC; FRANKS, 2015). Num arranjo para CCM a adesão deve ocorrer em superfícies de eletrodos que atuam como coletor de elétrons, portanto este material deve ser bio-compatível, condutor elétrico para garantir que os elétrons sejam transportados até o receptor final no lado catódico (ARUNASRI; MOHAN, 2019).

A formação de biofilme compreende etapas sequenciais, incluindo fixação inicial, fixação irreversível, formação de microcolônia, maturação de biofilme e dispersão de biofilme (ANGELAALINCY; KRISHNARAJ; SHAKAMBARI, 2018).

Mukherjee *et al.*, (2020) e Arunasri e Mohan (2019) detalharam os diferentes estágios da formação do biofilme eletroativo. O primeiro estágio envolve a fixação reversível de células bacterianas a uma superfície. Durante este estágio, as células planctónicas de flutuação livre identificam uma superfície para fixação e iniciam o processo de fixação. A fixação das células planctónicas à superfície não é permanente, e os auxiliares locomotores, como flagelos e pili, estão presentes na célula bacteriana durante esse estágio. Durante o segundo estágio da formação do biofilme, ocorre a fixação irreversível das células bacterianas à superfície do substrato, a qual é mediada pela expressão de moléculas sinalizadoras (*quorum sensing*) e pela formação de material polimérico extracelular. O terceiro estágio envolve a formação de um biofilme maduro com uma estrutura tridimensional contendo células embaladas em *clusters* com canais entre os *clusters* que permitem o transporte de água e nutrientes e remoção de resíduos. No último estágio é observado descolamento e dispersão de células do biofilme devido às mudanças nas condições ambientais e iniciação para a formação de novo biofilme (MUKHERJEE *et al.*, 2020; ARUNASRI; MOHAN, 2019) (Figura 1).



Figura 1- Diferentes etapas da formação do biofilme eletroativo da bactéria exoeletrogênica *S. oneidensis* na superfície do eletrodo/ânodo

Fonte: adaptado de Mukherjee et al. ,2020 e Arunasri e Mohan, 2019

No geral, as células de bactérias encontram-se embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), formando aglomerados bacterianos, conhecidos como biofilmes (CZERWIŃSKA-GŁÓWKA; KRUKIEWICZ, 2020). Quanto maior a secreção de EPS pelo microrganismo, maior é a densidade do biofilme (ANGELAALINCY; KRISHNARAJ; SHAKAMBARI, 2018), no entanto, o desempenho eletroquímico não é determinado pela densidade, mas pela massa absoluta e proporção relativa de células vivas ao contrário de apenas um biofilme espesso (SUN *et al.*, 2016).

Na composição, além do EPS, o biofilme também é composto por uma porção principal de polissacarídeos e porções menores de glicoproteínas, glicolipídeos e uma quantidade insignificante de nucleotídeos e, em casos raros alguns metais que contribuem para a perspectiva estrutural e funcional da matriz do biofilme (ANGELAALINCY; KRISHNARAJ; SHAKAMBARI, 2018). É importante destacar que os lipopolissacarídeos (LPS) e polissacarídeos extracelulares (EPS), juntamente com as moléculas de sinalização ou *quorum sensing* (QS), prescrevem o destino da formação de biofilme (NOCELLI *et al.*, 2016).

Portanto, embora os EPS desempenhem vários papéis em diferentes células, sua função na transferência de elétrons é bastante intrigante (ANGELAALINCY; KRISHNARAJ; SHAKAMBARI, 2018). Estudos com *Geobacter sulfurreducens* tem sido intenso neste contexto, onde pesquisas apresentaram o papel do EPS como locais de fixação para proteínas redox periféricas que permitem que comunidades multicelulares transfiram elétrons para

receptores distantes, inclusive com microrganismo mutante. Porém o mutante que carecia do gene que codifica a matriz de EPS falhou em desenvolver biofilmes eletroativos em eletrodos, indicando claramente que a transferência de elétrons depende da formação de EPS e portanto este deve estar presente no mecanismo da reação bioeletroquímica (ANGELAALINCY; KRISHNARAJ; SHAKAMBARI, 2018).

3.2 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS EXOELETROGÊNICOS EM BIOFILMES

As principais famílias das bactérias exoeletrogênicas estudadas atualmente são as famílias Geobacteraceae e Shewanellaceae, com destaque para os gêneros *Geobacter* spp. e *Shewanella* spp., respectivamente, pois estes gêneros tem apresentado as maiores densidades de corrente (LOGAN *et al.*, 2019). A *Geobacter sulfurreducens* é a espécie exoeletrogênica mais comumente identificada em CCMs inoculadas com amostras microbianas altamente diversificadas e concentradas, por isto tem sido extensivamente estudada (LOGAN *et al.*, 2019). Além das cepas de *Geobacter* spp., as cepas de *Shewanella* spp., também têm sido usadas em dispositivos tipo CCMs, entretanto como característica específica produz biofilmes finos e cresce principalmente como células suspensas (LOGAN *et al.*, 2019).

Embora a *S. oneidensis* MR-1, apresente um desempenho eletroquímico ligeiramente menor que a *Geobacter sulfurreducens* (CHIRANJEEVI; PATIL, 2020), ela é uma cepa modelo para o sistema EET e pode executar este sistema de múltiplas maneiras. Desta forma, a rota a ser escolhida depende das características dos microrganismos, especialmente no ambiente de biofilme formado (CHOI; KIM; CHANG, 2018). Organelas de células envolvidas na transferência direta de elétrons do MR-1 incluem citocromos do tipo *c* da via de redução de metal (MtrC e OmcA) localizada na membrana externa (BREUER *et al.*, 2015) e apêndices de pili eletricamente condutores chamados nanofios em resposta direta à limitação de receptores de elétrons (GORBY *et al.*, 2006). A transferência de elétrons mediada (MET) por meio de substâncias transportadoras redox pode ser biossintetizada sob cultivo aeróbio e anaeróbico por algumas cepas da família Shewanellaceae, no entanto, a capacidade de sintetizar quantidades adequadas desses transportadores de elétrons (especialmente para condições anaeróbicas, onde a energia para a biossíntese é limitada) não está inequivocamente estabelecida para todas as espécies de *Shewanella* (CARMONA-MARTÍNEZ *et al.*, 2013).

Alguns outros exoeletrogênicos pertencentes principalmente aos gêneros *Geobacter* e *Shewanella* também foram estudados (CHIRANJEEVI; PATIL, 2020). Microrganismos como *Bacillus subtitlis* e *Klebsiella aerogenes* (anteriormente conhecido como *Enterobacter*), normalmente produzem densidades de corrente bastante baixas em culturas puras (LOGAN *et al.*, 2019), portanto não são muito estudados e consequentemente as vias EET e os componentes moleculares envolvidos na maioria desses organismos exoeletrogênicos ainda precisam ser melhor compreendidos (CHIRANJEEVI; PATIL, 2020).

3.3 MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS NA INTERFACE ELETRODO/BIOFILME ELETROATIVO

As cadeias de transporte de elétrons microbianas transferem elétrons de doadores de baixo potencial para receptores de potencial mais positivo por meio de uma série de reações redox (BEEGLE; BOROLE, 2018). A diferença de potencial redox entre receptores e doadores de elétrons (Δ E) utilizada na cadeia de transporte de elétrons dita o ganho de energia livre (Δ G) (BEEGLE; BOROLE, 2018).

Os microrganismos transferem elétrons para o ânodo usando diferentes mecanismos (LOGAN *et al.*, 2019). Até o momento, dois tipos predominantes de EET foram considerados: 1) transferência extracelular direta de elétrons (DET pelas siglas em inglês) por nanofios de proteína condutiva ou pili (LOVLEY *et al.*, 2019) e citocromos do tipo *c* multi-heme redoxativos na superfície celular (BREUER *et al.*, 2015); e 2) transferência extracelular mediada de elétrons (MET pelas siglas em inglês) baseada em mediadores solúveis como transportadores de elétrons para transportar elétrons de células de bactérias para a superfície do eletrodo (YANG; YANG, 2020). No entanto, a EET é um fenômeno muito complexo e a discriminação entre DET e MET muitas vezes é complicada, porque biocatalisadores metabolicamente ativos submetidos à troca de elétrons com superfícies/agentes condutores podem envolver diversos mecanismos dentro de um único organismo (PANKRATOVA; HEDERSTEDT; GORTON, 2019).

A Figura 2, ilustra os principais mecanismos de transporte elétrons na interface de um eletrodo/biofilme formado pela da bactéria *S. oneidensis* MR-1, adaptado de Okamoto *et al.* (2016). Se observa a transferência direta de elétrons por meio da via respiratória Mtr (a), um centro heme de citocromos do tipo c (c-Cyts pelas siglas em inglês) localizado na membrana externa da célula bacteriana e (b) por meio de um pilus bacteriano que transporta diretamente elétrons ao eletrodo. Assim mesmo, outro mecanismo de transferência direta de elétrons nas *Shewanella* spp. se apresenta com as flavinas e os OM c-Cyts. As moléculas de flavina secretadas pelas células bacterianas aumentam a taxa de DET por meio de uma reação redox de um elétron como um cofactor em OM c-cyts (c). Por outro lado, para os MET, uma molécula

orgânica solúvel, por exemplo, a riboflavina, entrega elétrons por transporte entre o eletrodo e as células bacterianas por meio de um processo redox de dois elétrons (d) (OKAMOTO *et al.*, 2016).

Figura 2- Principais mecanismos de transporte de elétrons na superfície do ânodo de uma célula à combustível microbiana (CCM) da bactéria eletrogênicas *S. oneidensis* MR-1



Fonte: adaptado de Angenent e Wu, 2016 e Okamoto et al., 2016

3.3.1 <u>Transferência mediada de elétrons (MET)</u>

A transferência mediada de elétrons (MET pela sigla em inglês) é alcançada de várias maneiras, dependendo da natureza e da fonte das espécies redox mediadoras, que podem ser metabólitos secretados por microrganismos exoeletrogênicos ou mediadores artificiais adicionados ao sistema (PANKRATOVA; HEDERSTEDT; GORTON, 2019). Na aplicação prática, as propriedades eletroquímicas do mediador devem corresponder ao tipo de reação bioeletrocatalítica alvo (CHEN; DONG; MINTEER, 2020). Para a transferência de elétrons mediada por oxidação, o potencial de redução do mediador deve ser mais positivo do que o do co-fator redox do bioeletrocatalisador para permitir o MET espontâneo e vice-versa; para o MET redutivo, o potencial de redução do mediador deve ser mais negativo do que o do co-fator redox (CHEN; DONG; MINTEER, 2020; MILTON; MINTEER, 2017).

Muitos microrganismos podem produzir pequenas moléculas solúveis redox-ativas que atuam como transportadores de elétrons porque se usam repetidamente para transportar elétrons, como flavinas, quinonas e fenazinas, para facilitar a EET (ANGELAALINCY *et al.,* 2018). Todos esses mediadores redox-ativos são transportadores de elétrons típicos responsáveis pela EET indireta, especialmente entre células e óxidos ou eletrodos insolúveis de Fe³⁺ (receptores de elétrons)(ANGELAALINCY *et al.,* 2018).

Por outro lado, em muitos estudos que investigam CCMs, mediadores artificiais são adicionados para facilitar a transferência de elétrons (BEEGLE; BOROLE, 2018). Além disso,

alguns mediadores adicionados de uma maneira exógena ao analito também podem facilitar a transferência de elétrons de microrganismos fermentativos e outros não eletrogênicos (KUMAR *et al.*, 2019). Dentre os mais usados destacam-se compostos como vermelho neutro, ferricianeto de potássio, antraquinona-2,6-dissulfonato e polímeros de fosfolipídios sintetizados artificialmente (GLASSER; SAUNDERS; NEWMAN, 2017; LIU; SHI; GU, 2018; SCHRÖDER; HARNISCH; ANGENENT, 2015). Porém, os custos de adicionar mediadores artificiais aos sistemas contínuos em escala comercial aumentarão as despesas do sistema, além disso, devido à toxidade podem causar danos à saúde humana e em outras espécies vivas, se liberados no meio ambiente (BEEGLE; BOROLE, 2018). Portanto, o uso desses tipos de mediadores poderia não ser recomendado nos dispositivos de CCMs.

Um componente crítico do MET é que a concentração de transportadores de elétrons deve permanecer em baixas concentrações para conduzir a síntese de transportadores adicionais (BEEGLE; BOROLE, 2018). A reciclagem do mediador entre as células bacterianas e o eletrodo e vice-versa é, portanto, essencial para uma conversão significativa do substrato eletroquímico, respectivamente a formação do produto (SCHRÖDER; HARNISCH; ANGENENT, 2015).

Os microrganismos podem produzir pequenas moléculas que atuam como receptores de elétrons metabólicos e por sua vez, ao se oxidar doam estes elétrons para o eletrodo condutor. Estas moléculas são particularmente relevantes para situações em que os microrganismos têm acesso limitado a um substrato crítico, por exemplo, um receptor de elétrons para catabolismo pode ser pouco solúvel, como eletrodos em CCMs (GLASSER; SAUNDERS; NEWMAN, 2017).

Em termos de mecanismo mediado, os dois microrganismos produtores mais bem caracterizados são *Pseudomonas aeruginosa* e *S. oneidensis*, conhecidos pelo uso de fenazinas e flavinas (BEEGLE; BOROLE, 2018; GLASSER; SAUNDERS; NEWMAN, 2017).

A bactéria patogênica *P. aeruginosa* tem estratégias para lidar com a hipóxia que suportam o equilíbrio redox celular em biofilmes; estes incluem os compostos endógenos redutores eletroquimicamente chamados fenazinas, que podem transportar elétrons para oxidantes disponíveis à distância (CORNELL *et al.*, 2020). Foi demonstrado que a transferência extracelular de elétrons mediada por fenazinas suporta a sobrevivência de células de *P. aeruginosa* em culturas líquidas anóxicas e que afeta a morfogênese do biofilme de *P. aeruginosa* (CORNELL *et al.*, 2020). Pode-se concluir que a formação de biofilme promove as reações redox das fenazinas no ânodo via acúmulo e, portanto, potencializa a transferência de elétrons interfacial e a geração de energia das CCMs (QIAO *et al.*, 2017). No entanto, não está

totalmente claro como o ambiente eletroquímico pode influenciar a produção e o uso de fenazinas por *P. aeruginosa* (BOSIRE; ROSENBAUM, 2017).

Por outro lado, as cepas de *Shewanella* spp. são caracterizadas pela produção de mediadores do tipo flavinas. Estes são compostos orgânicos bioquimicamente derivados da riboflavina e identificados pela presença de pteridina (uma combinação de anéis aromáticos de pirimidina e pirazina), e é normalmente ligada ao difosfato de adenosina formando flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (HEIJNE *et al.*, 2020). Mononucleotídeo de flavina reduzido (FMN) e riboflavina (RF) transportam elétrons obtidos a partir dos citocromos do tipo Omc, difundem-se para a superfície do eletrodo e descarregam elétrons para os ânodos (LIN *et al.*, 2018). No estudo da eletroquímica de moléculas redox-ativas secretadas, diferentes condições de cultura e um mutante interrompido na secreção de flavinas, indicaram que as flavinas aceleram a EET como co-fatores ligados ao citocromo, em vez de mediadores moleculares solúveis livres em culturas de *S. oneidensis* MR-1 (XU; JANGIR; EL-NAGGAR, 2016).

Outros organismos produtores de mediadores são a *Klebsiella pneumonia*, *Streptomyces* spp. e *Lactococus lactis* que usam quinonas (GLASSER; SAUNDERS; NEWMAN, 2017). As quinonas podem ser utilizadas como mediadores de elétrons, principalmente por causa de seu grupo quinona com função de transferência de elétrons que circula intracelularmente em três estados de oxidação: oxidado, radical semiquinona, reduzido ou hidroquinona (GUO *et al.*, 2020).

O número de mediadores de elétrons endógenos na natureza, quais organismos os produzem e a natureza molecular dos putativos transportadores de elétrons endógenos ainda é desconhecido (GLASSER; SAUNDERS; NEWMAN, 2017).

3.3.2 Transferência direta de elétrons (DET)

Os mecanismos de transferência direta de elétrons (DET pelas siglas em inglês) têm a característica comum de transferência de elétrons por sólidos insolúveis, como uma alternativa ao uso de mediadores de elétrons solúveis (BEEGLE; BOROLE, 2018). Geralmente, o processo de EET direto requer contato direto entre as células e os condutores de elétrons de estado sólido, como o eletrodo, no entanto, os mecanismos que envolvem o transporte de elétrons dentro dos nanofios ou *cable bacteria* permanecem em parte desconhecidos e ativamente debatidos (LIU; SHI; GU, 2018).

Um dos mecanismos principais de transferência de elétrons se refere a certos citocromos multi-heme ou proteínas de ferro-enxofre, fundamentais na mediação do transporte

de elétrons por meio da membrana externa (LIU; SHI; GU, 2018). Essa importância é devido a essas proteínas ou citocromos poderem interagir entre si para formar as vias EET que acoplam as cadeias respiratórias internas com a reação redox externa (LIU; SHI; GU, 2018). Os dois tipos principais de citocromos (tipo *b* e tipo *c*) diferem apenas em seu mecanismo de fixação do heme, no entanto, os citocromos do tipo *c* são sempre encontrados fora do citoplasma e tem um mecanismo de fixação do heme que permite serem montados complexos multi-heme, com capacidade de conter vários elétrons (EDWARDS *et al.*, 2020). Em particular, bactérias das famílias Shewanellaceae e Geobacteraceae podem expressar diferentes citocromos com alto número de heme e têm sido objeto de estudo devido à sua capacidade de reduzir uma ampla gama de substratos extracelulares, incluindo minerais insolúveis de Fe³⁺ e Mn⁴⁺ (EDWARDS *et al.*, 2020).

Tanto as *Shewanella* spp. quanto as *Geobacter* spp. transportam elétrons usando *ccyts*, como por exemplo a cepa *G. sulfurreducens* que apresenta 111 genes que codificam para *c-cyts* (KUMAR *et al.*, 2017). De fato a *G. sulfurreducens* é um dos organismos modelo para DET, a qual utiliza um sistema *OmcS* ramificado (BEEGLE; BOROLE, 2018).

Semelhante a *G. sulfurreducens*, *S. oneidensis* tem 39 genes que também codificam *ccyts* (KUMAR *et al.*, 2017). A cepa de *S. oneidensis* reduz metais, porém utiliza a via *Mtr* em vez da via *Omc* (BEEGLE; BOROLE, 2018). Este complexo ternário transfere elétrons das proteínas periplasmáticas para os receptores extracelulares, como eletrodos e minerais que contêm Fe³⁺, Mn³⁺ ou Mn⁴⁺ (BEEGLE; BOROLE, 2018). Entretanto, para alcançar um EET de longa distância, *Shewanella* spp. pode auto excretar pequenas moléculas, como flavinas e quinonas, para retransmitir elétrons (KUMAR *et al.*, 2017).

As flavinas são conhecidas por aumentar a transferência de elétrons na bactéria *S. oneidensis* MR-1, que reduz os condutores de elétrons por meio dos citocromos da membrana (*Om*) citocromos do tipo c (HONG; PACHTER, 2016). Mecanismos envolvendo co-factor foram propostos para explicar esse aumento na transferência direta de elétrons e a literatura eletroquímica recente reporta favorecimento a um modelo ligado à flavina, propondo duas reações redox: um elétron de flavina reduz hidroquinona para semiquinona (Sq) e semiquinona é oxidada para hidroquinona (Hq) (HONG; PACHTER, 2016).

No que refere a outro mecanismo de transferência direta, se encontra a transferência a partir de nanofios. Sob condições de falta de receptores de elétrons solúveis, as espécies do gênero *Geobacter* são normalmente relatadas como capazes de gerar uma gama de nanofios com diversos comprimentos em torno da membrana celular, no entanto, os mecanismos subjacentes para o transporte de elétrons ao longo dos pili suscitam debate entre a comunidade

científica e grande parte da controvérsia sobre os mecanismos para a condutividade ainda não foi resolvida (LIU; SHI; GU, 2018). Adhikari *et al.* (2016) determinaram uma condutividade substancial ao longo do comprimento das regiões livres de citocromo dos pili e uma resposta de pH do pilus sugeriu ainda que a condutividade eletrônica medida é uma propriedade intrínseca dos pili (ADHIKARI *et al.*, 2016). Essa descoberta corrigiu as hipóteses anteriores de que os citocromos eram necessários para a condutividade dos pili (LIU; SHI; GU, 2018).

Usando microscopia crioeletrônica, Filman *et al.* (2019) caracterizaram nanofios de preparações dos pili de *G. sulfurreducens* que são compostas exclusivamente de monômeros empilhados cabeça-a-cauda do citocromo tipo c de seis heme (OmcS). Eles verificaram que a dobra única do OmcS envolvida em torno de uma pilha contínua de hemes pode servir como um caminho ininterrupto para o transporte de elétrons que suporta a cadeia não ramificada de hemes ao longo do eixo central do filamento.

Apesar dos esforços no campo de caracterização estrutural, nenhuma estrutura de pili de *Geobacter* spp. em uma resolução atômica está disponível (LIU; SHI; GU, 2018). Portanto, mais estudos sobre a estrutura dos pilus e seus mecanismos de transferência de elétrons são necessários para melhor compreender sua função na EET.

3.4 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS APLICADAS AO ESTUDO DE BIOFILMES ELETROATIVOS

O estudo dos biofilmes eletroativos é explorado por meio de diversos métodos. Um dos métodos de controle e estudo de biofilmes eletroativos que tem sido amplamente discutido na literatura é aplicar um potencial ou corrente elétrica a uma interface eletrodo/biofilme (SULTANA; BABAUTA; BEYENAL, 2015).

As células bacterianas geralmente têm uma carga superficial negativa e quando uma superfície é polarizada negativamente, de modo que existe uma carga superficial negativa, ocorre uma interação eletrostática repulsiva com células bacterianas que reduz a fixação da célula e/ou reações eletroquímicas ocorrem na superfície. Se a superfície for positivamente polarizada de modo que exista uma carga superficial positiva, ocorre uma interação eletrostática atrativa com as células bacterianas que aumenta a fixação da célula, Figura 3, (SULTANA; BABAUTA; BEYENAL, 2015).



Figura 3- Comparação do efeito da polarização da superfície do eletrodo no desenvolvimento do biofilme

Fonte: adaptado de Sultana, Babauta e Beyenal, 2015

Não obstante, há uma grande controvérsia sobre como os diferentes potenciais anódicos afetam o desempenho das CCMs, devido a que é frequentemente relatado que potenciais mais positivos melhoram a aclimatação e o desempenho de biofilmes exoeletrogênicos, enquanto em outros estudos potenciais mais negativos foram necessários para atingir densidades de corrente mais altas (ZHU *et al.*, 2014). Por exemplo, Zhu *et al.* (2014) apresentaram que as correntes máximas produzidas com um inóculo de efluente aumentaram com potenciais anódicos na faixa de -0,25 a 0,21 V, mas diminuíram em 0,51 e 0,81 V sugerindo que as comunidades exoeletrogênicas autorregulam suas vias de transferência de elétrons extracelulares para se adaptar a diferentes potenciais de ânodo.

Além da aplicação de um potencial constante por meio da cronoamperometria para a formação do biofilme, diferentes métodos eletroquímicos podem ser usados para fornecer inúmeras informações acerca da cinética de crescimento, transferência de elétrons/interfacial/extracelular, comportamento redox dos microrganismos eletroativos, bem como a resistência elétrica do biofilme, capacitância e impedância, entre outros (CZERWIŃSKA-GŁÓWKA; KRUKIEWICZ, 2020). A Tabela 1 apresenta uma lista adaptada de Czerwińska-Główka e Krukiewicz (2020) dos métodos eletroquímicos de maior interesse para a presente pesquisa, utilizados para a caracterização dos biofilmes, bem como as condições experimentais utilizadas em experimentos e as cepas bacterianas.

Características	Condições experimentais	Propriedade medida	Cepa bacteriana	Referência		
	Voltametria cíclica (CV)					
Teste eletroquímico onde a corrente é registrada varrendo o potencial de positivo para negativo e negativo para positivo	Taxa de varredura: 2 mV s^{-1} Faixa de potencial: -0,49 V - 0,71 V (vs SHE)	Transferência extracelular de elétrons	Shewanella oneidensis	GROBBLER et al., 2018		
entre os limites escolhidos (CHOUDHARY; JOTHI; NAGESWARAN, 2017). A análise gráfica de um	Taxa de varredura: 10 mV s^{-1} Faixa de potencial: -0,7 V - 0 V (vs SHE)	Transferência extracelular de elétrons	Pseudomonas aeruginosa	QIAO et al., 2017		
voltamograma cíclico fornece os picos redox, que são pico de redução e oxidação do material (CHOUDHARY; JOTHI;	Taxa de varredura: 1 mV s^{-1} Faixa de potencial: -0,5 - 0,5 V (vs Ag/AgCl)	Transferência extracelular de elétrons	<i>Shewanella</i> <i>oneidensis</i> e mutantes	CARMONA- MARTINEZ <i>et</i> <i>al.</i> , 2011		
NAGESWARAN, 2017).	Taxa de varredura: 5 mV s^{-1} Faixa de potencial: -0,7-0 V (vs SCE)	Produção de corrente eletrocatalítica	Shewanella putrefaciens	WU et al., 2018		
	Taxa de varredura: 10 mV s^{-1} Faixa de potencial: -0.9 - 0.9 V (vs Ag/AgCl)	Transferência de extracelular de elétrons	Shewanella oneidensis	PINTO; CORADIN; LABERTY- ROBERT, 2018		
	Cronoan	nperometria (CA)			
Um potencial constante o aplicado ao eletrodo do trabalho e a corrente o medida em função do tempo (CHOUDHARY IOTHI: NAGESWARAN	 é Potenciais: e 0,71, 0,21 e - é 0,19 V (vs o SHE) 	Produção bioelectro_ catalítica	Shewanella oneidensis	GROBBLER <i>et al.</i> , 2018		
2017). Mínimo e máximo de densidade de corrente obtida a partir do biofilme	Potencial: 0 V (vs SHE)	Atividade elétrica no bioânodo	Lactobacillus rhamnosus	JAROSZ et al., 2019		
pode ser calculado com ajuda da CA sob um valo constante de potencia aplicado (KUMAR KUMAR; BASU, 2019).	n Potencial: r 0,3 V l (vs Ag/AgCl) ;	Processo de formação do biofilme	Shewanella oneidensis	PINTO; CORADIN; LABERTY- ROBERT, 2018		

Tabela 1- Métodos eletroquímicos de interesse para caracterização dos biofilmes eletroativos

Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

-	-	•	- · ·	
A EIE mede a resistência	Amplitude de	Capacitância de	Microrganismos	BIMAKR et al.,
elétrica (impedância) da	perturbação:	dupla camada	endógenos do	2018
interface metal/solução e	100 kHz a 0,01		efluente	
permite determinar a	Hz			
resistência de polarização	Amplitude de	Propriedades	Acithiobacillus	MÉNDEZ-
(região de baixa	perturbação: 10	elétricas da	thiooxidans	TOVAR;
frequência), a resistência de	mV	interface		GARCÍA-
solução e capacitância de	Faixa de	eletrodo/biofilme.		MEZA;
dupla camada (TELEGDI;	frequência: 103	Resistência do		GONZÁLEZ,
	kHz a 50 mHz	biofilme.		2019

experimentais medida bacteriana	Características		experimentais	medida	Cepa bacteriana	Referência	
SHABAN; 2018)VASTAG, perturbação: 10 mVAmplitude de 	SHABAN 2018)	ABAN; VASTAG, 8)	Amplitude de perturbação: 10 mV Faixa de frequencia: 1 kHz a 1 mHz	Resistência Intracelular e extracelular (Impedância)	Geobacter sulfurreducens PCA Shewanella oneidensis MR-1	JUNG, 2014	

Fonte: adaptada de Czerwińska-Główka e Krukiewicz, 2020

Outra técnica eletroquímica utilizada para o estudo de biofilmes eletroativos é a técnica de voltametria cíclica (CV pelas siglas em inglês). Esta técnica foi utilizada para pesquisar os mecanismos de transferência de elétrons extracelulares de *S. oneidensis* MR-1 e os seus mutantes no estudo de Carmona-Martínez *et al.* (2011). Os mesmos pesquisadores demonstram que a região de potenciais onde se localizam a transferência de elétrons mediada e direta dos biofilmes derivados podem ser obtidos a partir das curvas de CV dos respectivos biofilmes registrados em diferentes condições bioeletrocataliticas. Os resultados obtidos indicaram que os mutantes de *S. oneidensis* foram capazes de contornar a transferência direta de elétrons impedida por proteínas redox alternativas, bem como por vias auto-mediadas (CARMONA-MARTINEZ *et al.*, 2011).

Similarmente, Gao *et al.* (2019) verificaram os efeitos do EPS nos mecanismos EET durante a redução de hematita por *S. oneidensis* MR-1 e mostraram que apartir das curvas de CV não se observou picos redox bem definidos em células MR-1, exceto em -0,324 V vs -0,141 V, que foram atribuído as flavinas. Por outro lado, um par redox bem definido em -0,126V e - 0,183 V foi causado pelos citocromos do tipo *c* da membrana externa e um par de picos pouco definidos em -0,126/-0,327V e 0,228/0,053 V foram detectados (GAO *et al.*, 2019). Finalmente, os mesmos pesquisadores observaram que os dois últimos picos podem ser atribuidos a outras proteínas da membrana externa ou substâncias semelhantes a proteínas, que forma detectadas por espectroscopia UV-vis (GAO *et al.*, 2019).

Da mesma forma, Yang *et al.* (2019), que estudaram a reposta de biofilmes de *Geobacter* spp. aos potenciais anódicos com ênfase especial nas substâncias poliméricas extracelulares (EPS), sugerem que as atividades eletroquímicas e viabilidade dos biofilmes de *Geobacter* foram simultaneamente atenuadas em 0,4 e 0,6 V em comparação com -0,2 V e 0 V e verificaram que os biofilmes (especialmente a região do biofilme mais próxima à superfície do eletrodo) que cresceram a -0,2 e 0 V e produziram relativamente mais proteínas redox-ativas extracelulares e menos polissacarídeos extracelulares, o que conferiu maior capacidade de aceitar/doar elétrons para o EPS e, consequentemente facilitou a EET, portanto, a produção de

EPS sob diferentes potenciais anódicos pode ser regulada finamente pelas células para manter o equilíbrio entre a eficiência do EET e a proteção celular (YANG *et al.*, 2019).

No caso das *Shewanella* spp., especificamente da cepa *S. oneidensis* MR-1, utiliza os mecanismos de transferências mediada e direta de elétrons sob diferentes potenciais (GROBBLER *et al.*, 2018) que podem ser observados a partir da técnica de CV. Grobbler *et al.* (2018) mostraram que esses mecanismos de transferência de elétrons em diferentes potenciais podem utilizar vias alternativas de transferência e mostraram pela primeira vez que a abundância de proteínas de transferência de elétrons de *S. oneidensis* difere com o potencial do eletrodo (GROBBLER *et al.*, 2018).

Pinto *et al.* (2018) confirmaram por meio de um conjunto de experimentos a existência de diferentes mecanismos de transferência de elétrons (DET e/ou MET/riboflavina), dependendo do potencial aplicado em *S. oneidensis*. Os mesmos pesquisadores expõem que um aumento contínuo da intensidade do sinal na faixa de potencial positivo sugere que o mecanismo DET se torna cada vez mais eficaz com o tempo, especialmente em condições de polarização altamente positiva, isso reflete que um número crescente de bactérias que se encontra em contato direto com eletrodo. Porém, para um eletrodo não polarizado ou uma polarização em -0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat. o aumento da intensidade da onda é menos acentuado, ou seja, pode indicar a produção de outros mediadores pela bactéria e/ou uma modificação da interface mediador/grafite (PINTO; CORADIN; LABERTY-ROBERT, 2018).

Uma outra técnica eletroquímica muito utilizada para avaliar a eficácia de um sistema bioeletroquímico é a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). A partir dessa técnica os resultados podem ser expressos de diferentes maneiras, tais como circuitos equivalentes via diagramas de Nyquist (FARIA; SILVA; PAIVA, 2020). Um modelo de impedância idealizada é composto de diferentes fatores de contribução, conforme mostrado na Figura 4. A resistência ôhmica (R_{Ω}) é dada pela resistência da solução e é composta pela resistência do eletrólito, resistência do coletor de corrente, resistência do eletrodo e resistência do aglutinante. A resistência do eletrólito é dominante nessa faixa e depende da concentração iônica, geometria da célula, temperatura porém é independente da frequência (RAKIUL ISLAM; PARK; BALASINGAM, 2020).

Logo após observa-se a impedância da interface do eletrólito/eletrodo que ocorre devido à transferência de massa e polarização, em seguida ilustra-se a impedância faradaica que contem a capacitância de dupla camada, Cdl, e a resistência de transferência de carga, Rct. Finalmente, se encontra a impedância de Warburg, Zw, relacionada à difusão de partículas que

apresenta valores significativos em baixas frequencias (RAKIUL ISLAM; PARK; BALASINGAM, 2020).

Figura 4- Diagrama de Nyquist de resposta idealizada no plano complexo, R_{Ω} é a resistência ôhmica, Rsei é a resistência da interface eletrólito/eletrodo, Rct é a resistência de transferência de carga e a Zw é a impedância de Warburg



Fonte: adaptado de Rakiul Islam et al., 2020

No geral, a potencia gerada na CCM é limitada pela alta resistência interna no dispositivo (SEKAR; RAMASAMY, 2013). Estes autores explicam que o componente faradaico surge da transferência de eletróns por meio da interface por superar uma barreira de ativação apropriada, ou seja a resistência de polarização (Rp) e a resistência ôhmica (R_{Ω}). A resistência de polarização inclui a transferência de carga e as perdas de ativação, sendo a resistência à transferência de carga (Rct) a principal limitação cinética devido às taxas de reação de ativação lentas no ânodo e no cátodo A transferência de carga na interface também afeta o transporte de massa do reagente e o produto, incorporando assim a resistência por difusão.

Uma diminução na Rct é a evidência da formação do biofilme eletroativo no eletrodo ou uma mudança na interface eletrodo/eletrolito. A pesquisa feita por Min *et al.* (2017) usando *S. oneidensis* MR-1 para examinar a viabilidade de aumentar a EET e a sua capacidade de biodegradação por meio da engenharia genética, mostrou que no diagrama de EIE a corrente aumentou em correlação com a menor Rct da cepa modicada.

Estes estudos apontam que a EIE tem se mostrado como uma técnica poderosa ao estudo de biofilmes eletroativos, pois não é destrutiva e consegue separar os diversos eventos eletroquímicos na interface.

3.5 EFLUENTES COMO SUBSTRATO PARA AS CÉLULAS À COMBUSTIVEL MICROBIANAS

A produção de bioeletricidade depende dos substratos usados para o cultivo e metabolismo de microrganismos (KUMAR *et al.*, 2019). As substâncias orgânicas que podem ser utilizadas como substratos às CCMs variam de substâncias puras (acetato, glicose, lactato) para substâncias químicas mais complexas (álcoois, celulose, ácidos graxos, proteínas e açúcar), bem como diferentes tipos de efluentes oriundos de origem doméstica, industrial e agrícola (KUMAR *et al.*, 2019). Efluentes do processamento de alimentos, óleo vegetal, efluente industrial, refinaria e destilaria, efluentes de processamento de frutos do mar, laticínios, curtumes, gado e petroquímicas, bem como de efluentes de suco de maçã fermentado, têm sido usadas para a geração de eletricidade usando CCMs (PALANISAMY *et al.*, 2019).

Teoricamente, qualquer efluente rico em conteúdo orgânico pode ser alimentado à célula a combustível microbiana para geração de energia (KUMAR *et al.*, 2019), no entanto, pode-se entender que a concentração e composição dos efluentes tem influência significativa no seu tratamento e na eficiência para a geração de energia (ELMEKAWY *et al.*, 2015; PANDEY *et al.*, 2016). A biodegradabilidade dos efluentes determina a sua interação com o biocatalisador e respectiva produção potência (ELMEKAWY *et al.*, 2015). Efluentes altamente biodegradáveis (por exemplo, laticínios, vegetais, processamento de alimentos, efluentes à base de plantas de arroz) podem ser tratados de forma eficaz com uma boa quantidade de geração de energia, por outro lado, os resíduos complexos (baixa biodegradabilidade), tais como base de melaço e efluentes de moinhos de óleo são efluentes difíceis de tratar nos dispositivos das CCMs, juntamente com produção de baixa potência (ELMEKAWY *et al.*, 2015).

Pandey *et al.* (2016) revisaram os avanços no uso de uma ampla gama de efluentes como substrato potencial em CCMs. Os pesquisadores explicaram que existem alguns fatores relacionados ao substrato que podem afetar o desempenho da CCM, como crescimento indesejado de biomassa, biodegradação incompleta dos substratos, produção de hidrogênio, metanogênese, processos de degradação aeróbia e metabólitos neutros difundindo para a câmara catódica (PANDEY *et al.*, 2016).

A natureza complexa dos efluentes para alcançar a degradação completa ou remoção de todos os poluentes usando cepas microbianas únicas tem viabilidade limitada, portanto, uma cultura mista ou consórcios microbianos são usados no tratamento de efluentes industriais ou domésticos (RATHOUR *et al.*, 2018). O uso de culturas mistas que utilizam substratos complexos se considera favorável para CCMs (PANDEY *et al.*, 2016). Assim mesmo, culturas

puras são utilizadas em grande medida na alimentação das CCMs devido a que resultam muito interessantes e uteis para a melhor compreensão dos processos bioeletroquímico que acontecem nos dispositivos de uma maneira mais simples.

É muito difícil tirar conclusões específicas relacionadas ao desempenho das CCMs usando apenas as características do substrato de efluentes porque existem vários fatores (por exemplo, configuração do reator, eletrodos usados, fonte de inóculo, tempo de operação, volume do reator, alto custo de capital, etc.) que pode influenciar fortemente no desempenho do tratamento e na produção de bioeletricidade deste biossistema (ELMEKAWY *et al.*, 2015; KOFFI; OKABE, 2020).

3.5.1 Efluentes da produção de biodiesel e geração de bioeletricidade nas CCMs

O biodiesel é um combustível alternativo, semelhante ao diesel convencional, usualmente produzido a partir de óleo vegetal cujas principais características são a biodegradabilidade, uma menor toxicidade do que o diesel, além de ser isento de enxofre e compostos aromáticos (FARIA; SILVA; PAIVA, 2020; GEBREMARIAM; MARCHETTI, 2017). Porém, o efluente bruto, principalmente da água de lavagem da purificação de biodiesel, como um efluente industrial, tem elevados valores de turbidez, DBO, DQO e ecotoxicidade (HOLANDA; MACIEL; SANTOS, 2012).

Um processo típico de produção de biodiesel é baseado na transesterificação alcalina de matérias-primas oleosas (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014). As principais etapas do processo são as seguintes: reação de transesterificação, separação da fase éster (biodiesel bruto) da fase metanol/glicerol, lavagem úmida da fase éster, separação do biodiesel do efluente e secagem do biodiesel (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014). A purificação do biodiesel bruto e a recuperação do excesso de álcool e glicerol são desejáveis para melhorar a qualidade do biodiesel e reduzir os custos de produção do biodiesel (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014) (Figura 5).

Para purificar o biodiesel bruto, a lavagem úmida é mais tradicional e amplamente utilizada para remover o excesso de contaminantes e sobras de produtos químicos de produção do biodiesel e a lavagem a seco usa uma resina de troca iônica ou pó de silicato de magnésio para remover impurezas (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014). No processo de lavagem úmida, água morna destilada é usada para remover glicerol, álcool, sais de sódio e sabões (DAUD *et al.*, 2015). A névoa de água é pulverizada sobre o produto não purificado e a mistura de água e impurezas é assentada e drenada como efluente (DAUD *et al.*, 2015). Além

disso, a planta de produção de biodiesel gera os fluxos de efluentes adicionais de outras áreas, incluindo o condensado de vapor, os efluentes do amaciamento de resíduos de processo, a água usada para lavar os equipamentos e pisos e efluentes sanitários (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014).

Figura 5- Fluxograma típico de produção de biodiesel, via transesterificação em meio alcalino



Fonte: adaptado de Ramos et al., 2011

O efluente do biodiesel é um líquido viscoso com cor branca opaca, alcalina e contém alto teor de óleo ou gordura residual, sais solúveis (cloretos e sulfatos), catalisadores remanescentes, sabão de sódio e potássio, e impurezas orgânicas (ácidos graxos livres, ésteres metílicos, acilgliceróis, metanol e glicerol) (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014). Estudos anteriores sobre as características do efluente de biodiesel foram feitos e normalmente é encontrado com altos teores de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos (SS), óleo e graxa (O&G) com vários níveis de pH dependendo do tipo de processo que está sendo usado (DAUD *et al.*, 2015). Com respeito a toxicidade do efluente, foi reportado que o efluente da água de lavagem da purificação de biodiesel enquadrou na classificação "muito tóxico" para o peixe *Danio rerio* com uma CL50 (48 horas) média de 13,94 % (HOLANDA; MACIEL; SANTOS, 2012), e com o crustáceo *Daphnia similis*, os ensaios de toxicidade indicaram que houve um aumento na toxicidade do efluente de biodiesel após 50 dias de experimento (FARIA; SILVA; PAIVA, 2020).

Muitos pesquisadores relataram características do biodiesel, como pH (na faixa de 3,3 e 11,2), DQO de 11 a 590 g L⁻¹ e DBO₅ na faixa de 1,6 a 300 g L⁻¹ (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014). Portanto, esse tipo de efluente precisa ser tratado de forma eficiente e vários tratamentos estão sendo estudados (DAUD *et al.*, 2015). Resulta evidente que o sistema de produção de biodiesel influencia fortemente as características do efluente (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014), como o teor de sólidos presentes no efluente do biodiesel é bastante elevado, inibe o crescimento de microrganismos e reduz as eficiências de remoção do tratamento biológico (SUEHARA *et al.*, 2005), porém o estudo deste tratamento é bastante limitado (DAUD *et al.*, 2015).

Devido à grande quantidade de efluente gerado durante o processo de produção do biodiesel (DAUD *et al.*, 2015) vários processos de tratamento foram desenvolvidos para os efluentes gerados pela produção de biodiesel via transesterificação em meio alcalino, tais como: (a) tratamentos físico-químicos, (b) tratamentos eletroquímicos, (c) tratamentos químicos e eletroquímicos acoplados, (d) oxidação avançada, (e) tratamentos biológicos e (f) tratamento integrado, incluindo processos de tratamento anteriores (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014). Contudo não se observa muitos trabalhos utilizando CCMs para tratamento de efluente do biodiesel.

Como compostos de nitrogênio e fósforo não são abundantes no efluente de biodiesel, para se usar este tipo de efluente em CCMs são necessários adicionar nutrientes a fim de garantir a sustentabilidade do crescimento bacteriano e permitir que o tratamento prossiga de maneira ideal (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014).

Devido à presença de inibidor de crescimento microbiano (SUEHARA *et al.*, 2005), efluentes de biodiesel podem ser difíceis de degradar naturalmente (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014). Além disso, na maioria dos casos, um pré-tratamento físicoquímico é necessário para atingir uma boa eficiência e uma operação eficaz do tratamento biológico a ser reduzida ao nível que favoreça as etapas subsequentes de processamento do efluente (VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ, 2014).

Mesmo assim, Sukkasem *et al.* (2011) reinventaram e renovaram um tipo de biocatalisador CCM denominado circuito de bio-filtro de fluxo ascendente (UBFC). O sistema desenvolvido foi combinado com um procedimento pré-fermentativo (PF) e um afluente ajustado. As condições ideais foram operadas com uma taxa de carregamento orgânico (OLR) de 30,0 g DQO L por dia, tempo de retenção hidráulica (TRH) de 1,04 dia, mantido em nível de pH 6,5-7,5 e aerado a 2 L min⁻¹. Uma resistência externa do circuito foi fixada em 10 k Ω . O processo proposto pode melhorar a qualidade do efluente bruto e obteve alta eficiência de

remoção de DQO de 15 g DQO L⁻¹d⁻¹ e o consumo total de energia foi de 0,152 kW kg⁻¹ DQO tratado. Os pesquisadores observaram que os sistemas UBFC são adequados para o tratamento de efluentes de biodiesel, no entanto, o problema do entupimento de bio-partículas no UBFC durante a operação precisou ser resolvido (SUKKASEM *et al.*, 2011). Por esse motivo, Sukkasem e Laehlah (2013) alteraram o material de base imobilizado para solucionar o problema de entupimento e estudaram o efeito da resistência externa na geração de energia a partir do efluente de biodiesel (SUKKASEM; LAEHLAH, 2013). Os resultados mostraram que a porcentagem de remoção de DQO aumentou em circuito aberto e a maior eficiência foi de até 67 % (2,01 g DQO L por dia) com uma resistência externa de 10 k Ω . O dispositivo gerou eletricidade muito baixa (35,62 mW m³ de volume do ânodo do BFC), talvez causado por um baixo grau de degradação, por uma longa distância entre os eletrodos ou sensibilidade do material (SUKKASEM; LAEHLAH, 2013). De qualquer forma, as vantagens gerais desta invenção foram adequadas para o tratamento de efluentes de biodiesel (SUKKASEM *et al.*, 2011).

Outro estudo relata a avaliação de membrana cerâmica (58-68 % de caulinita, 5-9 % esmectita, 15-26 % ilita) de baixo custo para à célula de combustível microbiana alimentada com efluente de biodiesel na câmara anódica. A arquitetura do sistema incluiu um grafeno como um ânodo condutor, malha de aço inoxidável como cátodo. O estudo da tensão de circuito aberto (OCV pelas siglas em inglês) atingiu um pico em torno de 800 ± 10 mV para o efluente de biodiesel, o que determina a tensão máxima possível dessa fonte. A produção de eletricidade produzida foi em torno de 0,0041 ± 0,0003 mA, densidade de potência apresentou pico de 0,15 ± 0,03 mW cm⁻² (BOSE; YADAV; STUDIES, 2018).

Embora este efluente apresente algumas dificuldades em termos de metabolismo bacteriano, há uma boa perspectiva para seu uso como substrato em CCM, tanto para diminuição de poluentes como para geração de energia, pois a tendência é aumentar a produção de biodiesel no Brasil e no mundo como alternativa ao combustível convencional.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL E SUBSTRATO DA CCM

A amostra do efluente da produção de biodiesel (BDW) foi coletada na Estação de Tratamento de Despejos Industriais (ETDI) de uma indústria de biodiesel localizada no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Este efluente é majoritariamente formado por água de lavagem das tubulações da planta industrial contendo resíduos da reação de transesterificação. Como este efluente possui pH da ordem de 3, portando muito diferente de um pH adequado para crescimento de bactérias eletrogeradoras, optou-se por coletar amostras de BDW após o tratamento físico-químico, pois este tratamento eleva o pH para aproximadamente 5.

Logo após a coleta as amostras foram armazenadas a 4 °C para evitar deterioração (ISLAM *et al.*, 2019), sendo que para análises de DQO do BDW *in natura*, preservou-se as amostras de acordo com método 1060C do *Standard Methods for Analysis for Water and Wastewater* (SMWW) (APHA, 2012).

Nos experimentos de formação de biofilme foram usados como substrato o BDW diluído (2: 10) com nutrientes adicionais (0,5 g L⁻¹ NaCl, 0,1 g L⁻¹ KCl, 0,2 g L⁻¹, NH₄Cl, 0,465 g L⁻¹ MgSO₄, 2 g L⁻¹ NaHCO₃, 6 g L⁻¹, K₂HPO₄, 3 g L⁻¹ KH₂PO₄) (SUEHARA *et al.*, 2005; READ *et al.*, 2014), e tamponado a pH 6,9 \pm 0,2 com NaOH 6 mol L⁻¹. Além disso, foi adicionado um co-substrato metabólico suplementar de acetato de sódio 30 mmol L⁻¹ (4,08 g L⁻¹).

4.2 CEPA BACTERIANA, CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E INOCULAÇÃO NA CCM

A cepa *Shewanella amazonensis* (ATCC[®] 700329TM) foi adquirida do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Esta cepa foi ativada em meio Luria Bertani (LB) e incubada a 37 ± 0,1 °C, em atmosfera aeróbica de acordo com as instruções do fornecedor. Em seguida amostras das cepas foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C no laboratório de Eletroquímica e Energia da Universidade Federal Fluminense, campus Volta Redonda (Rio de Janeiro, Brasil), para posterior uso como pré-inóculo.

O meio de crescimento bacteriano e os procedimentos foram adaptados de READ *et al.*,(2014) e PINTO *et al.*,(2018). A preparação e o crescimento do pré-inóculo de *S. amazonensis* foram realizados em condições aeróbias devido à versatilidade respiratória da cepa e a maior taxa de crescimento nessa condição.

O inóculo de *S. amazonensis* foi pré-cultivado em meio Luria Bertani agitado a 150 rpm por 24 horas, sob uma temperatura de $37 \pm 0,1$ °C em condições aeróbicas. Depois, 1 mL da cultura de bactéria pré-cultivada foi transferida para 50 mL de meio fresco contendo 0,5 g. L⁻¹ NaCl, 0,1 g L⁻¹ KCl, 0,2 g L⁻¹ NH₄Cl, 0,465 g L⁻¹, MgSO₄, 2 g L⁻¹ NaHCO₃, 6 g L⁻¹ K₂HPO₄, 3 g L⁻¹ KH₂PO₄, com 30 mmol L⁻¹ de acetato de sódio como doador de elétrons (fonte de carbono) e sem adição de receptores de elétrons como fumarato.

O crescimento bacteriano foi realizado por 15 horas em condições aeróbias até atingir uma OD600 = 1,7 (densidade óptica em 600 nm), a qual corresponde ao último quarto da fase logaritmica do crescimento bacteriano (MARASSI *et al.*, 2019). Logo depois a cultura de crescimento foi centrifugada (10 min., 5000 g) para obter um sedimento bacteriano, que foi lavado no meio recém-preparado descrito acima, sem receptores de elétrons e centrifugado novamente (10 min., 5000 g). Esse sedimento foi transferido para um meio também recémpreparado suplementado com acetato de sódio 30 mmol L⁻¹ e livre de fumarato de sódio. Depois de 15 minutos, 2 mL da cultura final foram utilizados para inocular a CCM.

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos e ajustados com NaOH 6 mol L⁻¹ para pH \pm 6,9 antes da inoculação.

4.3 CONFIGURAÇÃO E OPERAÇÃO DA CÉLULA BIOELETROQUÍMICA

Células bioeletroquímicas de câmara única com um esquema de três eletrodos (Figura 6) foram utilizadas para os estudos do biofilme, neste arranjo utilizou-se um frasco de vidro cilíndrico (volume útil de 100 mL) com três eletrodos compostos por um eletrodo de trabalho de tecido de carbono (área nominal específica=0,785 cm²), um eletrodo de referência de Ag/AgCl KCl sat., 0,195 V vs. SHE) e um eletrodo de espiral de Pt foi utilizado como contra eletrodo. Os eletrodos foram limpos com H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ por uma hora, em seguida, foi rinsado com água deionizada (DI) antes de cada experimento.



Figura 6- Esquema da célula de câmara única de três eletrodos utilizada para os experimentos. Eletrodo de referência utilizado foi Ag/AgCl KCl sat.

Duas células com a mesma configuração foram utilizadas nos experimentos: a célula sem aplicação de potencial, ou seja, em circuito aberto, foi denominada de "CCM controle". A outra célula, com a mesma configuração, mas submetida à aplicação de potencial positivo constante (+0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat.) para estimular o crescimento do biofilme na superfície do ânodo (eletrodo de trabalho), foi denominada "CCM potencial". Os dispositivos foram inoculados de forma simultânea e colocados sob temperatura ambiente.

O crescimento do biofilme foi realizado por meio de um experimento de cronoamperometría de semi-batelada sob um potencial anódico fixo (+0,3 V vs. Ag/AgCl KCl sat.) (PINTO; CORADIN; LABERTY-ROBERT, 2018; TANG *et al.*, 2017) a 30 °C. Primeiramente, os dispositivos foram preenchidos com o efluente da produção de biodiesel diluído e esterilizado (98 mL) em autoclave a 121 °C durante 20 minutos; posteriormente, uma alíquota de 2 mL da cultura final de *S. amazonensis* foi inoculada na célula selada da CCM potencial e CCM controle, respectivamente (ISLAM *et al.*, 2019). Para garantir condições anaeróbicas, o BDW diluído e esterilizado foi purgado com gás nitrogênio por 20 minutos antes do uso (PATIL *et al.*, 2011).

O crescimento do biofilme foi monitorado pela medição da corrente de oxidação bioeletrocatalítica e a solução de substrato esgotado foi substituída regularmente por uma solução de substrato nova (LIU *et al.*, 2008). Substrato e co-substrato foram fornecidos removendo 80 % (v/v) da solução anódica e substituindo por BDW diluído suplementado com acetato de sódio (fonte de carbono) (CARMONA-MARTÍNEZ *et al.*, 2013) aproximadamente

a cada 48 horas, portanto não foi inoculada nenhuma nova cultura até o final dos experimentos (PATIL *et al.*, 2011). Até o quinto ciclo da batelada, a reposição do substrato e co-substrato ocorreu para auxiliar a colonização do eletrodo com um perfil de corrente reprodutível (LIU *et al.*, 2008).

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS

As análises de caracterização físico-químicas foram realizadas em duplicatas conforme o SMWW, 22ª edição. Os parâmetros para caracterização foram DQO (APHA, 2012), e cromatografia de íons para cátions (MARASSI *et al.*, 2020).

As análises de DQO foram realizadas ao final de cada ciclo até decorridas 193 horas do experimento para verificar as porcentagens de eficiência na remoção de DQO, tanto para a CCM potencial como para a CCM controle. Nesta determinação a calibração foi realizada com ftalato de potássio monobásico (P.A. > 99,5%, Sigma – Aldrich) para a faixa de 50 mg O_2L^{-1} a 1000 mg O_2L^{-1} . A absorbância foi verificada no comprimento de onda de 600 nm por meio do espectrofotômetro modelo UV-vis -1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Para os cálculos de remoção de DQO foi usada a eficiência (η DQO) para cada batelada, e demonstrada abaixo:

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

Para o ensaio de cromatografia de íons para cátions foi adaptado o método utilizado por Marassi *et al.* (2020). Os cátions Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ foram determinados por meio do cromatógrafo de íons modelo 940 Professional IC Vario (Metrohm, Herisau, Switzerland), com um sistema de ultrafiltração e uma coluna Metrosep C4 (150/4.0) para cátions. O eluente utilizado para a leitura de cátions foi uma solução de HNO₃ (1,7 10⁻³ mol L⁻¹) e ácido dipiconílico (0,7 10⁻³ mol L⁻¹). Inicialmente, as amostras do BDW e dos dispositivos foram diluídas na proporção 1:2000 e filtradas com filtro seringa 0,45 µm. Logo depois as amostras foram colocadas em tubos vials para a leitura no equipamento. Os valores de limite de detecção (LD) determinado para cátions foram de: 0,903 mg L⁻¹, Na⁺; 0,955 mg L⁻¹, K⁺ e 0,592 mg L⁻¹ de Ca²⁺.

4.5 ANÁLISES BIOELETROQUÍMICAS

Todos os experimentos bioeletroquímicos foram conduzidos sob controle de potenciostato ModuLab Electrochemical System (Solartron Analytical, Farnborough, UK)

utilizando o eletrodo de referência Ag/AgCl KCl sat. (0,195 V vs. SHE) (CARMONA-MARTÍNEZ et al., 2013).

O crescimento do biofilme foi estudado utilizando-se as técnicas de cronoamperometria, voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Um potencial fixo + 0,3V vs Ag/AgCl KCl sat. foi aplicado entre os eletrodos de trabalho e contra eletrodo durante todos os ciclos do experimento na CCM potencial (PINTO; CORADIN; LABERTY-ROBERT, 2018). A CV foi realizada a uma taxa de varredura de 10 mV s⁻¹ (PINTO; CORADIN; LABERTY-ROBERT, 2018). dentro da faixa de potencial de +0,8 V a -0,1 V. Finalmente, as medições de impedância eletroquímica foram realizadas com o auxílio do módulo FRA acoplado ao potenciostato, com uma frequência variando de 100kHz-5mHz, e com um sinal AC de 10 mV (ISLAM *et al.*, 2019). Antes das medições eletroquímicas, os eletrodos foram deixados para estabilização em circuito aberto por 1 hora.

Para a obtenção das curvas do plano complexo e ilustrações dos experimentos foi utilizado o softaware Originlab 2019b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5 <u>RESULTADOS E DISCUSSÕES</u>

5.1 GERAÇÃO DE CORRENTE BIOELETROCATALITICA PELO BIOFILME ELETROATIVO PRIMÁRIO FORMADO POR Shewanella amazonensis

Diferentes pesquisas têm utilizado a técnica eletroquímica de cronoamperometria com potencial constante para a identificação da formação de biofilmes eletroativos em CCMs (GROBBLER *et al.*, 2018; PINTO; CORADIN; LABERTY-ROBERT, 2018; ROY *et al.*, 2014). Com a utilização desta ferramenta, a aplicação de um potencial de valor positivo e maior no ânodo, permite ao biofilme obter energia suficiente para transferir os elétrons para a superfície do eletrodo, portanto, a atividade metabólica das bactérias exoeletrogênicas aumenta e a troca de elétrons entre o biofilme e o eletrodo acontece, daí o processo de utilização do substrato catalisará a corrente para um valor máximo (YASRI; ROBERTS; GUNASEKARAN, 2019). Na Figura 7, observa-se o processo de formação do biofilme eletroativo de *S. amazonensis* e a geração de corrente catalítica no dispositivo aplicando um potencial de +0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat. Ao início, após a inoculação e a aplicação do potencial oxidativo, observou-se um processo de oxidação relacionado ao incremento inicial na corrente anódica do dispositivo até às 23 horas de operação. Seguidamente, verificou-se uma estabilização no valor da densidade de corrente (~14 μ A cm⁻²) das 23 horas até às 40 horas de operação.

Figura 7 - Geração de corrente bioeletrocatalitica pela formação de biofilme eletroativo primário de *S. amazonensis* na superfície do ânodo de tecido de carbono. O potencial aplicado ao eletrodo foi de 0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat. Co-substrato utilizado: acetato de sódio 30 mmol L⁻¹. As linhas divisórias indicam substituição de substrato no dispositivo durante os cinco ciclos de batelada alimentada



Depois da restituição do meio nas 40 horas, observa-se o maior pico de densidade de corrente (~22 μ A cm⁻²) às 43 horas de operação do experimento. Entre às 44 e 125 horas do experimento, houve uma diminuição gradual na densidade de corrente anódica com um único pico de corrente de 8,9 μ A cm⁻² nas 90 horas de operação. Os últimos três ciclos de operação do experimento denotam valores que se estabilizam entre 5 e 10 μ A cm⁻² de densidade de corrente (Figura 7).

Pinto *et al.* (2018) na sua pesquisa sobre o efeito da polarização do bioânodo formado por *S. oneidensis* sob um potencial de +0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat. no eletrodo de grafite, observaram uma etapa inicial de diminuição da corrente com valores que oscilam ao redor de 50 μ A e sugerem que potenciais elevados podem afetar a atividade bacteriana e a estabilidade da interface biofilme/eletrodo. Entretanto, na presente pesquisa, não se observaram valores de corrente muito dispersos no tempo para *S. amazonensis* nas condições experimentais aplicadas. Contudo, no experimento de Pinto *et al.* (2018) o valor médio de corrente anódica produzido por *S. oneidensis* apresentou-se significativamente maior do que a média de densidade de corrente observada no presente estudo para *S. amazonensis* (~8,7 μ A cm⁻²).

A produção de corrente por *S. amazonensis* a partir do substrato de efluente de biodiesel e o co-substrato de acetato de sódio 30 mmol L⁻¹ apresentou-se interessante, devido à complexidade dos compostos presentes no efluente bem como o co-substrato de acetato de sódio. Foi reportado que cepas de *Shewanella* spp. utilizam lactato e não acetato como fonte de carbono para os processos de oxidação em condições anaeróbicas, no entanto, Yoon *et al.* (2013) tem demostrado que pelo menos alguns dos indivíduos denitrificantes do gênero *Shewanella* como *S. loihica* PV-4 e *S. denitrificans* utilizam acetato como doador de elétrons para o processo de desnitrificação, mas não para a redução de fumarato ou do íon férrico (YOON; SANFORD; LÖFFLER, 2013).

Da mesma maneira, Inohana *et al.* (2020) reportam uma cepa bacteriana relacionada com *Shewanella algae* e *S. amazonensis* que exibiu a habilidade de gerar eletricidade a partir de ácidos orgânicos, incluindo acetato, e portanto, eles sugerem que cepas relativas à *S. algae* tem a capacidade de gerar eletricidade a partir dos produtos da fermentação, como acetato e propanato (INOHANA *et al.*, 2020). O aumento da corrente anódica relacionada à formação de um biofilme eletroativo na superfície do eletrodo na presente pesquisa, pode sugerir a utilização deste co-substrato por parte de *S. amazonensis* para a realização dos seus processos metabólicos em condições anaeróbicas. Contudo, nota-se que mais estudos precisam ser feitos sobre este tópico.

Roy *et al.* (2014) tem avaliado a formação do biofilme catalítico originado por *S. oneidensis* MR-1 sob um potencial aplicado ao ânodo de -0,3 V vs. Ag/AgCl por meio da medição da corrente bioeletrocatalítica gerada. Sob esse potencial, a corrente anódica incrementou-se a partir de 2,5 horas para depois se estabilizar após 5 horas do começo do experimento com uma corrente aproximada de 20 μ A (ROY *et al.*, 2014). Um comportamento similar foi observado na fase inicial do presente experimento. A densidade de corrente incrementou-se até 2,55 horas para logo experimentar um aumento gradativo na densidade corrente durante as seguintes 15 horas do experimento.

Estudos similares à presente pesquisa, realizados com *Shewanella* spp., apresentaram um crescimento repetível do biofilme sob potenciais oxidativos aplicados. Jain *et al.* (2012) observaram sob um potencial oxidativo positivo de 0,2 V vs Ag/AgCl KCl sat. o crescimento repetível do biofilme *S. loihica* PV-4 na superfície do eletrodo de grafite de células eletroquímicas com uma corrente máxima observada de 90 μ A cm⁻². Da mesma maneira, Carmona-Martínez *et al.* (2013) verificaram a formação do biofilme de *S. putrefaciens* em função ao potencial aplicado no ânodo sob condições anaeróbicas e identificaram uma densidade corrente de ~12 μ A cm⁻² sob um potencial aplicado de +0,4 V vs Ag/AgCl KCl sat. Os mesmos pesquisadores indicaram concordâncias com outros estudos da família Shewanellaceae, porém diferenças com estudos de culturas puras de biofilmes de espécies de *Geobacter* ou culturas mistas com predominância do gênero *Geobacter*, pois apresentam maiores densidades de corrente.

Finalmente, na presente pesquisa observou-se que além do dispositivo sob potencial aplicado, o dispositivo em circuito aberto apresentou a formação do biofilme de *S. amazonensis* na superfície do eletrodo, e se sugere que os microrganismos de *S. amazonensis* perceberam a diferença de potencial do eletrodo e conseguiram modular a estrutura e composição dos biofilmes para uma transferência de elétrons eficiente aos eletrodos (KITAYAMA *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2014). Por conseguinte, se poderia respaldar a hipótese que os potenciais mais negativos podem atingir densidades de corrente anódicas mais altas (ZHU *et al.*, 2014).

5.2 COMPORTAMENTO REDOX NA INTERFACE ELETRODO/BIOFILME

Ao registrar voltamogramas cíclicos sob condições de esgotamento do substrato, o comportamento observado depende de forma significativa do potencial de varredura do experimento, portanto, em taxas de varredura mais baixas do que 20 mV s⁻¹, a simplicidade do voltamograma dá lugar a um comportamento mais complexo (FRICKE; HARNISCH; SCHRÖDER, 2008), como também observado na presente pesquisa.

A explicação dos voltamogramas determinados para a condição de esgotamento de substrato não foi de fácil interpretação, semelhante ao observado por Carmona-Martinez *et al.* (2011) na sua análise da transferência de elétrons de *S. oneidensis* MR-1 e mutantes por meio da técnica de voltametria cíclica. Os mesmos autores expõem que este comportamento pode ser atribuído ao fato de que as densidades de corrente nos voltamogramas variam menos de uma ordem de magnitude o que indica um efeito catalítico bastante pequeno e portanto, baixa atividade bioeletrocatalítica de *S. oneidensis* nesse caso. Outros estudos de efeito do potencial em *S. amazonensis* ainda não foram abordados para uma possível comparação da atividade bioeletrocatalítica. Contudo, a intenção aqui é apresentar uma interpretação dos processos observados nos ensaios eletroquímicos realizados.

Na Figura 8, se expõe o comportamento redox das espécies presentes na interface eletrodo/biofilme de *S. amazonensis* durante as 245 horas do experimento com o dispositivo submetido a um potencial oxidativo (0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat.) e sem aplicação de potencial. Similar ao observado pelos pesquisadores Carmona-Martínez *et al.* (2013), todos os voltamogramas apresentam uma atividade bioeletrocatalítica crescente para potenciais maiores do que 0 V vs Ag/AgCl KCl sat. Porém, picos de redução e oxidação bioeletrocatalítica na faixa do potencial aplicado não foram observados, similar ao observado por Gao *et al.* (2019), na sua pesquisa sobre os mecanismos de EET em *S. oneidensis* MR-1.

Em termos de picos de densidade de corrente catalítica, na CCM potencial (Figura 8a), observou-se o maior pico de densidade de corrente catalítica (oxidação com 2007 μ A cm⁻²; redução com -5779 μ A cm⁻²) às 245 horas do experimento, e os menores picos de corrente anódica foram determinados nas 40 horas após o início do experimento (oxidação com 1554 μ A cm⁻²; redução com -4307 μ A cm⁻²) e no dispositivo no estado inicial (sem inóculo).

Um comportamento similar foi observado na CCM controle (Figura 8b), sem picos predominantes de processos oxidação e redução durante a aplicação da varredura de potencial determinada para o experimento. Contudo, se observaram picos de corrente maiores do que na CCM potencial que denotam a formação de um biofilme eletroativo de *S. amazonensis* na

superfície do eletrodo. A maior densidade de corrente observada foi nas 245 horas após o início do experimento (oxidação com 2279 μ A cm⁻²; redução com -4256 μ A cm⁻²), no entanto, as menores densidades de corrente catalítica observadas foram sem inóculo (oxidação com 458 μ A cm⁻²; redução com -602 μ A cm⁻²) e nas 40 horas após o início do experimento (oxidação com 1449 μ A cm⁻²; redução com -2132 μ A cm⁻²).

Figura 8 - Comportamento redox observado na interface eletrodo/biofilme eletroativo formado por *S. amazonensis* no dispositivo com potencial constante aplicado (CCM potencial) (a) e sem potencial (CCM controle) (b) durante o experimento. A taxa de varredura foi de 10 mV s⁻¹



Os resultados observados sugerem que as atividades eletroquímicas e a viabilidade dos biofilmes poderiam ter sido atenuadas sob o potencial oxidativo aplicado, em comparação com o dispositivo em circuito aberto (YANG *et al.*, 2019). Assim mesmo, Yang *et al.* (2019) observaram que o biofilme de *Geobacter sp.* que cresceu sob o potencial -0,2 e 0 V produz relativamente mais proteínas redox-ativas que facilitou a EET por meio da maior capacidade de troca de elétrons para o EPS produzido. No caso da *Shewanella* spp., foi observada que a abundância das proteínas que participam na EET de *S. oneidensis* também difere sob diferentes potenciais do eletrodo (GROBBLER *et al.*, 2018).

A Figura 9 apresenta uma comparação entre os maiores picos de densidades de corrente bioeletrocatalítica determinados nas CCM controle e CCM potencial. Observou-se os maiores picos de densidade de corrente após 245 horas na CCM controle em comparação à CCM potencial.

Figura 9 - Comparativa do comportamento redox observado na interface eletrodo/biofilme eletroativo formado por *S. amazonensis* nos dispositivos nos dispositivos CCM controle e CCM potencial durante o experimento. O potencial aplicado foi de 0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat. A taxa de varredura foi de 10 mV s⁻¹



A comparação entre as curvas de CV decorridas 245 horas do experimento para a CCM controle e CCM potencial apresenta uma estreita diferença na geração de densidade de corrente o que sugere que tanto os potenciais anódicos além dos substratos podem afetar o processo de formação de biofilme em sistemas bioeletroquímicos, mas não está claro o que determina principalmente a estrutura do biofilme no ânodo.

Ying *et al.* (2017) utilizaram vários dispositivos alimentados com diferentes substratos cultivados sob diferentes potenciais e indicaram que por meio da voltametria cíclica em condições de esgotamento do substrato (*non-turnover conditions*) os componentes de transferência extracelulares de elétrons foram uniformes utilizando acetato como substrato, devido à observação dos mesmos picos de oxidação em -0,36 e -0,17 V (vs. Ag/AgCl KCl sat.). Uma atividade similar foi observada na presente pesquisa por meio das primeiras derivadas dos voltamogramas conforme mostrado na Figura 10.

A técnica da primeira derivada das curvas dos voltamogramas permite o aprimoramento significativo na precisão da estimativa do potencial pico das curvas dos voltamogramas, além de melhorar a relação sinal-ruido e a possibilidade de bem avaliar e monitorar a estabilidade eletroquímica de biocatalisadores (MURTHY; MANTHIRAM, 2012). A aplicação da primeira derivada dos voltamogramas decorridas 245 horas do experimento para as CCM potencial e CCM controle são apresentadas na Figura 10.

Observou-se que tanto a varredura do potencial oxidativo quanto a do potencial redutivo não possuem pontos de inflexão relevantes, refletidos por dois máximos na curva derivada. Porém, se identificaram duas elevações menores centradas nos potenciais -0,23 V e -0,31 V na CCM potencial e CCM controle, que poderiam sugerir a transferência mediada de elétrons (MET) no sistema (GROBBLER *et al.*, 2018) por meio do mediadores solúveis como as flavinas (BARON *et al.*, 2009).

Porém, Pinto *et al.* (2018) observaram que sob um potencial oxidativo de +0,3 V no bioânodo se estimulou uma transferência direta de elétrons, resultando na rápida colonização de *S. oneidensis* nas fibras do eletrodo. Os mesmos pesquisadores agregaram que para um eletrodo não polarizado ou sob uma polarização em -0, 3 V vs Ag/AgCl KCl sat. se observou a produção de outros mediadores o uma modificação da interface mediador/grafite. Esta última observação feita pelo Pinto *et al.* (2018) coincide com os resultados da presente pesquisa, já que foi observada na primeira derivada do voltamograma da CCM controle duas elevações menores na faixa de potencial negativo que evidenciam a possível presença de mediadores solúveis produzidos pela *S. amazonensis*.

O mecanismo de transferência direta de elétrons ao eletrodo por parte da *S. amazonensis* não foi observado por meio das técnicas eletroquímicas utilizadas nas condições do experimento. De modo que, provavelmente o potencial oxidativo aplicado não conseguiu as condições de polarização altamente positivas que tornam o mecanismo DET cada vez mais eficaz com o tempo (PINTO; CORADIN; LABERTY-ROBERT, 2018) e conseguiu afetar a via de degradação de substratos complexos em sistemas bioeletroquímicos que finalmente

influenciou na produção de corrente, no entanto, as complexidades por trás dessa interação ainda precisam ser melhor entendidas (ZHAO *et al.*, 2020).





5.3 PROCESSOS RELACIONADOS À IMPEDÂNCIA ELETROQUIMICA NA FORMAÇÃO DO BIOFILME ELETROATIVO DE Shewanella amazonensis

A técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) permite medir a resistência à polarização do ânodo, que é o principal componente da resistência interna das células à combustível microbianas (SEKAR; RAMASAMY, 2013). Na Figura 11 apresenta diagramas de Nyquist do processo de formação de um biofilme eletroativo de *S. amazonensis* na superfície do eletrodo da CCM controle (sem potencial aplicado). Observou-se uma redução das resistências do sistema conforme avança o período experimental, similar ao observado por Faria, Silva e Paiva (2020) no seu estudo geração de bioeletricidade na CCM alimentada com efluente de biodiesel e inoculada com *S. oneidensis* e *C. butyricum*. Após 40 horas do início do experimento, o diagrama apresenta a formação de dois arcos capacitivos incompletos na zona de frequências medias e altas, com um valor limite de resistência, extrapolado ao eixo real, de $163 \ \Omega \ cm^{-2}$. Nas 245 horas, o valor máximo de resistência tem diminuído em ~11 %, com um valor limite extrapolado de $145 \ \Omega \ cm^{-2}$.

Figura 11 - Representação de Nyquist dos valores de impedância bioeletroquímica do processo de formação do biofilme eletroativo de *S. amazonensis* na superfície do ânodo da CCM controle durante um intervalo de 245 horas. Destaque com expansão de escala para o diagrama obtido a 0 (sem inóculo), 40, 83, 212 e 245 horas do experimento



O presente resultado se apresenta muito interessante devido à diminuição da resistência no sistema que sugere mudanças na interface biofilme/eletrodo, portanto, a possível formação de um biofilme eletroativo de *S. amazonensis*. Em 83 horas, a presença de dois arcos capacitivos semi-completos na zona de alta e média frequência é claramente observada por meio do diagrama de Nyquist. Na zona de baixas frequências se observa uma linha reta que representa a impedância de Warburg.

Na Figura 12, observa-se diagramas de Nyquist do processo de formação de um biofilme eletroativo de *S. amazonensis* na superfície do eletrodo que experimentou uma aplicação de potencial de 0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat.

Figura 12 - Representação de Nyquist dos valores de impedância bioeletroquimica do processo de formação do biofilme eletroativo de *S. amazonensis* na superfície do ânodo da CCM potencial durante um intervalo de 245 horas. Destaque com expansão de escala para o diagrama obtido a 0 (sem inóculo), 40, 83, 212 e 245 horas do experimento



Similar à CCM controle, observou-se uma redução das resistências do sistema no período experimental na CCM potencial. Após 40 horas do início do experimento, o diagrama apresentou a formação de um arco capacitivo incompleto na zona de altas frequências, com um valor limite de resistência extrapolado ao eixo real de 110 Ω cm⁻². Em 245 horas, o valor máximo de resistência diminuiu em ~2,7 %, com um valor limite extrapolado de 107 Ω cm⁻². Similar ao observado por Jung (2014), o diagrama de Nyquist apresentou uma morfologia de

arcos em alta frequência muito similares a da presente pesquisa e se apresentaram maiores do que os arcos observados em ânodos cobertos por biofilmes de *G. sulfurreducens* PCA.

Tanto nos diagramas de Nyquist da CCM potencial e da CCM controle foram observados as resistências à transferência de carga como principais componentes devido a uma possível limitação cinética devido às lentas taxas de reação no ânodo (SEKAR; RAMASAMY, 2013) e uma impedância de Warburg (resistência por difusão). Mesmo assim, uma diminuição na Rct durante o experimento e o aumento na densidade de corrente evidenciaram a formação de um biofilme eletroativo na superfície do eletrodo (MIN *et al.*, 2017).

5.4 CAPACIDADE DE OXIDAÇÃO DO BIOFILME POR MEIO DA REMOÇÃO DE DQO NA CÉLULA À COMBUSTIVEL MICROBIANA

Em relação à concentração de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica presente no efluente da produção de biodiesel, observou-se uma diminuição flutuante dos valores durante o processo de formação do biofilme de *S. amazonensis* nos dispositivos com e sem aplicação de potencial. O valor inicial da concentração de DQO do efluente de biodiesel bruto foi de 192.237 mg L⁻¹. Logo depois, com a diluição inicial do efluente para o começo do tratamento nos dispositivos, a concentração de DQO diminui ~9 %. Na Figura 13 apresentam-se a concentração média de DQO das amostras decorridas 193 horas do experimento para os dispositivos controle e sob potencial aplicado.





As porcentagens de remoção de DQO decorridas 40 horas do experimento foram 84 e 85 % para a CCM potencial e CCM controle respectivamente. Consequentemente, pode-se afirmar que neste intervalo os organismos de *S. amazonensis* oxidaram uma grande quantidade de substrato durante o experimento. Além disso, no mesmo intervalo de tempo (0 - 40 horas) foi observado um aumento da corrente anódica na CCM controle e CCM potencial produzido pela formação de biofilme eletroativo pelo microrganismo estudado. Similarmente, Sukkasem e Laehlah (2013) observaram uma porcentagem de remoção de DQO numa CCM adequada para o tratamento de efluente de biodiesel, que aumentou sob circuito aberto e apresentou uma maior eficiência na remoção de até 67 % com uma resistência externa de10 k Ω .

Após as 40 horas de tratamento, apresentou-se concentrações de DQO flutuantes no experimento para as CCM controle e CCM potencial. A flutuação observada nas concentrações de DQO durante o experimento pode ser decorrente da colonização inicial do ânodo pela bactéria e da formação de um biofilme primário, nos estágios de fixação inicial e irreversível (ARUNASRI; MOHAN, 2019; MUKHERJEE *et al.*, 2020), o que poderia significar variações iniciais na oxidação do substrato, porém, num estágio posterior de maduração do biofilme (biofilme secundário) uma diminuição linear e significativa na concentração de DQO seria desejável.

Finalmente, decorridas 193 horas do início do experimento se observou uma porcentagem de remoção final de aproximadamente 84 e 86 % para a CCM potencial e CCM controle, respectivamente. Esse fato evidenciou a capacidade de oxidação dos biofilmes eletroativos formados nas superfícies dos eletrodos nas células. Uma porcentagem similar foi observada por Ngan, Nguyen e Le (2020) no estudo da recuperação de energia do efluente por meio da geração de energia elétrica em CCMs inoculadas com *S. oneidensis* MR-1, onde a porcentagem de remoção observada foi no intervalo de 75 % - 83 % após 8 dias operacionais seguidos do processo de aclimatação.

5.5 REMOÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Na⁺, K⁺ E Ca²⁺ NO PROCESSO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME PRIMÁRIO DE *S. amazonensis*

Os íons metálicos podem ter um papel importante no aumento ou diminuição da performance dos sistemas bioeletroquímicos (LU *et al.*, 2015). No processo de produção do biodiesel, catalisadores como hidróxido de sódio e potássio são utilizados, portanto, a presença de cátions de Na⁺, K⁺ e outros no efluente pode ser observada.

Na Figura 14 apresentam-se as diferentes concentrações dos cátions sódio, cálcio e potássio nas amostras durante o experimento. Observou-se um comportamento flutuante da concentração dos cátions estudados nas amostras, sem uma diminuição linear desde o início até o final do experimento. Comportamentos similares foram observados tanto para a CCM potencial e CCM controle.

Figura 14- Concentração de íons Na⁺ (a), K⁺ (b) e Ca²⁺ (c) nas amostras da CCM alimentada com efluente de biodiesel



A concentração de íons Na⁺ no efluente bruto observada foi de 7375 mg L⁻¹. Com a diluição inicial do efluente de biodiesel bruto antes do início do tratamento na CCM potencial, foi observada uma concentração de íons Na⁺ de 4328,5 mg L⁻¹. Decorridas 40 horas do início do experimento, foi observada uma tendencia de diminuição de 7 % (4059 mg L⁻¹) na concentração inicial da solução utilizada na CCM potencial. Logo após não foi observada uma diminuição linear da concentração de íons Na⁺ nas amostras da CCM potencial e CCM controle.

Evidenciou-se um comportamento similar na concentração de íons Na⁺ na CCM controle durante as 193 horas do experimento.

A maior concentração inicial e final de cátions nas amostras foi observada nos íons K^+ . A concentração de íons K^+ no efluente bruto foi de 17495 mg L⁻¹. Com a diluição inicial do efluente de biodiesel bruto com o meio fresco utilizado na CCM para o início do tratamento, foi observada uma concentração de íons K^+ de 7664 mg L⁻¹ nas amostras. Decorridas 40 horas do início do experimento uma tendencia de diminuição do 39 % na concentração inicial do experimento foi observada (4626 mg L⁻¹). Logo depois não foi observada uma diminuição linear da concentração de íons K^+ no experimento.

Um comportamento similar foi observado para a concentração de íons Ca²⁺ nas amostras da CCM. A concentração de íons Ca²⁺ do efluente bruto foi de 3058 mg L⁻¹. Com a diluição inicial do efluente de biodiesel bruto para o início do tratamento experimento na CCM, foi observada uma concentração de íons Ca²⁺ das amostras de 968 mg L⁻¹. Logo depois não foi observada uma tendencia de diminuição linear da concentração de íons Ca²⁺ nas amostras da CCM potencial.

Os resultados observados para os íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ apresentam um comportamento similar. Uma tendencia de maior remoção de cátions observada foi nas 40 horas de tratamento nos dispositivos tanto CCM potencial como CCM controle, logo após, se apresentou um comportamento flutuante da concentração de íons na solução sob tratamento. Esse comportamento não linear com aumentos nas concentrações poderia ter sido devido a um aumento da degradação em termos de DQO que resultou na disponibilização dos cátions no meio (MARASSI *et al.*, 2020). Assim mesmo, alguns íons metálicos como o Na⁺ aumentam a condutividade do eletrólito e diminuem a resistência interna nas CCMs (LU *et al.*, 2015), similar ao observado na presente pesquisa, aonde se observou uma diminuição de resistência interna dos dispositivos e uma concentração dos íons flutuante.

No caso específico dos íons Ca²⁺, que na concentração adequada poderia potencializar a formação de biofilmes nos ânodos aumentando a agregação microbiana por meio da influência na secreção da matriz EPS (sugerida como um semicondutora) (LU *et al.*, 2015), não apresentou uma diminuição linear após as 40 horas de tratamento, porém, um comportamento estável decorridas as horas do experimento.

6 <u>CONCLUSÃO</u>

A partir do que foi desenvolvido e apresentado no presente estudo, cujo objetivo consistiu em determinar os efeitos do potencial aplicado no ânodo na formação de um biofilme eletroativo primário produzido por *S. amazonensis*, em célula à combustível microbiana alimentada com efluente de biodiesel, concluiu-se que:

– O biofilme eletroativo primário de *S. amazonensis* foi formado nas 245 horas de operação do experimento sob um potencial oxidativo de 0,3 V vs Ag/AgCl KCl sat.; com uma máxima densidade de corrente observada de ~22 μ A cm⁻² decorridas 42 horas do experimento e uma mínima densidade de corrente observada de 4,08 μ A cm⁻² após 124 horas de operação;

– Não se observaram picos definidos de oxidação e redução do substrato pela S. amazonensis no período de operação dos dispositivos sem ou com potencial aplicado. Contudo, a primeira derivada dos voltamogramas evidenciou processos mediados de transferência de elétrons característicos de Shewanella spp.;

 A diminuição da resistência de transferência carga de elétrons à interface durante o experimento em ambos os dispositivos está relacionado diretamente com a formação do biofilme eletroativo;

A porcentagem de eficiência na remoção final de DQO observada foi de 84 % e 86
% para CCM potencial e CCM controle, respetivamente, o que evidencia a oxidação do substrato de efluente de biodiesel diluído e co-substrato de acetato de sódio;

 Não foi observada durante a operação do experimento uma diminuição linear continua na concentração dos íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ nas amostras dos dispositivos controle e com potencial aplicado.

Por fim, se observaram efeitos do potencial oxidativo aplicado na formação de um biofilme eletroativo de *S. amazonensis* na superfície do eletrodo no dispositivo CCM alimentado com efluente de biodiesel. Contudo, estudos mais aprofundados poderiam ser realizados, no sentido de se investigar a influência de outros potenciais oxidativos ou redutivos na formação de biofilme eletroativo de *S. amazonensis*.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A presente pesquisa sugere para futuros trabalhos:

 Avaliar a estabilidade do biofilme durante um período considerado amplo em termos de tratamento de fluente;

- Estudar a performance do biofilme secundário formado neste tipo de efluente;
- Empregar consórcio de microrganismos para a formação do biofilme;
- Utilizar outras técnicas eletroquímicas como voltametria de pulso diferencial para estudar o comportamento do biofilme e,
- Avaliar a influência da matriz de substâncias poliméricas extracelulares no mecanismo de condução elétrica dentro do biofilme.

8 <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>

ANGELAALINCY, M. J. et al. Biofilm Engineering Approaches for Improving the Performance of Microbial Fuel Cells and Bioelectrochemical Systems. Frontiers in Energy Research, v. 6, n. Julho, p. 1–12, 2018.

ANGENENT, L. T.; WU, M. Oxygen Tension and Riboflavin Gradients Cooperatively Regulate the Migration of Shewanella oneidensis MR-1 Revealed by a Hydrogel-Based Microfluidic Device. Frontiers in Microbiology, v. 7, n. Setembro, p. 1–12, 2016.

ANTOLINI, E. Composite materials for polymer electrolyte membrane microbial fuel cells. Biosensors and Bioelectronics, v. 69, p. 54–70, 2015.

APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, 2012.

ARUNASRI, K.; MOHAN, S. V. Biofilms: Microbial life on the electrode surface. Biomass, Biofuels, Biochemicals: Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation, p. 295–313, 2019a.

BARON, D. et al. Electrochemical Measurement of Electron Transfer Kinetics by *Shewanella oneidensis* MR-1 *. Journal of Biological Chemistry, v. 284, n. 42, p. 28865–28873, 2009.

BEEGLE, J. R.; BOROLE, A. P. Exoelectrogens for Microbial Fuel Cells. In: Progress and Recent Trends in Microbial Fuel Cells. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 193–230.

BIMAKR, F. et al. Assessing graphite and stainless-steel for electrochemical sensing of biofilm growth in chlorinated drinking water systems. Sensors and Actuators, B: Chemical, v. 277, n. Junho, p. 526–534, 2018.

BOSE, D.; YADAV, D.; STUDIES, E. Biodiesel wastewater treatment and power generation using earthen membrane microbial fuel cell. Nature Environment and Pollution Technology, v. 17, n. 4, p. 1293–1297, December, 2018.

BOSIRE, E. M.; ROSENBAUM, M. A. Electrochemical potential influences phenazine production, electron transfer and consequently electric current generation by *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Microbiology, v. 8, n. Maio, p. 1–11, 2017.

BREUER, M. et al. Multi-haem cytochromes in *Shewanella oneidensis* MR-1: Structures, functions and opportunities. Journal of the Royal Society Interface, v. 12, n. 102, 2015.

CAI, T. et al. Application of advanced anodes in microbial fuel cells for power generation: A review. Chemosphere, v. 248, 2020.

CARMONA-MARTINEZ, A. A. et al. Cyclic voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants. Bioelectrochemistry, v. 81, n. 2, p. 74–80, 2011.

CARMONA-MARTÍNEZ, A. A. et al. Electron transfer and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* as function of anode potential. Bioelectrochemistry, v. 93, p. 23–29, 2013.

CHEN, H.; DONG, F.; MINTEER, S. D. The progress and outlook of bioelectrocatalysis for the production of chemicals, fuels and materials. Nature Catalysis, v. 3, n. 3, p. 225–244, 2020.

CHIRANJEEVI, P.; PATIL, S. A. Strategies for improving the electroactivity and specific metabolic functionality of microorganisms for various microbial electrochemical technologies. Biotechnology Advances, v. 39, n. Junho 2019, p. 107468, 2020.

CHOI, S.; KIM, B.; CHANG, I. S. Tracking of Shewanella oneidensis MR-1 biofilm formation of a microbial electrochemical system via differential pulse voltammetry. Bioresource Technology, v. 254, n. Janeiro, p. 357–361, 2018.

CHOUDHARY, Y. S.; JOTHI, L.; NAGESWARAN, G. Electrochemical Characterization. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 2

CORNELL, W. C. et al. Phenazine oxidation by a distal electrode modulates biofilm morphogenesis. Biofilm, v. 2, n. Dezembro 2019, p. 100025, 2020.

CZERWIŃSKA-GŁÓWKA, D.; KRUKIEWICZ, K. A journey in the complex interactions between electrochemistry and bacteriology: From electroactivity to electromodulation of bacterial biofilms. Bioelectrochemistry, v. 131, 2020.

DAS, S. et al. Polymer electrolyte membranes for microbial fuel cells: Part b. non-nafion alternative membranes. [s.l.] Elsevier B.V., 2018.

DAUD, N. M. et al. Production of biodiesel and its wastewater treatment technologies. Process Safety and Environmental Protection, v. 94, p. 487–508, 2015.

EDWARDS, M. J. et al. Role of multiheme cytochromes involved in extracellular anaerobic respiration in bacteria. Protein Science, v. 29, n. 4, p. 830–842, 2020.

ELMEKAWY, A. et al. 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. 213–225, 2015.

FARBER, P. et al. Electricity generation in a microbial fuel cell with textile carbon fibre anodes. Computers and Mathematics with Applications, 2019.

FARIA, L.; SILVA, G. C.; PAIVA, T. C. DE. Geração de Energia em uma Célula a Combustível Microbiana Alimentada com Efluente da Produção de Biodiesel. [s.l: s.n.].

FENG, Y. et al. Treatment of biodiesel production wastes with simultaneous electricity generation using a single-chamber microbial fuel cell. Bioresource Technology, v. 102, n. 1, p. 411–415, 2011.

FILMAN, D. J. et al. Cryo-EM reveals the structural basis of long-range electron transport in a cytochrome-based bacterial nanowire. Communications Biology, v. 2, n. 219, p. 19–24, 2019.

FRICKE, K.; HARNISCH, F.; SCHRÖDER, U. On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. Energy and Environmental Science, v. 1, n. 1, p. 144–147, 2008.

GAO, L. et al. Mediation of Extracellular Polymeric Substances in Microbial Reduction of Hematite by *Shewanella oneidensis* MR-1. v. 10, n. March, p. 1–12, 2019.

GEBREMARIAM, S. N.; MARCHETTI, J. M. Biodiesel production technologies: Review. [s.l: s.n.]. v. 5

GLASSER, N. R.; SAUNDERS, S. H.; NEWMAN, D. K. The Colorful World of Extracellular

Electron Shuttles. Annual Review of Microbiology, v. 71, n. Julho, p. 731–751, 2017.

GORBY, Y. A. et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella* oneidensis strain MR-1 and other microorganisms. v. 106, n. 17, p. 7028–7033, 2006.

GROBBLER, C. et al. Effect of the anode potential on the physiology and proteome of *Shewanella oneidensis* MR-1. Bioelectrochemistry, v. 119, p. 172–179, 2018.

GUO, Y. et al. Effects of biofilm transfer and electron mediators transfer on *Klebsiella quasipneumoniae* sp. 203 electricity generation performance in MFCs. Biotechnology for Biofuels, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2020.

HEIJNE, A. TER et al. Electron Storage in Electroactive Biofilms. v. 39, n. 1, p. 34-42, 2020.

HOLANDA, J. N.; MACIEL, A. P.; SANTOS, R. L. Avaliação Ecotoxicológica da Água de Lavagem da Purificação de Biosiesel de Soja Metílico Utilizando Danio rerio Como Organismo-Teste. Boletim do Laboratório de Hidrobiolgia, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2012.

HONG, G.; PACHTER, R. Bound Flavin — Cytochrome Model of Extracellular Electron Transfer in *Shewanella Oneidensis*: Analysis by Free Energy Molecular Dynamics Simulations. 2016.

INOHANA, Y. et al. *Shewanella algae* Relatives Capable of Generating Electricity from Acetate Contribute to Coastal-Sediment Microbial Fuel Cells Treating Complex Organic. Microbes and Environments, v. 35, n. 2, 2020.

ISLAM, M. A. et al. Biofilm re-vitalization using hydrodynamic shear stress for stable power generation in microbial fuel cell. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 844, n. Maio, p. 14–22, 2019.

JAROSZ, M. et al. Novel bioelectrodes based on polysaccharide modified gold surfaces and electrochemically active Lactobacillus rhamnosus GG biofilms. Electrochimica Acta, v. 296, p. 999–1008, 2019.

JUNG, S. P. Impedance Analysis of Geobacter sulfurreducens PCA, Shewanella oneidensis MR-1, and their Coculture in Bioeletrochemical Systems. n. November 2012, 2014.

KIPF, E. et al. Systematic investigation of anode materials for microbial fuel cells with the model organism *G. sulfurreducens*. Bioresource Technology Reports, v. 2, p. 29–37, 2018.

KIRAN, R.; PATIL, S. A. Microbial Electroactive Biofilms. ACS Symposium Series, v. 1323, p. 159–186, 2019.

KITAYAMA, M. et al. Structures, Compositions, and Activities of Live *Shewanella* Biofilms Formed on Graphite Electrodes in Electrochemical. v. 83, n. 17, p. 1–11, 2017.

KOFFI, N. J.; OKABE, S. Domestic wastewater treatment and energy harvesting by serpentine up-flow MFCs equipped with PVDF-based activated carbon air-cathodes and a low voltage booster. Chemical Engineering Journal, v. 380, n. Agosto 2019, 2020.

KUMAR, A. et al. The ins and outs of microorganism-electrode electron transfer reactions. Nature Reviews Chemistry, v. 1, p. 1–13, 2017.

KUMAR, P. et al. Polymer electrolyte membranes for microbial fuel cells: Part a. nafion-based membranes. [s.l.] Elsevier B.V., 2018.

KUMAR, S. S. et al. Microbial fuel cells (MFCs) for bioelectrochemical treatment of different wastewater streams. Fuel, v. 254, n. Maio, p. 115526, 2019.

LI, C.; LESNIK, K. L.; LIU, H. Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. Energies, v. 6, n. 9, p. 4739–4768, 2013.

LI, T.; LI, R.; ZHOU, Q. The Application and Progress of Bioelectrochemical Systems (BESs) in Soil Remediation : A Review. [s.l.] Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, 2020.

LIN, T. et al. Engineered Shewanella oneidensis-reduced graphene oxide biohybrid with enhanced biosynthesis and transport of flavins enabled a highest bioelectricity output in microbial fuel cells. Nano Energy, v. 50, n. Maio, p. 639–648, 2018.

LIU, X.; SHI, L.; GU, J. D. Microbial electrocatalysis: Redox mediators responsible for extracellular electron transfer. Biotechnology Advances, v. 36, n. 7, p. 1815–1827, 2018.

LIU, Y. et al. Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. Biosensors and Bioelectronics, v. 24, n. 4, p. 1006–1011, 2008.

LOGAN, B. E. et al. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. Nature Reviews Microbiology, v. 17, n. 5, p. 307–319, 2019.

LOVLEY, D. R. et al. Geobacter Protein Nanowires. Frontiers in Microbiology, v. 10, n. Setembro, 2019.

LU, Z. et al. Behavior of metal ions in bioelectrochemical systems : A review. Journal of Power Sources, v. 275, p. 243–260, 2015.

MARASSI, R. J. et al. High strength bioethanol wastewater inoculated with single-strain or binary consortium feeding air-cathode microbial fuel cells. Environmental Progress and Sustainable Energy, v. 38, n. 2, p. 380–386, 2019.

MARASSI, R. J. et al. Performance and toxicity assessment of an up-flow tubular microbial fuel cell during long-term operation with high-strength dairy wastewater. Journal of Cleaner Production, v. 259, 2020.

MÉNDEZ-TOVAR, M.; GARCÍA-MEZA, J. V.; GONZÁLEZ, I. Electrochemical monitoring of *Acidithiobacillus thiooxidans* biofilm formation on graphite surface with elemental sulfur. Bioelectrochemistry, v. 128, p. 30–38, 2019.

MILTON, R. D.; MINTEER, S. D. Direct enzymatic bioelectrocatalysis: Differentiating between myth and reality. Journal of the Royal Society Interface, v. 14, n. 131, 2017.

MIN, D. et al. Enhancing Extracellular Electron Transfer of Shewanella oneidensis MR-1 through Coupling Improved Flavin Synthesis and Metal-Reducing Conduit for Pollutant Degradation. 2017.

MOSCOVIZ, R. et al. Novel Outlook in Microbial Ecology: Nonmutualistic Interspecies Electron Transfer. Trends in Microbiology, v. 28, n. 4, p. 245–253, 2020.

MUKHERJEE, M. et al. Shewanella biofilm development and engineering for environmental and bioenergy applications. Current Opinion in Chemical Biology, v. 59, p. 84–92, 2020.

MURTHY, A.; MANTHIRAM, A. Application of Derivative Voltammetry in the Analysis of Methanol Oxidation Reaction. 2012.

NGAN, H.; NGUYEN, T. D.; LE, L. M. Power generation of *Shewanella oneidensis* MR-1 microbial fuel cells in bamboo fermentation effluent. International Journal of Hydrogen Energy, p. 1–10, 2020.

NIMJE, V. R. et al. Glycerol degradation in single-chamber microbial fuel cells. Bioresource Technology, v. 102, n. 3, p. 2629–2634, 2011.

NIMJE, V. R. et al. Comparative bioelectricity production from various wastewaters in microbial fuel cells using mixed cultures and a pure strain of *Shewanella oneidensis*. Bioresource Technology, v. 104, p. 315–323, 2012.

NOCELLI, N. et al. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. Materials, v. 9, n. 6, 2016.

OKAMOTO, A. et al. Microbial Electrochemical Technologies Producing Electricity and Valuable Chemicals from Biodegradation of Waste Organic Matters. n. Maio, 2016.

PALANISAMY, G. et al. A comprehensive review on microbial fuel cell technologies: Processes, utilization, and advanced developments in electrodes and membranes. Journal of Cleaner Production, v. 221, p. 598–621, 2019.

PANDEY, P. et al. Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. Applied Energy, v. 168, p. 706–723, 2016.

PANKRATOVA, G.; HEDERSTEDT, L.; GORTON, L. Extracellular electron transfer features of Gram-positive bacteria. Analytica Chimica Acta, v. 1076, p. 32–47, 2019.

PATIL, S. A. et al. Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of pH on biofilm formation, performance and composition. Bioresource Technology, v. 102, n. 20, p. 9683–9690, 2011.

PINTO, D.; CORADIN, T.; LABERTY-ROBERT, C. Effect of anode polarization on biofilm formation and electron transfer in *Shewanella oneidensis*/graphite felt microbial fuel cells. Bioelectrochemistry, v. 120, p. 1–9, 2018.

QIAO, Y. J. et al. Biofilm promoted current generation of Pseudomonas aeruginosa microbial fuel cell via improving the interfacial redox reaction of phenazines. Bioelectrochemistry, v. 117, p. 34–39, 2017.

RAMOS, Luiz Pereira et al. Tecnologias de produção de biodiesel. Revista virtual de química, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.

RAKIUL ISLAM, S.; PARK, S.-Y.; BALASINGAM, B. Unification of Internal Resistance Estimation Methods for Li-Ion Batteries Using Hysteresis-Free Equivalent Circuit Models. p. 13–19, 2020.

RATHOUR, R. et al. Treatment of various types of wastewaters using microbial fuel cell systems. [s.l.] Elsevier B.V., 2018.

READ, S. T. et al. Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes.

BMC Microbiology, v. 10, 2010.

ROY, J. N. et al. Electrochimica Acta Catalytic biofilm formation by *Shewanella oneidensis* MR-1 and anode characterization by expanded uncertainty. v. 126, p. 3–10, 2014.

SCHRÖDER, U.; HARNISCH, F.; ANGENENT, L. T. Microbial electrochemistry and technology: Terminology and classification. Energy and Environmental Science, v. 8, n. 2, p. 513–519, 2015.

SEKAR, N.; RAMASAMY, R. P. Electrochemical impedance spectroscopy for microbial fuel cell characterization. Journal of Microbial and Biochemical Technology, v. 5, n. SPECIALISSUE.2, 2013.

SEMENEC, L.; E FRANKS, A. Delving through electrogenic biofilms: from anodes to cathodes to microbes. AIMS Bioengineering, v. 2, n. 3, p. 222–248, 2015.

SUEHARA, K. I. et al. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 100, n. 4, p. 437–442, 2005.

SUKKASEM, C. et al. Upflow bio-filter circuit (UBFC): Biocatalyst microbial fuel cell (MFC) configuration and application to biodiesel wastewater treatment. Bioresource Technology, v. 102, n. 22, p. 10363–10370, 2011.

SUKKASEM, C.; LAEHLAH, S. Development of a UBFC biocatalyst fuel cell to generate power and treat industrial wastewaters. Bioresource Technology, v. 146, p. 749–753, 2013.

SULTANA, S. T.; BABAUTA, J. T.; BEYENAL, H. Electrochemical biofilm control: A review. Biofouling, v. 31, n. 9, p. 745–758, 2015.

SUN, D. et al. The effect of biofilm thickness on electrochemical activity of Geobacter sulfurreducens. International Journal of Hydrogen Energy, v. 41, n. 37, p. 16523–16528, 2016.

TANG, Y. et al. Analysis of electricity generation and community of electroactive biofilms enriched from various wastewater treatment stages. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 803, n. 22, p. 72–80, 2017.

TELEGDI, J.; SHABAN, A.; VASTAG, G. Biocorrosion-steel. Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry, p. 28–42, 2018.

VELJKOVIĆ, V. B.; STAMENKOVIĆ, O. S.; TASIĆ, M. B. The wastewater treatment in the biodiesel production with alkali-catalyzed transesterification. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 32, p. 40–60, 2014.

VIRDIS, B.; DENNIS, P. G. The nanostructure of microbially-reduced graphene oxide fosters thick and highly-performing electrochemically-active biofilms. Journal of Power Sources, v. 356, p. 556–565, 2017.

WU, X. et al. Shewanella putrefaciens CN32 outer membrane cytochromes MtrC and UndA reduce electron shuttles to produce electricity in microbial fuel cells. Enzyme and Microbial Technology, v. 115, n. Março, p. 23–28, 2018.

XU, S.; JANGIR, Y.; EL-NAGGAR, M. Y. Disentangling the roles of free and cytochromebound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1. Electrochimica Acta, v. 198, p. 49-55, 2016.

YANG, G. et al. Anode potentials regulate Geobacter biofilms: New insights from the composition and spatial structure of extracellular polymeric substances. Water Research, v. 159, p. 294–301, 2019.

YANG, Z.; YANG, A. Modelling the impact of operating mode and electron transfer mechanism in microbial fuel cells with two-species anodic biofilm. Biochemical Engineering Journal, v. 158, n. Novembro 2019, p. 107560, 2020.

YASRI, N.; ROBERTS, E. P. L.; GUNASEKARAN, S. The electrochemical perspective of bioelectrocatalytic activities in microbial electrolysis and microbial fuel cells. Energy Reports, v. 5, p. 1116–1136, 2019.

YOON, S.; SANFORD, R. A.; LÖFFLER, F. E. Shewanella spp. Use acetate as an electron donor for denitrification but not ferric iron or fumarate reduction. Applied and Environmental Microbiology, v. 79, n. 8, p. 2818–2822, 2013.

ZHAO, F. et al. The effect of anode potential on current production from complex substrates in bioelectrochemical systems: a case study with glucose. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 104, n. 11, p. 5133–5143, 2020.

ZHU, X. et al. Microbial community composition is unaffected by anode potential. Environmental Science and Technology, v. 48, n. 2, p. 1352–1358, 2014.