

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS DE COMBUSTÍVEL
MICROBIANAS

DÉBORA ROSA LEHNEN

Dissertação de Mestrado

PORTO ALEGRE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DÉBORA ROSA LEHNEN

**DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS DE COMBUSTÍVEL
MICROBIANAS**

Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do
título de mestre em química.

Prof. Dr. Dimitrios Samios
Orientador

Porto Alegre, abril de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dimitros Samios, que mesmo passando por momentos difíceis permaneceu forte, apoiando os objetivos dos seus alunos.

Ao Prof. Allon Hochbaum que me aceitou de braços abertos em seu laboratório e confiou no meu trabalho dando todo suporte de que precisei.

Aos colegas da UCI, John por todos os ensinamentos pacientemente compartilhados e discutidos; Arumina, pelas horas divididas no microscópio confocal; Nicole, pelas palavras diárias de gentileza; Tyler, pelas complexas explicações; Zack, por me introduzir na cultura californiana; Sun Jun, pelos cafés da tarde e a todos pela presteza, companheirismo, amizade e saudade que ficou.

Aos meus colegas que viraram amigos do CECOM/LINDIM e do IQ.

Ao Samuel, pelo apoio, suporte e amor sem o qual esse trabalho não teria acontecido.

À minha família pelo incentivo e vibração com cada conquista.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. ESTADO DA ARTE.....	2
2.1. MFC – DEFINIÇÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	3
2.2. CONSERVAÇÃO DA ENERGIA BIOLÓGICA.....	5
2.3. REQUERIMENTOS BÁSICOS PARA A TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS PARA O ÂNODO	7
2.4. TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS ATRAVÉS DE MEDIADORES.....	8
2.5. TRANSFERÊNCIA DIRETA DE ELÉTRONS	9
2.6. GEOBACTER	16
2.7. MFC E A BIORREMEDIAÇÃO	18
2.8. LIMITAÇÕES DAS MFC.....	20
2.8.1 Limitações catódicas.....	22
3. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO GERAL.....	26
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. CONSTRUÇÃO DAS MFCs	28
4.1.1. Eletrodos.....	28
4.1.2. Montagem da MFC.....	30
4.2. CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS.....	32
4.3. OPERAÇÃO DAS CÉLULAS.....	34
4.4. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	35
4.4.1 Potencial de circuito aberto (OCP) – <i>Open Circuit Potential</i>	36
4.4.2 Voltametria de varredura linear.....	36
4.5. MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER	38
4.6. FISH – HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1. DIFERENÇAS ENTRE CÁTODOS DE OXIGÊNIO E FERRICIANETO.....	46
5.1.1. Voltametria de Varredura Linear (LSV) – Linear Sweep Voltametry	46

5.2. COMPARAÇÃO ENTRE MFCs USANDO <i>G. metallireducens</i> , <i>G. sulfurreducens</i> E UMA COCULTURA DAS DUAS ESPÉCIES	50
5.2.1 Medida da densidade de pilis.....	54
5.3. TESTES PARA A UTILIZAÇÃO DE OUTRAS FONTES DE CARBONO....	55
6. CONCLUSÕES.....	59
7. SUJESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de uma célula de combustível microbiana utilizando acetato no compartimento anódico e ferricianeto como católito	3
Figura 2: Célula de combustível microbiana em formato H. Compartimento anódico e catódico separados por uma membrana semi permeável.....	5
Figura 3: Transferência de elétrons através de mediadores de elétrons solúveis liberados pelas células. Moléculas trocadoras de elétrons oxidadas são reduzidas na superfície externa da célula e estas espécies reduzidas doam elétrons para o eletrodo.....	9
Figura 4: Estrutura heme composta por um átomo central de Fe.....	11
Figura 5: Representação da nano rede formada por pilis em biofilmes de <i>G. sulfurreducens</i>	14
Figura 6: a) Microscopia de transmissão eletrônica mostrando a associação de óxidos de Fe (III) (indicados por setas) com pili expresso por <i>G. sulfurreducens</i> . b) Mecanismo proposto para a transferência de elétrons para o acceptor de elétrons externo em <i>G. sulfurreducens</i>	15
Figura 7: Eletrodo revestido com catalisador metálico	21
Figura 8: A) Esquema das perdas de tensão para o compartimento catódico no qual pode ser visualizado perdas por ativação, ôhmicas e por transporte de massa. B) Uma curva de potência típica	23
Figura 9: Fio de aço inoxidável sobre parte traseira do eletrodo de TiAu	29
Figura 10: Eletrodo de ouro (ânodo) com parte frontal parcialmente coberta com silicone. Quadrado de 0,6 cm de lado de Au exposto	29
Figura 11: Cátodo de tecido de carbono costurado com fio de Ti	30
Figura 12: Eletrodos conectados a célula.....	31
Figura 13: Células fixadas com grampo plástico, separadas pela membrana semi permeável.....	31
Figura 14: Entupimento da membrana semi permeável pela alta concentração de ferricianeto.....	35

Figura 15: Gráfico V x t(s) obtido na medida de potencial de circuito aberto.....	36
Figura 16: Voltamograma típico. A) cátodos com oxigênio B) cátodos com ferricianeto.....	37
Figura 17: Principais etapas da hibridização fluorescente <i>in situ</i>	40
Figura 18: A) Curva de potência nas respectivas horas de operação e B) Curva de polarização nas respectivas horas de operação para a célula constituída por cátodo de O ₂ e área de ânodo de 6,0 x 10 ⁻⁴ m ²	42
Figura 19: A) Curva de polarização nas respectivas horas de operação e B) curva de potência nas respectivas horas de operação. Ambas as curvas são referentes a célula constituída por cátodo de O ₂ e área de ânodo de 4,0 x 10 ⁻⁴ m ² , distância mínima entre eletrodos e membrana semipermeável.....	43
Figura 20: A) Curva de polarização nas respectivas horas de operação e B) curva de potência nas respectivas horas de operação. Ambas as curvas se referem a célula constituída por cátodo de O ₂ e área de ânodo de 1,82 x 10 ⁻⁴ m ²	44
Figura 21: A) Curva polarização nas respectivas horas de operação e B) curva de potência nas respectivas horas de operação. As curvas são referentes a célula com condições otimizadas, ferricianeto no compartimento catódico e área de 3,6 x 10 ⁻⁵ m ² ...46	46
Figura 22: Curvas de polarização representativas para oxigênio no cátodo (linhas pontilhadas) e ferricianeto (linhas contínuas). Ambas exibem “overshoot” de potência no início do desenvolvimento que desaparece após 150 horas de crescimento. Limitações na densidade de corrente são comparáveis, mas a curva de ferricianeto aproxima-se muito mais do comportamento ideal.....	48
Figura 23: Os triângulos representam as MFCs que utilizam ferricianeto no compartimento anódico, enquanto células com O ₂ são representadas por círculos. Curvas de polarização representativas são mostradas de forma preenchida e curvas de densidade de potência na forma aberta para MFCs utilizando [Fe(CN) ₆] ³⁻ e O ₂ no compartimento catódico.....	49
Figura 24: Imagem dos biofilmes obtidas por microscópio confocal de varredura a laser. (A) Biofilme de <i>G. sulfurreducens</i> de espessura de 62,1 µm. (B) Biofilme de <i>G. metallireducens</i> de espessura de 80 µm. (C) Cocultura analisada por FISH, em vermelho <i>G. sulfurreducens</i> e em verde <i>G. metallireducens</i>	51

Figura 25: Curvas de polarização para MFC utilizando culturas puras de <i>G. metallireducens</i> . Efeito de “overshoot” diminui após 240 horas de operação	52
Figura 26: Gráfico de densidade de potência atingido e MFC para uma cultura pura de <i>G. metallireducens</i> em azul e <i>G. sulfurreducens</i> em vermelho.....	52
Figura 27: Gráfico de potência para uma MFC utilizando uma cocultura de <i>G. metallireducens</i> e <i>G. sulfurreducens</i>	53
Figura 28: Medida da densidade óptica dos pilis das espécies <i>Geobacter</i>	55
Figura 29: <i>G. metallireducens</i> inoculada no controle, sem fonte de carbono, em 20 mM de glicerol e no controle com acetato (esquerda para direita)	56
Figura 30: <i>G. metallireducens</i> inoculada no controle sem glicerol, 5, 10, 20 e 30 mM de glicerol (esquerda para direita). Pode-se ver o crescimento de bactérias apenas no frasco contendo 20 mM de glicerol	57
Figura 31: <i>G. metallireducens</i> inoculado no controle com acetato, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 e 28 mM de glicerol e controle sem fonte de carbono (esquerda para direita).....	57
Figura 32: Densidade óptica (D.O.) das amostras nas respectivas concentrações. 14 mM demonstrou ser a concentração mais apropriada para o crescimento das bactérias em glicerol	58

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Espécies Geobacter e as respectivas características inerentes a cada espécie 18

Tabela II: Fluorocromos utilizados e seus respectivos comprimentos de onda41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MFC	<i>Microbial Fuel Cell</i> – Célula de combustível microbiana
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NAD ⁺	Enzima Aldeído Desidrogenase
MET	<i>Mediator electron transfer</i> – Transferência de elétrons por mediadores
DET	Direct electron transfer – Transferência direta de elétrons
Ac	Acetato
AQDS	Antraquinona – 2,6 – dissulfonato
Bz	Benzaldeído
Bze	Benzeno
Bzo	Benzoato
BzOH	Benzil álcool
BtOH	Butanol
Buty	Butirato
Cit	Citrato
p-Cr	p-cresol
EtOH	Etanol
p-HBz	p-hidroxibenzaldeído
p-HBzo	p-hidroxibenzoato
p-HBzOH	p-hidrobenzilalcool
IsoB	Isobutirato
IsoV	Isovalerato
Ph	Fenol
Prop	Propianato
PrOH	Propanol
Pyr	Piruvato
Tol	Tolueno
Val	Valerato

Fum	Fumarato
Mal	Malato
OPC	<i>Open Circuit Potential</i> – Potencial de Circuito Aberto
LSV	<i>Linear Sweep Voltammetry</i> – Voltametria de Varredura Linear
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
TRITC	Tetrametil – rodamina – isotiocianato
PBS	Solução tampão salina de fosfato
kDa	1/12 m.a. $C_{12} = 1,66 \times 10^{-24} \text{g}$
tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

RESUMO

Células de combustível microbianas despertaram interesse nos últimos anos devido à aplicação em tratamento de águas, biorremediação e geração de eletricidade. Um dos organismos que tem sido estudado a fundo para a aplicação em células de combustível microbianas é a *Geobacter sulfurreducens*. Esta espécie de *Geobacter*, que gera eletricidade pela oxidação de compostos, mostrou gerar uma quantidade significativa de energia devido a múltiplos mecanismos extracelulares de transferência de elétrons através de pilis ou citocromos do tipo C. Outra espécie de *Geobacter* que desperta grande interesse é a *Geobacter metallireducens* por ser capaz de oxidar compostos aromáticos e reduzir metais nocivos solúveis (até mesmo radioativos) à forma inofensiva insolúvel. Porém, o aumento na densidade de potência destes dispositivos é essencial para que sejam competitivos com outras fontes de energia renovável.

Neste trabalho foi feito o estudo da melhor configuração visando a ausência de limitações catódicas para aumento da densidade de potência nas células, o que demonstrou que medidas como diminuição do tamanho no ânodo, proximidade dos eletrodos e substituição do cátodo de oxigênio por ferricianeto melhoram o desempenho da célula. Também foram feitas comparações de densidade de potência em células de combustível microbianas de culturas puras de *G. metallireducens* e *G. sulfurreducens* e uma cocultura das duas espécies. Essa comparação demonstrou que *G. metallireducens* além de poder ser utilizada para biorremediação apresenta uma densidade de potência elevada, podendo ser usada também como cultura pura em células de combustível microbianas, para a produção de eletricidade. Também se pode perceber uma relação direta entre a espessura do biofilme e a potência produzida nas três células.

A espécie *G. metallireducens* demonstrou ainda ser útil na utilização de glicerol como fonte de carbono, podendo servir como espécie remediadora para este resíduo.

ABSTRACT

Microbial fuel cells aroused interest in recent years due to the application in water treatment, bioremediation and electricity generation. One of the microorganisms that has been studied thoroughly for application in microbial fuel cells is the *Geobacter sulfurreducens*. This specie of *Geobacter*, which generates electricity by oxidizing compounds, showed generate a significant amount of energy due to multiple mechanisms of extracellular electron transfer through Pilis or c type cytochromes. Another specie of *Geobacter* that arouses great interest is the *Geobacter metallireducens* by being able to oxidize aromatic compounds and soluble reducing harmful metals to insoluble harmless. However, the increased power density of these devices is essential to be competitive with other renewable energy sources. This present work studied the best configuration aiming the absence of cathodic limitations to increasing power density of the cells. Measurements have shown that reduced anode size, location of the electrodes and replacement of oxygen by ferricyanide, improves the performance of the cells. Comparisons of power density between pure cultures of *G. sulfurreducens* and *G. metalirreducens* and a coculture of the two species were also made. This comparison showed that *G. metallireducens* can be used for bioremediation and also in a microbial fuel cell to produce electricity due the high power density produced. Direct relationships between the thickness of the biofilm and the power produced in the three cells have been notice. The specie *G. metallireducens* also showed to use glycerol as a carbon source, which may be an alternative for glycerol consumption.

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de energia tem requerido grandes esforços da comunidade acadêmica e científica devido a questões ambientais e econômicas. A atual dependência em combustíveis fósseis é insustentável devido à poluição e aos recursos finitos. Enquanto muitas pesquisas têm sido conduzidas em uma larga variedade de soluções energéticas, uma única alternativa não será suficiente para substituir os combustíveis fósseis em sua integridade, mas sim, provavelmente, uma variedade de diferentes tecnologias, gerando energia para tarefas específicas de forma especializada em diversas situações.¹

A descoberta de que o metabolismo microbiano pode gerar energia na forma de corrente elétrica tem levado a um crescente interesse no domínio das tecnologias com Células de Combustível Microbianas (MFCs) que parecem oferecer uma boa alternativa para a geração de energia elétrica em baixa escala, colaborando como uma solução para o problema mencionado anteriormente.² Além de produzir energia as MFCs são também uma alternativa para biorremediação, pois são capazes de degradar matéria orgânica de esgoto doméstico, por exemplo, desempenhando um importante papel na descontaminação de águas subterrâneas.³

As células de combustível microbianas emergiram recentemente como uma tecnologia promissora, porém ainda desafiadora. Há a necessidade de um melhor entendimento do mecanismo envolvido na conversão da energia bioeletroquímica, na transferência de elétrons e nos processos de biotransformação para que as limitações hoje apresentadas por esses sistemas sejam sanadas possibilitando o desenvolvimento de plantas com maior eficiência. Apesar dessas limitações, as MFCs são consideradas uma tecnologia sustentável promissora para atender as crescentes necessidades energéticas e especialmente para uso de águas residuais como substrato. Dessa forma, gerando eletricidade e realizando o tratamento dos resíduos simultaneamente, os custos operacionais da planta de tratamento são compensados.

Neste trabalho, culturas puras da bactéria *Geobacter sulfurreducens*, comumente encontrada em lodos, foram utilizadas para avaliar o desempenho das MFCs em situações diversas, buscando a configuração de melhor desempenho em relação à

densidade de potência máxima. Apesar do foco das MFCs ser a utilização de lodos e águas residuais como substrato, há a necessidade de um melhor entendimento do mecanismo de transferência de elétrons que ocorre neste tipo de célula. Para tanto, foram utilizadas culturas puras com o intuito de reduzir as variáveis em estudo, possibilitando uma maior compreensão do mecanismo envolvido. Após definido o modelo a ser empregado, foi feita uma comparação na produção de potência entre as culturas *Geobacter sulfurreducens* e *Geobacter metallireducens* e uma cocultura das duas espécies. A primeira conhecida por produzir uma alta densidade de corrente, a segunda por suas propriedades biorremediadoras e a combinação das duas espécies buscando compilar as características de ambas. Por último, foi feita uma avaliação do uso de glicerol, resíduo da produção de biodiesel, como substrato para as bactérias estudadas.

Este trabalho destaca-se pelo caráter inovador, tanto pela avaliação da melhor configuração, avaliação do uso de *Geobacter metallireducens* em células de combustível microbianas, quanto pela avaliação do uso de glicerol como substrato para esse tipo de cultura. Apesar de este assunto ser tema de muitas publicações, atualmente a abordagem do mesmo no Brasil ainda se encontra em fase inicial.^{4,5,6}

2. ESTADO DA ARTE

A ocorrência de uma força eletromotriz entre eletrodos imersos em culturas bacterianas em um meio estéril em uma configuração do tipo bateria foi primeiramente reportada por Michael C. Potter em 1911⁷ que concluiu que energia elétrica pode ser liberada pela desintegração de compostos orgânicos por bactérias. Vinte anos depois Cohen confirma estes resultados⁸. Apesar de estas publicações serem consideradas o berço das MFCs, apenas depois de 1960 a ideia da geração de eletricidade pelas bactérias ressurgiu no âmbito do programa espacial da NASA como uma oportunidade de reciclar os dejetos humanos durante os voos espaciais e gerar eletricidade.⁹ Durante os esforços de investigação do sistema, a complexidade dos processos bioeletroquímicos envolvidos e a necessidade de programas extensos de pesquisa sistemáticas se tornaram evidentes.^{10,11} Assim sendo, os rápidos avanços em outras

tecnologias energéticas, como na área de energia fotovoltaica, e a alta complexidade do sistema acabaram reduzindo o interesse nas MFCs. Apenas no final do século XX o assunto veio à tona novamente e pesquisas consideráveis começaram a ser realizadas na área. O interesse por essa tecnologia e o constante aumento nos estudos da mesma se deve à conscientização de que os combustíveis fósseis são finitos, das consequências ambientais emergentes da sua utilização e da necessidade de desenvolver tecnologias para um manejo sustentável do meio ambiente e dos recursos naturais.

2.1 MFC – DEFINIÇÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS

A célula de combustível microbiana é um dispositivo eletroquímico no qual um substrato é oxidado no compartimento anódico por bactérias que utilizam os elétrons, provenientes da oxidação no seu metabolismo e em seguida o transferem para o ânodo. Os elétrons gerados movem-se através de um condutor externo até o cátodo onde ocorre redução do composto presente no compartimento catódico, geralmente ferricianeto ou oxigênio, gerando corrente elétrica. Os prótons gerados no compartimento anódico migram para o compartimento catódico através de uma membrana semipermeável que separa os dois compartimentos para completar o balanço de cargas. Uma diferença de potencial aparece entre os dois eletrodos. A Figura 1 apresenta um esquema de uma MFC.

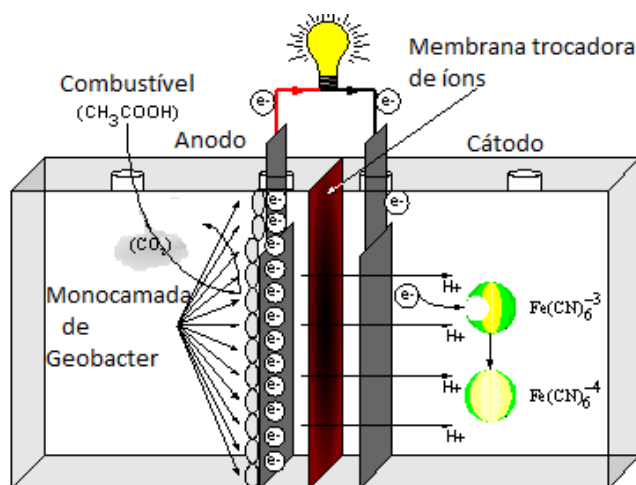


Figura1: Esquema de uma célula de combustível microbiana utilizando acetato como substrato no compartimento anódico e ferricianeto como católito.

O desempenho no compartimento anódico é intrinsecamente dependente da natureza e taxa do metabolismo anaeróbico como também da natureza e taxa de transferência de elétrons do biofilme microbiano para o ânodo. A tarefa fundamental da célula microbiana é transformar um substrato eletroquimicamente inativo e a energia química que este contém em uma forma acessível para a oxidação e, assim, para conversão em energia elétrica. Para esta transformação usa-se o metabolismo microbiano, ou mais precisamente o catabolismo microbiano – a energia liberada pela degeneração do substrato.¹² Porém a transferência de elétrons do metabolismo microbiano para o eletrodo envolve um processo complexo que será explicado ao longo deste trabalho.

Os materiais utilizados para a construção do ânodo devem ter boa condutividade elétrica e baixa resistência elétrica, alta biocompatibilidade, estabilidade química e não podem sofrer corrosão. O cátodo deve possuir alto potencial redox e ser fácil de capturar prótons.

Diversas configurações são possíveis, sendo que estas se diferenciam na natureza e mecanismo de transferência de elétrons, podendo ser compostos por um ou dois compartimentos, possuir ou não membrana semipermeável, utilizar diferentes tamanhos e materiais nos eletrodos, diferentes substratos ou ainda utilizar sedimentos, culturas puras ou coculturas de bactérias. Além disso, podem ser de fluxo contínuo ou por bateladas e possuir diferentes modelos, sendo que a célula no formato H é a mais utilizada devido ao baixo custo e alta funcionalidade como se pode observar na Figura 2.

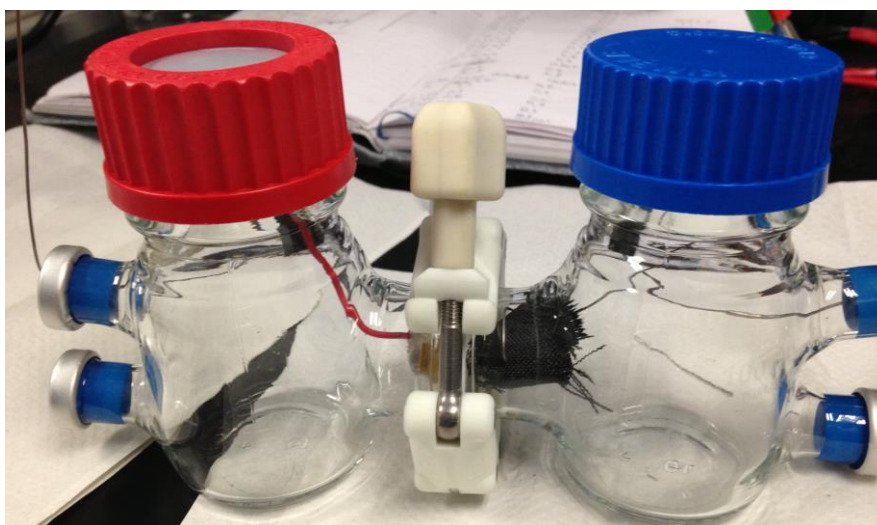


Figura 2. Célula de combustível microbiana em formato H. Compartimentos anódico e catódico separados por uma membrana semi permeável.

2.2. CONSERVAÇÃO DA ENERGIA BIOLÓGICA

Quando seres vivos metabolizam um substrato a energia é obtida a partir da oxidação de compostos energeticamente ricos (ricos em elétrons) como carboidratos, por exemplo. Este trabalho é fundamentado em células vivas, mais precisamente em microrganismos unicelulares que apresentam um complexo mecanismo de metabolização do substrato que envolve inúmeras reações catalisadas por enzimas, acontecendo através de uma série de intermediários e envolvendo sucessivas reações de oxi-redução. O processo metabólico de transferência de elétrons permite aos organismos capturar, armazenar e liberar energia. Os substratos que são oxidados (perdem elétrons) são denominados doadores de elétrons, ou seja, redutores; substratos que são reduzidos (ganham elétrons) são denominados aceptores de elétrons (oxidantes).¹³

Heterótrofos como animais e bactérias podem obter energia para viver pela oxidação de matéria orgânica, ou mais precisamente, da energia livre de Gibbs, ΔG_{ox} da oxidação. No modelo geral de crescimento heterotrófico, elétrons provenientes da matéria orgânica reduzem uma pequena molécula redox ativa, como NAD^+ para $NADH$. O $NADH$ é formado na glicólise, na oxidação de ácidos graxos e no ciclo do ácido cítrico; todos processos de transferência de elétrons intracelulares. É uma molécula rica em energia porque contém um par de elétrons com alto potencial de

transferência. Quando esses elétrons são doados para o acceptor de elétrons final da cadeia respiratória, libera-se uma grande quantidade de energia livre que pode ser usada para gerar ATP (Trifosfato de adenosina), principal fonte de energia dos seres vivos.

Elétrons provenientes do NADH são transferidos para transportadores de elétrons, como por exemplo, quinonas, via complexo NADH1, o qual desloca e eleva o gradiente de prótons. Dependendo do envolvimento de oxidantes exógenos (acceptor de elétrons final) duas principais vias metabólicas podem ser distinguidas: respiração ou fermentação.¹³

O processo de fermentação é uma forma biológica de desproporcionalização a qual ocorre na ausência de oxidantes exógenos. Parte do substrato orgânico serve de acceptor de elétrons e tornar-se reduzida, enquanto outra parte é oxidada.¹⁴ Em comparação aos outros processos, a fermentação é o processo com o menor ganho energético pelo organismo. Esta baixa utilização de energia é acompanhada pela oxidação incompleta do substrato, deixando a maior parte do seu conteúdo energético não utilizado, na forma de produtos da fermentação ricos energeticamente. A fermentação é o processo utilizado em biorreatores, por exemplo, porém devido ao baixo ganho energético não é interessante para as células de combustível microbianas.

Na respiração, os elétrons obtidos na oxidação do substrato são transferidos via cascata redox, a cadeia respiratória – a energia decresce gradualmente – e finalmente é transferida para um acceptor de elétrons final. Quanto mais positivo for o potencial redox do acceptor de elétrons final, maior a energia ganha pelo organismo:

$$\Delta G^{\theta} = nF [E^{\theta} (\text{doador}) - E^{\theta} (\text{acceptor})] \quad (1)$$

onde E^{θ} representa o respectivo potencial padrão biológico e G^{θ} denota a mudança na energia livre de Gibbs sob condições biológicas padrões.¹⁴

A respiração aeróbica, a qual utiliza O_2 como acceptor final de elétrons, é o processo de maior ganho energético. No processo de respiração há um aproveitamento total da energia proveniente do substrato que é completamente oxidado a CO_2 . Sob condições anóxicas (sem a presença de oxigênio, mas na presença de nitrito), facultativas ou estritamente anaeróbicas, ao invés de transferirem elétrons para o oxigênio, como acontece na respiração aeróbica, outros aceptores finais, orgânicos ou

inorgânicos, são utilizados. Nitrato, sulfato, dióxido de carbono (metanogênese), íons metálicos como Fe^{+3} , envolvidos em processos biogeoquímicos, e fumarato são exemplos desses aceptores.¹²

A principal diferença na produção de eletricidade microbiana em células de combustível contra processos bioquímicos naturais, tais como redução de fumarato a succinato, é que elétrons são transferidos para um eletrodo ao invés de um acceptor de elétrons natural.

2.3 REQUERIMENTOS BÁSICOS PARA A TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS PARA O ÂNODO

Uma vez que eletrodos são sólidos que não podem penetrar na célula bacteriana, é requerido que elétrons sejam transferidos de dentro para fora da membrana celular microbiana – tanto por contato físico de componentes reduzidos como através do deslocamento de elétrons através da membrana utilizando uma enzima redox ligada à mesma. Em relação aos mecanismos, a transferência de elétrons fora da célula deve resultar em espécies eletroativas que são capazes de ligar eletronicamente a célula bacteriana ao eletrodo. Estas espécies devem ser, por exemplo, transportadores redox solúveis, uma proteína redox da membrana externa ou um metabólito primário da redução que são denominados mediadores, pois fazem a ligação com o eletrodo, fazendo a transferência de elétrons para o mesmo.

Para uma transferência de elétrons eficiente, é necessário que a espécie mediadora seja capaz de estabelecer um contato físico com a superfície do eletrodo; seja eletroquimicamente ativa (possuir um baixo potencial de redução quando entrar em contato com a superfície do eletrodo) e possua um potencial padrão parecido com o potencial de redução do substrato ou ao menos significativamente negativo em comparação ao acceptor de elétrons final.¹²⁻¹⁴

Diferentes mecanismos de transferência de elétrons foram identificados e estudados até o momento. Para uma classificação básica, dois tipos de mecanismos podem ser identificados: transferência de elétrons por mediadores (MET), no qual o mediador é uma espécie redox solúvel, ou via transferência direta de elétrons (DET) o

qual procede através de uma proteína redox que está ligada a membrana da célula microbiana.¹²

2.4 TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS ATRAVÉS DE MEDIADORES

Em 1930, Cohen apontou que na utilização de culturas bacterianas, quando cultivadas em condições anaeróbias, estas apresentaram um potencial de redução fortemente negativo, porém a corrente produzida foi mínima. Ele atribuiu esta baixa capacidade de geração de corrente a uma falta de "eletromotividade dos produtos de oxiredução ativos". Como solução para este problema, ele propôs a introdução de substâncias orgânicas do tipo benzoquinona para facilitar a transferência de elétrons a partir das culturas para os eletrodos nelas mergulhados.¹⁵ A abordagem foi retomada na década de 1980, especialmente por Bennetto e colaboradores. Um grande número de compostos, a maioria baseada em fenazinas, fenotiazinas, fenoxazinas e quinonas foram investigados com o intuito de serem utilizados como mediadores nas MFCs.¹⁶

Na ausência de oxigênio, elétrons podem ser desviados da cadeia respiratória por estes mediadores redox os quais entram na membrana celular externa, se reduzem e saem da membrana nesse estado reduzido. O mediador reduzido é oxidado ao entrar em contato com o eletrodo, transferindo os elétrons "roubados" da bactéria para o eletrodo e produzindo uma corrente elétrica conduzida através de um circuito externo.

A grande desvantagem na utilização de mediadores redox exógenos é a necessidade de uma adição regular do mediador, o que é tecnicamente impraticável e ambientalmente questionável, já que a maioria tem caráter tóxico e conduz ao abandono geral da abordagem sustentável que este modelo de célula de combustível propõe.

Diferentemente dos mediadores adicionados artificialmente, algumas espécies como, por exemplo, *Shewanella* produzem mononucleotídeos flavinas e riboflavinas quando crescem em meio contendo ferro, fumarato ou eletrodos. Estas flavinas funcionam como mediadores de elétrons para oxidantes extracelulares sólidos (ex. Fe (III) mineral ou eletrodos). Esses mediadores ficam reduzidos na superfície celular e oxidados extracelularmente. Porém, este tipo de organismo não é o foco deste trabalho. A Figura 3 representa o mecanismo de transferência de elétrons por mediadores.¹⁷

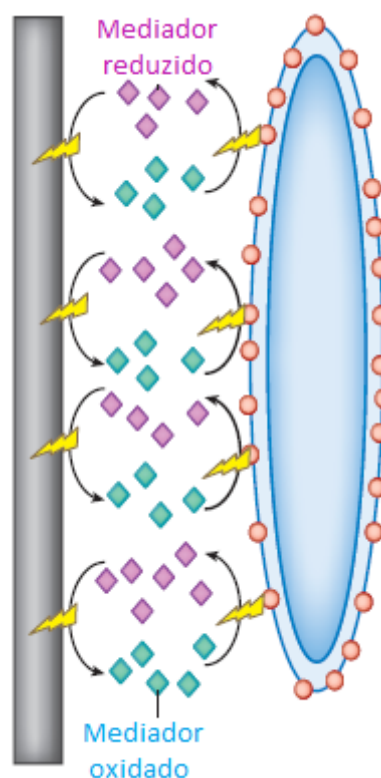


Figura 3. Transferência de elétrons através da redução de mediadores de elétrons solúveis liberados pelas células. Moléculas na forma oxidada são reduzidas na superfície externa da célula e estas espécies reduzidas doam elétrons para o eletrodo¹⁷.

2.5 TRANSFERÊNCIA DIRETA DE ELÉTRONS

Está claro que a principal barreira para os microrganismos transferirem elétrons para um acceptor de elétrons final externo à célula, como por exemplo Fe^{+3} ou eletrodos, é o sistema de membranas lipídicas não condutivas que serve como isolante, separando o citoplasma, onde os elétrons são extraídos da matéria orgânica durante o metabolismo central, da parte externa da célula, onde o acceptor de elétrons final se localiza.¹⁸ Considerando que células vivas não são condutoras, este tipo de mecanismo foi por muito tempo considerado impossível.

Uma estratégia é utilizada pela bactéria *Geobacter sulfurreducens*, para desviar esses elétrons do metabolismo central para aceptores de elétrons externos a célula, como óxidos de Fe^{+3} , composto utilizado em seu ambiente natural já que a mesma é abundante em sedimentos onde este elemento está presente. A transferência extracelular

de elétrons é uma característica da condição fisiológica específica de espécies *Geobacter*. A capacidade de troca de elétrons com seu ambiente extracelular define o nicho ecológico único desta espécie e é uma característica importante das muitas aplicações práticas deste gênero. O processo é realizado por meio de mecanismos únicos que ainda não foram descritos em qualquer outro organismo.

O sistema de transferência de elétrons para um acceptor externo à célula é composto por uma série de citocromos do tipo c, proteínas com estrutura multi-heme, associados com a membrana interna, o periplasma e a membrana externa, interagem para transferirem elétrons para a superfície da membrana externa. Dessa forma, a transferência direta de elétrons ocorre através de um contato físico da membrana celular bacteriana ou mais precisamente de uma organela da membrana com o acceptor de elétrons final ou o ânodo, sem difusão de espécies redox envolvidas na transferência de elétrons da célula para o acceptor de elétrons final, ou seja, sem a presença de mediadores.¹⁸

As estruturas multi-heme (Figura 4), compostos do tipo porfirina que são moléculas orgânicas com uma estrutura geral de macrociclo tetrapirrólico, ligados por ligações metálicas, que possui no seu centro um espaço apropriado para acomodar um íon metálico. Especificamente na estrutura heme, essas moléculas possuem um átomo central de ferro que se alterna entre o estado reduzido, ferroso, (+2) e o estado oxidado, (+3) durante o transporte de elétrons, desempenhando um importante papel na transferência de elétrons e compõe a estrutura do citocromo do tipo c.

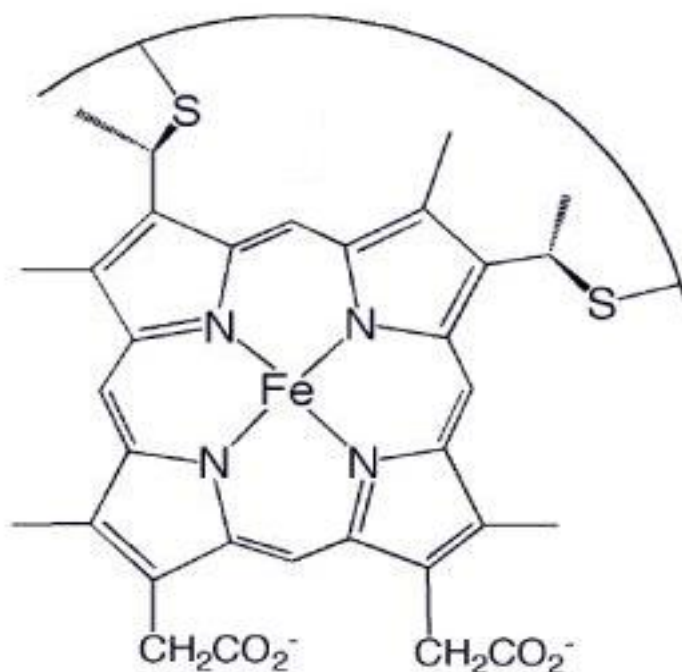


Figura 4. Estrutura heme composta por um átomo central de Fe.

O citocromo do tipo c é uma proteína hidrossolúvel e é um componente essencial da cadeia transportadora de elétrons, participando da transferência dos elétrons para o aceptor final na cadeia respiratória.

Através da purificação dos citocromos do tipo c localizados na superfície externa da célula, verificou-se que estes são capazes de reduzir aceptores de elétrons extracelulares conhecidos *in vitro*.^{19,20,21} Estudos através da exclusão de gene sugerem que os mesmos citocromos do tipo c transferem elétrons para uma diversidade de aceptores de elétrons extracelulares *in vivo*.²² Já estudos sobre a produção de corrente em biofilmes de *G. sulfurreducens* demonstraram que estes citocromos comunicam-se eletroquimicamente com o ânodo, utilizando-o como aceptor de elétrons final.^{23,24} Em alguns casos os citocromos estão localizados suficientemente perto da superfície do eletrodo de modo a transferir elétrons diretamente dos citocromos para o eletrodo, assim funcionando como a ponte eletroquímica entre as células em contato com a superfície do eletrodo. Sob estas condições, corrente pode ser produzida através dos citocromos do tipo c localizados na membrana externa.²⁵ Esses citocromos, essenciais para a redução de Fe^{+3} , são exibidos sobre a membrana externa da célula. Em comparações entre a expressão de genes em células produtoras de corrente contra células que cresceram utilizando

aceptores de elétrons alternativos, bem como estudos de deleção de gene (perda de um ou mais nucleotídeos), identificaram diversos citocromos do tipo c localizados na superfície externa das células da espécie *G. sulfurreducens* que podem ser os responsáveis por fazer este contato elétrico com aceptores de elétrons externos à célula, como por exemplo, eletrodos, entre eles destacaram-se OmcB, OmcE, OmcS e OmcZ.^{25,26}

O citocromo OmcB tem uma massa molecular de 89 kDa, uma estrutura composta por 12 hemes e um potencial redox médio de – 190 mV, porém alguns de seus hemes possuem potencial mais negativo. OmcB está incorporado na membrana externa, com uma parte da molécula exposta na superfície exterior da célula.²⁷ Considerando que o OmcB integra a membrana externa, diversos citocromos do tipo c da espécie *G. sulfurreducens* se encontram totalmente expostos na superfície exterior da célula. A partir da deleção deste gene foi possível verificar que este é responsável pela redução de citrato de Fe (III) e óxido de Fe (III), porém as cepas mutantes, que tiveram o gene deletado, mostraram se adaptar e passaram a reduzir citrato de Fe (III), mas não óxido de Fe (III).

O citocromo OmcS é um citocromo do tipo c composto de seis hemes com uma massa molecular de 47 kDa e com um potencial de redução médio de – 212 mV, mais negativo que os citocromos do tipo c localizados no periplasma.²⁷ O OmcS mostrou-se envolvido em biofilmes finos gerando baixos níveis de corrente. É provável que o OmcS seja o principal responsável por fazer o contato elétrico com a superfície relativamente plana do eletrodo, porém a corrente produzida nesses estudos iniciais foi bastante baixa.⁷²

O OmcE é outro citocromo do tipo c que se encontra na superfície externa da célula, mas sua localização específica ainda não foi determinada. Como ainda não foi isolado, há apenas uma previsão de que sua massa molecular seja em torno de 32 kDa e que possua uma estrutura de quatro hemes. Estudos de padrão de expressão bem como a deleção do gene sugerem que o OmcE desempenha um papel na transferência de elétrons extracelular em cepas selvagens, porém as células são capazes de se adaptar com a perda do mesmo. Em contraste ao OmcE e OmcS, o OmcZ não é necessário para a redução de Fe (III) insolúvel. No entanto, de todos citocromos de *G. sulfurreducens* estudados até o momento, apenas o OmcZ parece ser de fundamental importância em

biofilmes que produzem elevados níveis de corrente.²⁶ O OmcZ é uma proteína hidrofóbica com uma massa molecular de 30 kDa. Possui uma estrutura composta por oito hemes, que abrange uma ampla gama de potenciais de redução (- 420 mV a - 60 mV) e cujo potencial de redução médio é de - 220 mV. A deleção do gene OmcZ, segundo Nevin *et al*, claramente inibe a produção de corrente, assim como a eliminação de outro gene que reduz a expressão de OmcZ na superfície externa da célula.²⁸ Análises de voltametria cíclica demonstraram um aumento da resistência à transferência de elétrons para o eletrodo em linhagens deficientes em OmcZ. A deleção de genes de outros tipos de citocromos do tipo c localizados na superfície externa da célula não demonstraram uma resposta semelhante.²⁹ Assim, evidências em diversas linhas sugerem que o citocromo OmcZ é a chave para a transferência de elétrons entre biofilmes de *G. sulfurreducens* e o ânodo, porém maiores investigações das propriedades que servem unicamente ao OmcZ para este fim são necessárias, além do entendimento da sua relação com Fe (III) já que o mesmo não demonstrou ser necessário para a redução deste composto.

Considerando que os citocromos necessitam estar em contato direto com o eletrodo para fazer a transferência de elétrons para o mesmo, a capacidade de produção de corrente da monocamada de células em contato direto com a superfície do eletrodo é limitada pelo espaço disponível para os microrganismos acessarem esta superfície. Maiores densidades de corrente (corrente produzida por área do eletrodo) são possíveis a partir de biofilmes eletricamente condutivos, os quais permitirem múltiplas camadas de células contribuam para a produção de corrente. Conforme citado anteriormente, biofilmes da maioria dos organismos agem como isolantes ao invés de condutores, porém o mesmo não é observado para o gênero *Geobacter*.

A possibilidade da existência de um biofilme condutor foi primeiramente proposta a partir de estudos de produção de corrente em biofilmes de *G. sulfurreducens* e subsequentemente confirmada por medidas diretas.^{30,31} Em sistemas nos quais se pode observar a formação de um biofilme espesso no ânodo, a potência foi de até dez vezes superior. A alta condutividade de biofilmes de *G. sulfurreducens* que são capazes de produzir corrente mesmo na distância de múltiplas células em relação ao ânodo, contribui para a alta produção de corrente.^{30,32} As evidências sugerem que a condutividade do biofilme pode ser atribuída a uma densa rede de pilis que são

filamentos similares a flagelos, porém responsáveis pela condução de elétrons, que formam uma nano rede (Figura 5) com uma condutividade semelhante à condutividade metálica, responsável pela transferência de elétrons a longa distância através do biofilme.^{30,32}

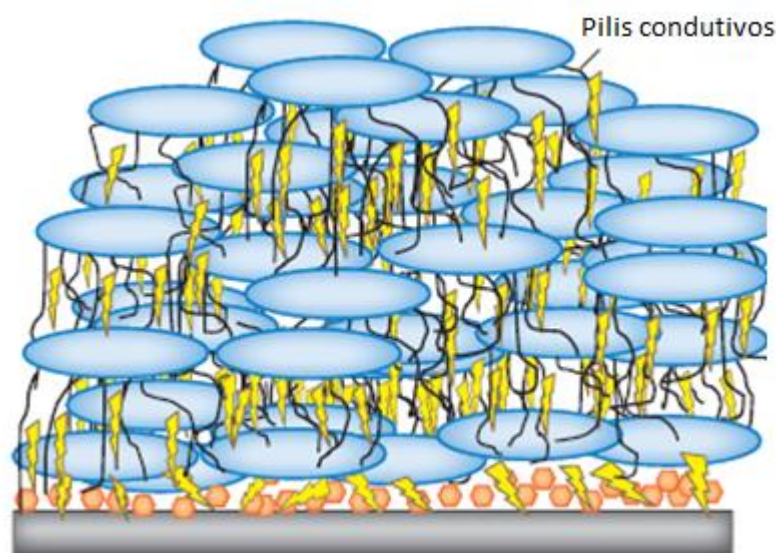


Figura 5. Representação da nano rede formada por pilis em biofilmes de *G. sulfurreducens*.

Estudos em pilis de *G. sulfurreducens* demonstraram que este organismo demonstra filamentos do tipo pili provenientes de uma série de proteínas, mas os filamentos mais abundantes são compreendidos pela proteína PilA. Pilis de *G. sulfurreducens* apresentam de 3-5 nm de largura e até 10-20 μm de comprimento que é semelhante ao de outros pilis de tipo IV³⁴ mas até agora apenas os pilis de *G. sulfurreducens* demonstraram ser condutivos. Quanto à condutividade metálica, surpreendentemente os biofilmes de *G. sulfurreducens* apresentaram características consistentes com a condutividade em metais, como por exemplo, a condutividade inicialmente aumenta exponencialmente com a diminuição da temperatura, uma característica de metais, semelhante a condutividade que também foi observada em polímeros orgânicos condutores. Uma condutividade similar também foi observada em experimentos nos quais pilis foram isolados e colocados em um sistema de dois eletrodos separados por um gap não condutivo. Foi possível medir a condutividade entre os dois eletrodos, demonstrando que a rede formada pelos pilis era condutiva. Análises

de difração de raio-X dos pilis sugerem sobreposição π - π .³¹ Dessa forma uma hipótese é de que os aminoácidos aromáticos que formam a proteína estejam alinhados ao longo da superfície externa do pili de modo a fornecer a sobreposição π - π .

Na Figura 6a e 6b pode-se visualizar a nano rede formada pelos pilis bem como o mecanismo de transferência de elétrons proposto.

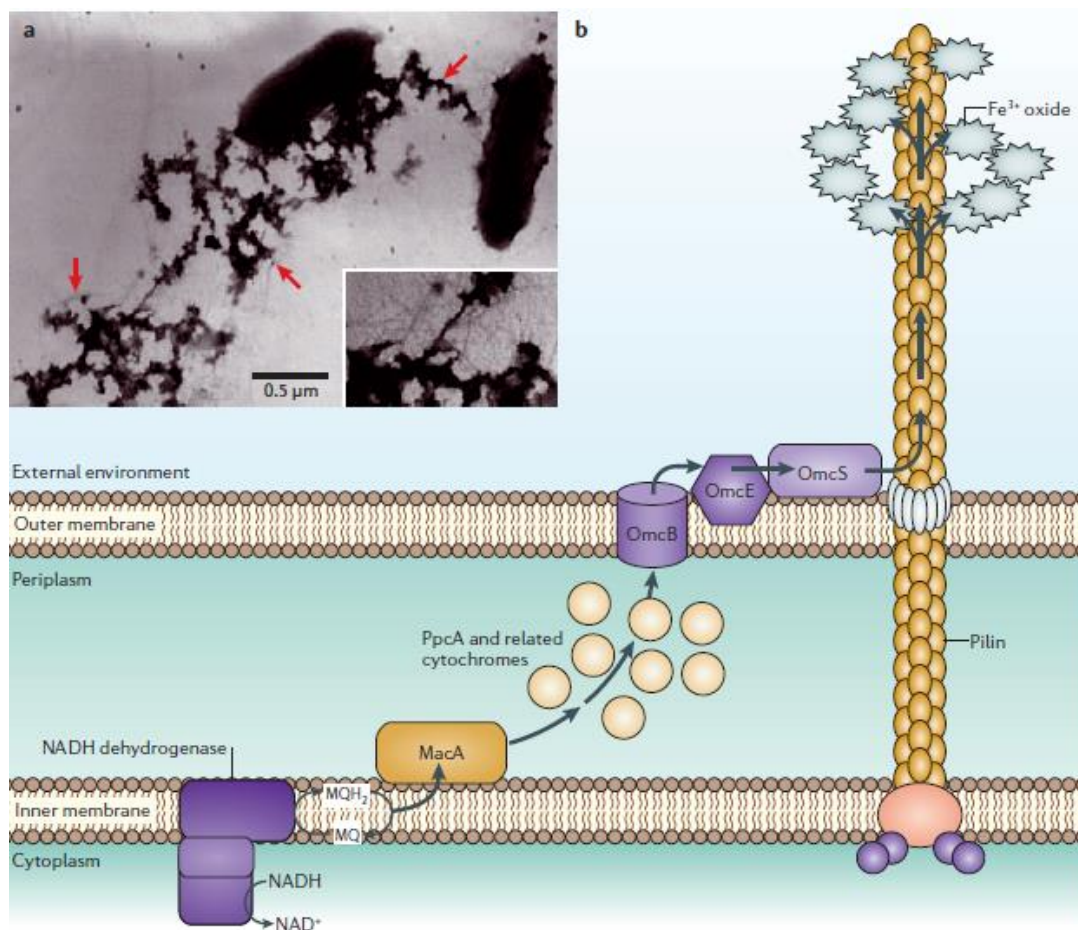


Figura 6. a) Microscopia de transmissão eletrônica mostrando a associação de óxidos de Fe (III) (indicados por setas) com pili expresso por *G. sulfurreducens*. É possível ver que os pilis estão interligados com os óxidos de Fe (III). b) Mecanismo proposto para a transferência de elétrons para o aceptor de elétrons externo em *G. sulfurreducens*.

O fluxo de elétrons proposto entre os citocromos é baseado em sua localização relatado dentro da célula bacteriana. É importante notar que o genoma de *G. sulfurreducens* contém genes que codificam cerca de 100 citocromos do tipo c, alguns dos quais podem também participar neste processo de transferência de elétrons.¹⁸

2.6 GEOBACTER

O gênero *Geobacter* pertence à família Geobacteraceae, que está dentro do domínio Bactéria, filo Proteobactéria, classe Deltaproteobactéria e ordem Desulfuromonadales. Todas as *Geobacter* isoladas são bacilos Gram-negativos que são capazes de oxidar acetato (substrato, doador de elétrons) com a redução de Fe (III), (aceptor de elétrons). São bactérias não patogênicas, estritamente anaeróbicas, abundantes em lodos e sedimentos. As duas espécies *Geobacter* mais fortemente estudadas até então são *G. metallireducens* e *G. sulfurreducens* que além de oxidar acetato e reduzir Fe (III) possuem, cada uma, a capacidade de oxidar e reduzir compostos específicos a cada espécie, conforme pode ser visto na Tabela I.⁷²

Tabela I. Espécies *Geobacter* e as respectivas características inerentes a cada espécie.

Nome	Temperatura ótima de crescimento	Doador de Elétrons	Formas de utilização de Fe	Outros aceptores de elétrons
<i>Geobacter metallireducens</i>	30°C	Ac, Bz, Bze BtOH, Buty, Bzo, BzOH, p-Cr, EtOH, p-HBz, p-HBzo, p-HBzOH, IsoB, IsoV, Ph, Prop, PrOH, Pyr, Tol, Val	Fe ₂ O ₃ , Cit Fe(III)	Mn(IV), Tc(VII) U(VI), AQDS ácidos húmicos, nitrito
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	35°C	Ac, H ₂	Fe ₂ O ₃ , Cit Fe(III) Fe ₃ P	Tc(VII), Co(III), U(VI), AQDS, S ⁰ , Fum, Mal, O ₂

Abreviações: acetato (Ac), antraquinona – 2,6 – dissulfonato (AQDS), benzaldeído (Bz), benzeno (Bze), benzoato (Bzo), benzil álcool (BzOH), butanol (BtOH), butirato (Buty), citrato (Cit), p-cresol (p-Cr), etanol (EtOH), p-hidroxibenzaldeído (p-HBz), p-hidroxibenzoato (p-HBzo), p-hidrobenzilalcool (p-HBzOH), isobutirato (IsoB), isovalerato (IsoV), fenol (Ph), propianato (Prop), propanol (PrOH), piruvato (Pyr), tolueno (Tol), valerato (Val), fumarato (Fum), malato (Mal).

As espécies *Geobacter* desempenham um papel importante na degradação de uma diversidade de contaminantes orgânicos em águas subterrâneas, tanto através de atenuações naturais quanto por estratégias usando a engenharia de biorremediação. A habilidade das espécies *Geobacter* em transferir elétrons para eletrodos tem inspirado diversas novas estratégias para produzir bioenergia e promover a biorremediação. Uma importante característica desse gênero é a capacidade de se associar a microrganismos metanogênicos formando coculturas sob condições em que podem contribuir significativamente para a conversão de dejetos orgânicos ou hidrocarbonetos em metano.

A capacidade fisiológica característica da espécie *Geobacter* em acoplar a oxidação de compostos orgânicos à redução de Fe (III) permite a esta espécie preencher um nicho chave na cadeia alimentar microbiana anaeróbia de ambientes sedimentares como sedimentos aquáticos, pântanos, arrozais e ambientes do subsolo nos quais a redução de Fe (III) desempenha um papel importante como acceptor de elétrons final. A *Geobacter* foi detectada em diversos ambientes como aquíferos contaminados com petróleo, lixiviados de aterros, ambientes contaminados com ácidos orgânicos, solos contaminados e sedimentos aquáticos, sedimentos subsuperficiais contaminados por urânio tratado com produtos orgânicos para promover a redução do metal, ambientes subsuperficiais com altas concentrações de arsênio, turfa e ambientes contaminados com compostos clorados dentre outros.⁷²

A *G. metallireducens*, primeiramente denominada GS-15, foi a primeira espécie *Geobacter* a ser isolada como cultura pura. O desenvolvimento recente de um sistema genético para *G. metallireducens*³⁵ foi provavelmente o que voltou a atenção a este organismo para elucidar a fisiologia de novas propriedades importantes, como a degradação anaeróbica de benzeno. Esta espécie foi a primeira espécie *Geobacter* descoberta que possui a propriedade de degradar compostos aromáticos e o primeiro microrganismo de qualquer tipo de cultura pura que se sabe, capaz de degradar hidrocarbonetos aromáticos. Um interesse particular referente a esta espécie é a habilidade de degradar benzeno, sendo que esta é a única espécie como cultura pura cujo mecanismo anaeróbico de degradação foi reportado.

Depois da redução de Fe (III), a transferência de elétrons para os eletrodos é a forma de respiração mais estudada para espécies *Geobacter*. Esta, e as espécies similares *Desulfuromonas* e *Geopsychrobacter* foram os primeiros microrganismos

descobertos capazes de conservar energia para suportar seu crescimento a partir da oxidação de matéria orgânica com transferência de elétrons para eletrodos e aparentam ser os organismos mais eficazes a realizarem esta forma de respiração.⁷²

Os organismos *Geobacter* são os mais abundantes que colonizam eletrodos em culturas mistas inoculadas ou comunidades naturais, especialmente sob condições estritamente anaeróbias. Dentre as espécies *Geobacter* a mais abundante é a *Geobacter sulfurreducens*, o que é consistente com a descoberta de que as cepas de *G. sulfurreducens* produzem as maiores densidades de corrente dentre as culturas puras, acompanhada pela alta eficiência de Coulomb. Isto lhes proporciona uma alta competitividade na colonização de eletrodos. Foram reportadas densidades de potência em células de combustível microbianas³⁶⁻³⁹ utilizando culturas puras de *G. sulfurreducens* que variam entre 0,09 mW/m², 1,2 W/m², 1,9 W/m² e 3,9 W/m². Para MFCs utilizando águas residuais os valores de densidade de potência encontrados na literatura⁴⁰⁻⁴³ foram de 19,36 mW/m², 148 mW/m², 1430 mW/m² e 1540 mW/m². Os estudos utilizando *G. metallireducens* se concentram essencialmente em suas propriedades biorremediadoras, mas as poucas MFCs encontradas na literatura que utilizam esse microrganismo apresentaram densidade de potência máxima^{44,45} de 40 mW/m² e 80 – 100 mW/m².

2.7 MFC E A BIORREMEDIAÇÃO

Espécies *Geobacter* são componentes importantes da comunidade microbiana em aquíferos poluídos com petróleo ou chorume o que pode ser atribuído à capacidade de alguns destes microrganismos de degradar compostos aromáticos. Ambientes naturais de superfície de aquíferos são aeróbios, mas condições anaeróbias desenvolvem-se rapidamente uma vez que contaminantes orgânicos são introduzidos. Uma das principais dificuldades na biorremediação de ambientes subsuperficiais contaminados com compostos orgânicos ou metais é a introdução de um receptor de elétrons ou doador para melhor promover a biodegradação desejada. Por exemplo, biorremediação de águas contaminadas com petróleo são complicadas, pois a introdução de oxigênio abaixo da superfície contaminada é tecnicamente difícil e de alto custo. Fe (III) é um aceptor de elétrons encontrado em altas quantidades em ambientes de degradação

anaeróbica e estudos demonstraram uma remoção de hidrocarbonetos aromáticos de águas subterrâneas contaminadas por petróleo associada a presença geoquímica de Fe (III) disponível para redução⁴⁶. Análises posteriores mostraram uma abundância de espécies *Geobacter* na zona de redução de Fe (III), sendo responsável por 41% da composição da comunidade microbiana ativa em águas subterrâneas e sedimentos. De um modo semelhante, 25% da comunidade microbiana é composta por espécies *Geobacter* em lixiviados provenientes de aterro sanitário que causam contaminação em aquíferos. A quantificação de genes ou proteínas específicas, conhecidas por estarem envolvidas na degradação de compostos aromáticos tem demonstrado a importância das espécies *Geobacter* em remover naturalmente contaminantes aromáticos. Receptores de elétrons alternativos como, por exemplo, Fe⁺³ e sulfato que suportam organismos que realizam respiração anaeróbia podem ser utilizados neste caso, mas eletrodos também apresentam outra possibilidade conveniente. Os estudos realizados com *Geobacter metallireducens*⁴⁶ indicaram que esta espécie é capaz de oxidar tolueno, o composto aromático predominante neste tipo de contaminação, utilizando um eletrodo como acceptor de elétrons final. Estudos preliminares indicaram que eletrodos colocados nos sedimentos abaixo de superfícies contaminadas por petróleo podem acelerar a degradação de hidrocarbonetos aromáticos.

A espécie *Geobacter metallireducens* também é a chave para a redução microbiana da forma oxidada do urânio, U⁺⁶, utilizando este como acceptor de elétrons final ao invés do eletrodo, o que representa uma estratégia potencial para promover a biorremediação de águas subterrâneas contaminadas com urânio. O U⁺⁶ quando reduzido a U⁺⁴ passa para sua forma insolúvel, precipitando e assim podendo ser isolado do sistema, acabando com a contaminação. Uma estratégia simples para prevenir a propagação da contaminação ou ainda acelerar a descontaminação é adicionar na água contaminada um composto orgânico que sirva como doador de elétrons, como acetato por exemplo. Dessa forma o crescimento da cultura de *G. metallireducens* é estimulada, pois esta obtém a maior parte da sua energia pela oxidação de acetato com a redução de um acceptor de elétrons externo. Em ambientes naturais, como já citado anteriormente, são usados óxidos de Fe⁺³ que são abundantes na maioria dos ambientes de subsolo, já neste caso, U⁺⁶ substitui o ferro e acaba servindo como acceptor de elétrons final. Esse mesmo

mecanismo pode ser utilizado para descontaminação de águas com outros contaminantes como solventes clorados por meio de descloração reductiva.^{18,72}

2.8 LIMITAÇÕES DAS MFC

Apesar das MFCs terem recebido crescente atenção nos últimos anos devido a suas aplicações para o tratamento de águas residuais, biorremediação e geração de eletricidade, um aumento na densidade de energia é necessário para que se tornem competitivas com outras fontes de energia renovável. O limite superior da potência atingida nas MFCs ainda não é conhecido por causa da alta resistência interna que limita a densidade de potência máxima. Diversos tipos de MFCs foram comparadas em relação à densidade de potência máxima onde MFCs que utilizaram substratos e microrganismos semelhantes apresentam diferença de até uma ordem de magnitude neste parâmetro.⁴³ Isto demonstra que o desempenho da MFC é determinado por fatores relativos à configuração do reator o qual é limitado por fatores que aumentam a resistência interna, como por exemplo, a demanda de água e nutrientes inorgânicos, assim como diferenças no material usado nos eletrodos e na configuração propriamente dita do reator. Para permitir a operação das MFCs com todo o potencial catalítico dos microrganismos é necessário que haja uma otimização em termos da configuração do reator e dos eletrólitos com o intuito de reduzir a resistência interna.

O desempenho das MFCs, assim como de outras células de combustível, é determinado pela corrente, densidade de potência e taxa de oxidação do combustível. Diferentes fatores podem influenciar na taxa de oxidação de combustível incluído a atividade catalítica no ânodo, difusão do substrato (combustível), difusão e consumo de prótons e elétrons que juntos caracterizam a resistência interna da célula.

Nas MFCs, a taxa de consumo de prótons no cátodo é maior do que a taxa de transferência destes através da membrana.⁵² As células de combustível microbianas empregam uma variedade de compostos inorgânicos necessários para o crescimento das bactérias, além do substrato. Estes compostos dissociados na fase aquosa geram cátions como K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} entre outros. A concentração desses cátions é na ordem de 10^5 vezes maior que a concentração de prótons em pH neutro. Estes cátions

podem interferir no transporte de prótons através da membrana. Além disso, o uso de uma solução aquosa como eletrólito também interfere na transferência de prótons.⁵²

A redução de oxigênio no cátodo é a reação mais utilizada no compartimento catódico por sua disponibilidade infinita e sem custo na forma de ar. No entanto, a cinética da redução do oxigênio em MFCs é muito lenta e tem motivado o desenvolvimento de novas estruturas catódicas bem como cátodos revestidos por catalisadores metálicos com o intuito de acelerar essa reação.

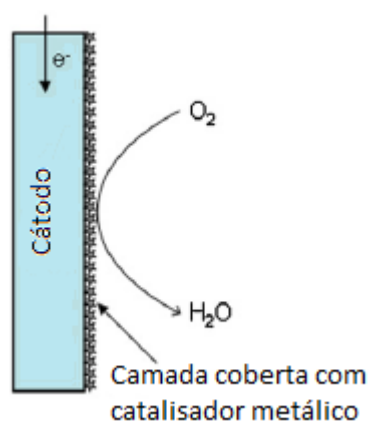


Figura 7. Eletrodo revestido com catalisador metálico.

Carbono é o material mais comumente utilizado no eletrodo, porém é um catalisador pobre para a redução de oxigênio. Melhorias foram observadas no desempenho das células quando catalisadores, como Platina, são adicionados ao cátodo para acelerar a reação de redução do oxigênio,⁴⁷⁻⁵² porém seu uso é limitado devido ao alto custo especialmente para aplicações em larga escala como para o tratamento de águas residuais.

Ferricianeto é outro composto utilizado no compartimento catódico. Possui uma maior cinética de redução do que o oxigênio no cátodo e relativamente alto potencial de redução. Ferricianeto é reduzido a ferrocianeto, assim necessita ser substituído após ser consumido, o que representa uma desvantagem em relação ao oxigênio.

Medidas como redução do espaço entre os eletrodos^{43,51} e cátodo ligado diretamente à membrana semipermeável⁴¹ também causaram melhorias no desempenho da célula. Os estudos reconhecem que as limitações presentes no cátodo e existentes em MFCs têm sido um dos maiores impedimentos para o progresso dessa tecnologia, mas

nenhuma medida quantitativa de como cada nova condição pode remover estas limitações, ao invés de apenas diminuí-las, foi desenvolvida.

Como já mencionado anteriormente, densidade de potência é o dado principal com o qual as condições das MFCs são comparadas. As densidades de potência continuam aumentando quando o tamanho do ânodo é reduzido em até 40%,⁵² ou quando o tamanho do cátodo é aumentado⁵³⁻⁵⁵, evidência que o cátodo, mesmo na presença de catalisadores, continua limitado cineticamente. Estudos usando MFCs com tamanhos similares produzem densidades de potência que chegam a se diferenciar em até uma ordem de magnitude.⁵⁶ Isto sugere que a taxa biocatalítica máxima que ocorre no ânodo continua desconhecida e qualquer esforço para medir o desempenho do ânodo, retorna em informações sobre o cátodo.

2.8.1 Limitações catódicas

A corrente gerada na MFC depende da cinética da reação de redução que ocorre no cátodo. A cinética desta reação está limitada por uma barreira de energia de ativação que impede a conversão do oxidante a uma forma reduzida (Equação 2).



Quando corrente é gerada por uma célula de combustível, uma parte do potencial do cátodo é usado para vencer a barreira de ativação, esse potencial é chamado de perda por ativação catódica (*cathodic activation losses*).⁵⁴

A perda por ativação catódica resulta em uma característica exponencial formando perdas na curva corrente x tensão ($i \times V$) em baixas densidades de corrente (Figura 8). À medida que corrente é consumida pela MFC, a perda por ativação aumenta e resulta em um potencial de célula menor. A perda por ativação catódica domina o desempenho das MFCs e a magnitude desta perda depende da cinética da reação de redução. A cinética pode ser melhorada com a diminuição da barreira de ativação através do aumentando da área de interface da reação, aumento da temperatura e concentração do oxidante.⁵⁴

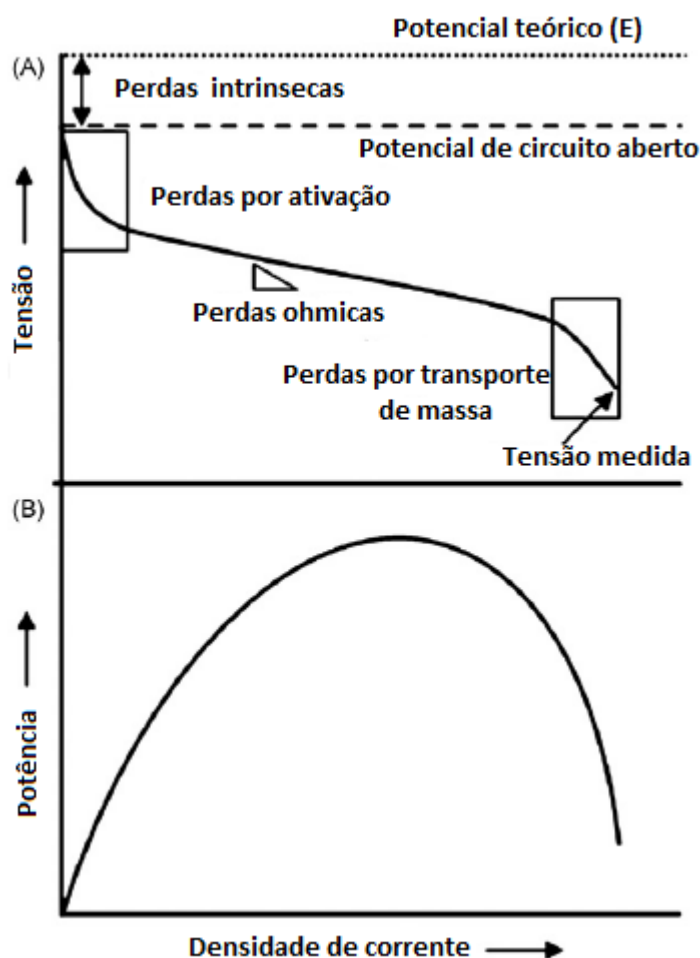


Figura 8. A) Esquema das perdas de tensão para o compartimento catódico no qual pode ser visualizadas perdas por ativação, ôhmicas e por transporte de massa. B) Uma curva de potência típica.

O desempenho das MFCs também é restringido por perdas ôhmicas, também conhecidas por resistência interna. Esta perda é referente à voltagem requerida para o transporte de H^+ e elétrons. Uma vez que os condutores não são ideais, existe uma resistência intrínseca para o fluxo de cargas. As perdas ôhmicas representam a voltagem perdida para realizar o transporte de cargas. Esta perda segue a lei de Ohm:

$$V = i \times R_{(ôhmica)} \quad (3)$$

Onde i é a corrente (A) e $R_{(\text{ôhmica})}$ é a resistência ôhmica (Ω) da MFC. A resistência catódica é uma combinação da resistência iônica ($R_{\text{iônica}}$) e eletrônica, R_{elett} e leva em consideração a resistência dos elétrons, eletrólito e interconexões:

$$R_{(\text{ôhmica})} = R_{\text{iônica}} + R_{\text{elett}} \quad (4)$$

A resistência interna é dominada pela resistência referente ao eletrólito já que a condutividade iônica é muito mais baixa do que a condutividade elétrica dos materiais do eletrodo. A resistência ôhmica do eletrólito, $R_{\text{iônica}}$, pode ser expressa por:

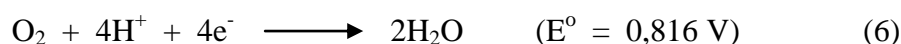
$$R = \frac{l}{AK} \quad (5)$$

Onde l é a distância (cm), A a área da seção transversal (cm^2) na qual ocorre a condução iônica e K é a condutividade ($\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$) do eletrólito.

As perdas ôhmicas catódicas são mais pronunciadas em densidades de corrente médias e seguem a lei de Ohm, a voltagem diminui linearmente com o aumento da corrente (Figura 8). A redução das perdas ôhmicas catódicas é importante para otimizar o desempenhos das MFCs.

O processo de fornecimento de oxidantes (ex. O_2) no cátodo da MFC é governado pelo processo de transporte de massa. Transporte de massa insuficiente causa depleção do reagente que afeta tanto a voltagem quanto a taxa de reação, levando a perdas no desempenho da célula. Esta perda é a voltagem requerida para conduzir os processos de transporte de massa no cátodo e é referente à perda da concentração catódica ou perda por transporte de massa. Estas perdas ocorrem em altas densidades de corrente e tentem a aumentar com seu aumento (Figura 8). Limitações por transporte de carga devido ao transporte do oxidante no compartimento catódico são tipicamente mais severas que as limitações por transporte no compartimento anódico. Assim, quando perdas por transporte de massa são determinadas em células de combustível, apenas a concentração limitante para o oxidante é considerada.^{52,54}

Como já mencionado anteriormente, a redução de oxigênio no cátodo é a reação catódica mais comum em MFCs. Dois caminhos podem ocorrer durante a oxidação catódica do oxigênio. O caminho desejado é a produção de água (Equação 6):

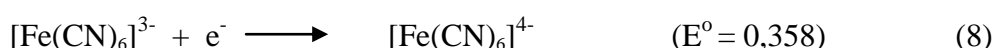


O outro caminho consiste na produção de peróxido de hidrogênio:



A redução incompleta do oxigênio resulta em uma baixa eficiência de conversão de energia e produz intermediários reativos e espécies radicais livres que podem ser destrutivas. A baixa taxa de redução de oxigênio na superfície dos eletrodos de carbono implica em uma alta resistência interna que é o maior fator limitante do desempenho das MFCs. Portanto a otimização das taxas das reações catódicas impacta na eficiência e potência produzida pela MFC e representa o maior desafio para a pesquisa e desenvolvimento.^{52,54}

O Ferricianeto possui uma cinética de redução maior do que a do oxigênio além de ter um potencial redução relativamente alto. Diferentemente do oxigênio sua concentração em solução não é limitada pela solubilidade (Equação 8).



Oh et al. descreveram um aumento de 50-80% na potência máxima usando ferricianeto no compartimento catódico comparado a cátodos com oxigênio saturado em solução aquosa ou cátodos de oxigênio com eletrodos de carbono revestidos de platina. As diferenças observadas são atribuídas ao alto potencial de circuito aberto e uma alta eficiência na transferência de massa das soluções de ferricianeto comparadas ao oxigênio dissolvido. Apesar de ser amplamente usado em laboratório, ferricianeto não é uma escolha sustentável para a geração de energia em MFCs, fundamental característica a qual esta tecnologia se propõe.^{53, 56, 57} É potencialmente tóxico (em pH ácido), requer

reposição e difunde através da membrana em longos tempos de operação o que pode reduzir o desempenho da MFC.

Outra causa que colabora para a redução no desempenho das MFC é a perda ôhmica intrínseca à membrana semipermeável, que apresenta uma resistência ao transporte de prótons. Esta membrana semipermeável funciona como um eletrólito sólido, permitindo o fluxo de prótons do ânodo para o cátodo e não é conduz elétrons. A magnitude da resistência pode ser mitigada otimizando as propriedades físicas e o tipo de membrana. A espessura e a área superficial da membrana afetam a resistência ao transporte de prótons. O efeito da espessura da membrana no desempenho da MFC ainda não foi reportado, porém é previsto que membranas mais finas produzam menores perdas ôhmicas como resultado da menor resistência à transferência de prótons e fluxo mais rápido. Entretanto, essas tendem a passar uma pequena quantidade de substrato pela membrana. Devido a sua alta condutividade a cátions, Nafion®, um polímero sintético tetrafluoretileno sulfonado com espessura de poro de <5 nm, tem sido usado extensivamente como membrana semipermeável em MFC. A estabilidade do Nafion a longo prazo é desconhecida e pode ser comprometida pela degradação por substâncias químicas e por oxidação biológica nos compartimentos anódico e catódico. Condições de operação como, por exemplo, temperatura ambiente, pH neutro e presença de íons com carga positiva além de prótons podem reprimir a funcionalidade do Nafion.⁴⁸

Outros polímeros estão em desenvolvimento e sendo testados para substituição do Nafion, que é o componente de maior custo nas MFCs, porém este ainda é o mais utilizado neste tipo de sistema.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse trabalho é aumentar a densidade areal de potência produzida pelas MFCs .

Um aumento na densidade de energia é necessário para que as MFCs se tornem competitivas com outras fontes de energia renovável, mas o progresso tem sido impedido por limitações catódicas, conforme descrito anteriormente. A redução de

oxigênio no cátodo é a reação mais utilizada no compartimento catódico. No entanto, a cinética desta reação em MFCs é muito lenta, o que motiva este estudo a realizar uma comparação com diferentes tipos de cátodos e comparar o desempenho dos mesmos. A densidade de potência é a principal medida com a qual as condições das MFCs são comparadas e serão utilizadas como parâmetro neste trabalho.

Para que as MFCs desempenhem um papel mais importante como fontes renováveis de energia, uma compreensão fundamental dos processos que ocorrem no ânodo, bem como no cátodo, deve ser desenvolvida. A fim de compreender as limitações cinéticas dos biofilmes associadas ao ânodo, as limitações cinéticas no cátodo da MFC devem ser removidas. Para isso optou-se pela utilização de culturas puras para a eliminar interferentes.

Após a otimização do desempenho das células, este trabalho busca fazer a avaliação da possibilidade de utilização das propriedades biorremediadoras da espécie *G. metallireducens* em uma MFC. O objetivo é avaliar se a espécie produz uma densidade de corrente competitiva com relação a *G. sulfurreducens*, bem como avaliar se estas duas espécies são capazes de utilizar glicerol, subproduto proveniente da produção de biodiesel, como substrato de modo a tratar os resíduos provenientes da produção de biodiesel e produzindo eletricidade. Também se busca avaliar o comportamento de uma cocultura utilizando as duas espécies.

3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

O objetivo geral deste trabalho será alcançado através das seguintes ações:

- Construção e otimização e protótipo, buscando o melhor desempenho quando avaliada a densidade de potência;
- Comparação entre cátodos de O₂ e cátodos de [Fe(CN)₆]³⁻;
- Avaliação e comparação entre *G. sulfurreducens*, *G. metallireducens* e uma cocultura das duas espécies na produção de potência;
- Avaliação da capacidade de *G. metallireducens* em utilizar glicerol com fonte de carbono.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CONSTRUÇÃO DAS MFCs

As MFCs foram construídas no laboratório do Prof. Allon Hochbaum, com material fornecido pela Universidade da Califórnia – Irvine, conforme os passos descritos a seguir.

4.1.1. Eletrodos

São utilizados dois tipos de eletrodos nas MFCs: eletrodo de tecido de carbono no cátodo e de titânio revestido de ouro no ânodo.

O eletrodo utilizado no ânodo é construído com uma chapa de titânio de 0,5 mm de espessura e uma área em torno de 1 cm² cortada com uma tesoura, polida com uma lixa fina para a remoção de óxidos e em seguida lavada com acetona, etanol e água, consecutivamente, para a retirada de contaminantes orgânicos. A chapa de Ti foi revestida em um dos lados por uma camada de 250 nm de ouro através de um processo de “sputtering” realizado pela UC San Diego. A resistência é medida com um multímetro e eletrodos com valores de resistência superiores a 1,5 Ω são descartados. Um fio de 15 a 20 cm de comprimento e 0,38 mm de espessura de aço inoxidável isolado (Rohs) foi decajado a 3 – 4 cm de uma das extremidades e esta foi enrolada na forma de espiral, conforme Figura 9.

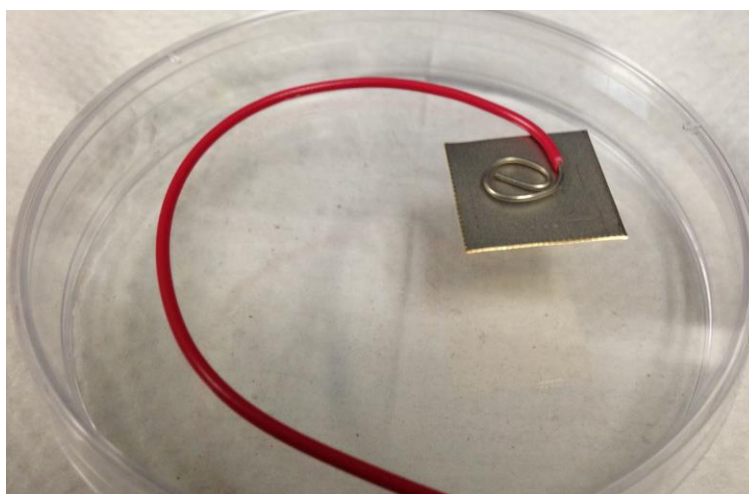


Figura 9. Fio de aço inoxidável sobre parte traseira do eletrodo de Ti/Au que constitui o ânodo.

A parte em espiral do fio de aço inoxidável foi fixada à parte traseira do pedaço de metal, a qual não está coberta com ouro, com resina epóxi condutiva de prata (MG Chemicals). O eletrodo foi levado ao forno a 70 °C por 15 minutos para finalizar o processo de cura da resina epóxi. A parte do eletrodo não revestida com ouro foi então totalmente coberta com resina de silicone (DAP Adhesive Sealent), de modo que nem a resina epóxi, nem o pedaço do fio de aço inoxidável, nem o titânio, ficassem expostos. A parte frontal do eletrodo foi também coberta de modo que apenas a área de interesse (variável conforme o experimento) estivesse disponível para ser usado como ânodo (Figura 10), 0,5 cm da outra extremidade do fio foi desencapada para que um conector macho fosse conectado.



Figura 10. Eletrodo de ouro (ânodo) com parte frontal parcialmente coberta com silicone. Quadrado de 0,6 cm de lado de Au exposto.

Para a construção do cátodo, um fio de titânio foi lixado e costurado em um pedaço de tecido de carbono (Fuelcellstore.com) de 6 cm x 6 cm dobrado ao meio duas vezes (Figura 11).



Figura 11. Cátodo de tecido de carbono costurado com fio de titânio.

Na extremidade do fio de titânio, foi conectado um conector macho Micro-fit (Digi-Key). A resistência em ambos os eletrodos foi medida e eletrodos com resistências maiores ou iguais a $1,5 \Omega$ foram refeitos.

4.1.2. Montagem da MFC

Dois recipientes em “formato H” de borosilicato de 100 ml cada foram produzidos por “Adams & Chittenden Scientific Glass”. As duas saídas laterais foram tampadas com rolhas de borracha butílica e um fio de titânio de mais ou menos 20 cm foi introduzido na rolha com ajuda de uma agulha. Conectores fêmeas foram fixados nas duas extremidades do fio. Os eletrodos, após serem enxaguados com acetona, etanol e água para a retirada de contaminantes orgânicos, foram conectados às células. As conexões foram testadas mais uma vez com um multímetro para verificar a resistência.

Os eletrodos foram posicionados dentro do “pescoço” da célula, de modo que ficassem o mais próximo possível do flange (Figura 12).

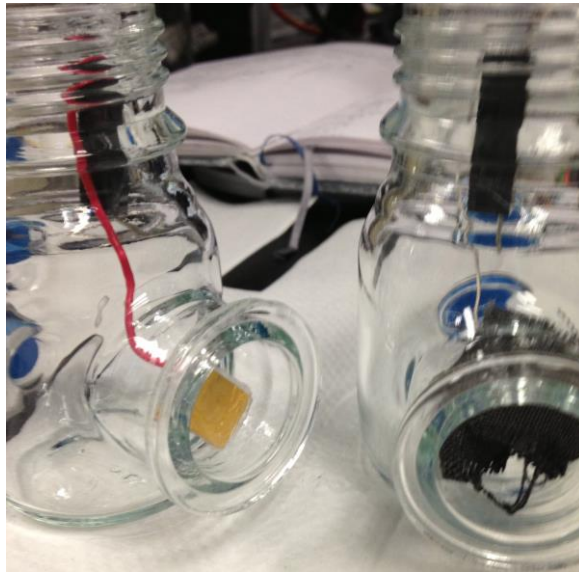


Figura 12. Eletrodos conectados a célula.

Um pedaço de Nafion-117 (fuelcellstore.com), membrana permeável a prótons, foi colocado no flange do ânodo e fixo com um anel. Um grampo de plástico foi acoplado às duas células de modo a fixá-las, conforme mostrado na Figura 13.

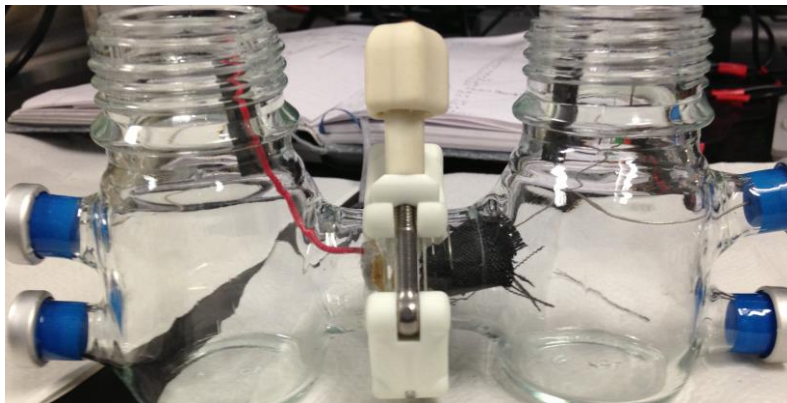


Figura 13. Células fixadas com grampo de plástico, separadas pela membrana semi permeável

Antes de ser utilizada, um agitador foi introduzido no compartimento anódico, os dois lados da célula foram tampados e a MFC foi autoclavada a 120°C por 20 minutos.

4.2. CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS

As MFC foram inoculadas com *G. sulfurreducens*, *G. metallireducens* e/ou uma cocultura das duas espécies. As cepas isoladas foram adquiridas do fornecedor DSMZ. *G. sulfurreducens* são fornecidas em solução de glicerol 20 %, evitando o rompimento das células quando armazenadas a - 80 °C e *G. metallireducens* na forma desidratada.

G. sulfurreducens foi inoculada em meio de cultura recomendado pelo fornecedor, contendo os seguintes componentes: NH₄Cl (0,25 g/L), NaH₂PO₄ (0,6 g/L), KCl (0,1 g/L), NaHCO₃ (2,5 g/L), traços de vitaminas (10 mL), traços de minerais (10 mL), fumarato (6,4 g/L) e acetato de sódio (0,82 g/L).

O meio de cultura foi agitado sob aquecimento até a dissolução total dos componentes. Uma mistura de gás contendo 20% de CO₂ e 80% de N₂ foi injetada através de uma agulha esterilizada, mantendo-se o aquecimento e a agitação até que o volume fosse reduzido de 900 mL a 800 mL. A boca do frasco foi coberta com papel alumínio em formato de cone, de modo a permitir apenas a saída do gás injetado. Assim que concluída essa etapa o gás foi removido e o frasco foi tampado com rolha de borracha, não permitindo a entrada de oxigênio. O meio de cultura foi então autoclavado a 121 °C, para evitar qualquer tipo de contaminação.

Para iniciar uma nova cultura, um bastão de madeira estéril e descartável é mergulhado no frasco “mãe”, previamente descongelado, contendo as bactérias em glicerol, e em seguida mergulhado em um tubo de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura. A partir deste tubo de ensaio são feitas diluições 1:10 e 1:100.

Para iniciar as culturas utilizadas nas células de combustível, 1 mL de uma cultura prévia foi inoculada em um tubo de ensaio previamente esterilizado contendo 9 mL do meio de cultura transferido para o tubo com uma pipeta descartável e selado com rolhas de borracha e anel de alumínio. Agulhas e seringas descartáveis são utilizadas para fazer o manuseio de meio de cultura e bactérias previamente cultivadas para o novo tubo. Periodicamente novas culturas são iniciadas a partir das cepas fornecidas pela DSMZ para garantir que não haja contaminações nem mutações das bactérias utilizadas. Todas as operações são realizadas dentro da câmara anaeróbica.

O cultivo de *G. metallireducens* foi testado em 3 diferentes meios de cultura, já que a primeira tentativa para reidratação das cepas fornecida pela ATCC não foi bem

sucedida. Foram testados os meios de cultura descritos pelos fornecedores ATCC, DSMZ e descrito em uma publicação de Summer ET AL.⁷¹ As cepas fornecidas pela DSMZ foram reidratadas e inoculadas nos 3 meios de cultura diferentes, sendo que as bactérias apresentaram crescimento em 5 dias no meio de cultura descrito por Summer denominado Media I, e tempos maiores para o meio recomendado por DSMZ e ATCC. O crescimento das bactérias foi acompanhado por medidas de densidade óptica, porém quando há uma grande densidade bacteriana a coloração do meio muda de marrom para uma aparência esbranquiçada, o que alterou totalmente a curva de densidade óptica que estava sendo traçada. Ao mesmo tempo a mudança na aparência deixa claro quando as bactérias estão se desenvolvendo descartando a necessidade de um acompanhamento por medidas de densidade óptica.

A partir desses resultados Media I foi definido como o meio de cultura padrão para *G. metallireducens*. Media I é preparado utilizando-se os seguintes reagentes: KH_2PO_4 (0,2 g/L), K_2HPO_4 (0,22 g/L), NH_4Cl (0,2 g/L), KCl (0,38 g/L), NaCl (0,36 g/L), $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g/L), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L), NaHCO_3 (1,8 g/L), Na_2CO_3 (0,5 g/L), traço de vitaminas e minerais (10 mL), citrato de Fe(III) (13,7 g/L) e acetato de sódio (1,64 g/L).

O meio foi degaseificado e autoclavado da mesma forma descrita para o meio utilizado nas *G. sulfurreducens*. Como cuidado adicional, Media I foi protegido da luz devido a decomposição por exposição a luz sofrida por citrato de Fe(III).

Com o objetivo de comparar o desempenho dos dois tipos de bactérias utilizadas bem como utilizar uma cocultura das duas espécies, foi necessário testar o desenvolvimento da *G. sulfurreducens* no meio usado para *G. metallireducens*, já que o contrário não seria possível visto que a última não utiliza fumarato como acceptor de elétrons, contido no meio da primeira.

O desempenho da *G. sulfurreducens* se mostrou satisfatório utilizando-se Media I, não mostrando diferenças no desenvolvimento bacteriano quando comparado com o meio proposto pela DSMZ. A partir desta informação foi possível realizar os experimentos descritos no item 5.2 utilizando Media I em todas as condições.

4.3 OPERAÇÃO DAS CÉLULAS

Após a construção da MFC esta é esterilizada e, assim que a temperatura ambiente é alcançada, são adicionados 90 mL do meio de cultura e 9 mL de bactérias pré cultivadas no compartimento anódico. Ao compartimento catódico é adicionada solução tampão de fosfato de modo a cobrir todo o eletrodo de carbono. A solução tampão de fosfato tem a seguinte composição: NH_4Cl (0,31 g/L), NaH_2PO_4 (2,69 g/L), Na_2HPO_4 (4,33 g/L), KCl (0,13 g/L). Para cátodos com oxigênio, ar foi borbulhado através de um filtro estéril de 2 μm para o compartimento catódico. Para cátodos com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, 25 mM de ferrocianeto de potássio foram dissolvidos na solução tampão de fosfato previamente preparada.

A solução no ânodo foi continuamente agitada para melhorar a distribuição do substrato para as bactérias. O ânodo foi conectado ao cátodo por uma resistência de 560 Ω . O meio de cultura no ânodo foi substituído, assim que o meio apresentou turbidez: 2 a 3 dias para *G. sulfurreducens* e 4 a 5 dias para *G. metallireducens* e coculturas. Após a remoção das bactérias planctônicas, 90 mL de um novo meio de cultura foi introduzido no qual fumarato ou citrato de Fe(III), usado como aceptor de elétrons, foi omitido. Para garantir a fonte de carbono das bactérias (acetato) no compartimento anódico, o meio de cultura foi substituído a cada 3-4 dias, o que caracteriza o processo por bateladas.

A solução no compartimento catódico é substituída em cátodos de oxigênio, sempre que o pH ficar inferior a 7. Em cátodos com ferricianeto é feita a substituição assim que uma queda na potência da célula é detectada.

Para otimizar o processo seria interessante utilizar uma concentração maior de acetato no ânodo, reduzindo as trocas do meio de cultura, porém concentrações maiores do que 50 mM de acetato inibiram o crescimento bacteriano, mostrando-se tóxicas às bactérias. Quando concentrações maiores que 150 mM de ferricianeto são utilizadas no cátodo ocorre obstrução da membrana semipermeável (Figura 14), o que implica, necessariamente, na manutenção do procedimento utilizado o qual substitui com uma maior periodicidade as soluções catódica e anódica.



Figura 14: Entupimento da membrana semipermeável pela alta concentração de ferricianeto.

4.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Todas as medidas eletroquímicas foram conduzidas usando um potenciostato Gamry Instruments. O potencial do ânodo e do cátodo foram medidos contra um eletrodo de referência de Ag/AgCl inserido no cátodo. Depois da MFC ser desconectada e permanecer em circuito aberto (OCP) por, no mínimo, 30 minutos ou até a estabilização da voltagem, a voltametria de varredura linear (LSV) foi conduzida usando o ânodo como o eletrodo de trabalho e o cátodo como eletrodo de referência, numa taxa de 1 mV/s. A densidade de potência foi calculada utilizando a equação $P = IV/A$, onde I é a corrente em amperes, V é a voltagem em volts e A a área do ânodo exposta em m^2 .

4.4.1 Potencial de circuito aberto (OCP) – *Open Circuit Potential*

Este experimento mede a diferença de potencial entre o ânodo e o cátodo. Antes de ser realizada a medida, o circuito deve estar aberto (desconectado à resistência) por um período aproximado de 30 minutos, até que o sistema esteja estável. Um gráfico de V x tempo, similar à Figura 15, é gerado.

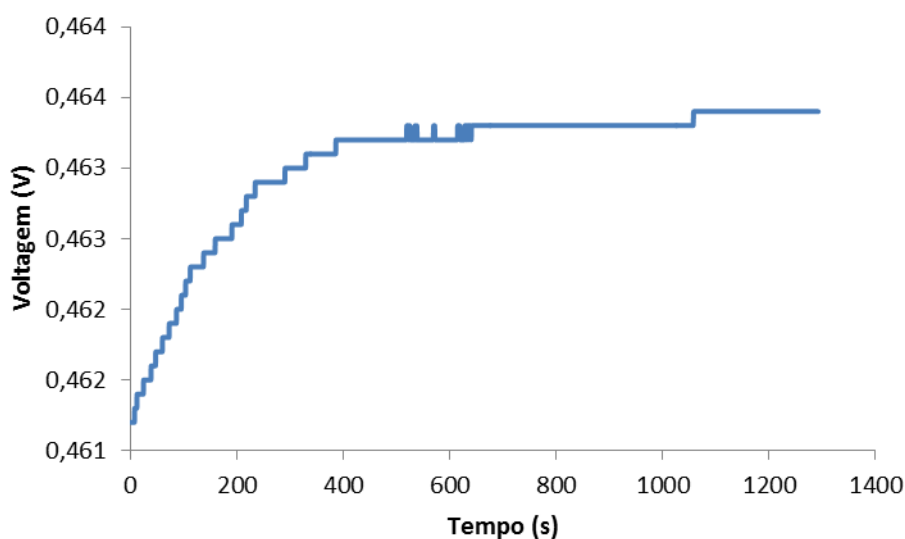


Figura 15. Gráfico V x t(s) obtido na medida de potencial de circuito aberto.

Pode-se verificar que depois de ocorrido certo tempo o sistema atinge o estado estacionário (linha contínua). Esse é o potencial de circuito aberto de interesse. Este experimento deve ser realizado sempre antes das medidas de LSV, pois o valor obtido é utilizado como parâmetro no experimento citado.

4.4.2 Voltametria de varredura linear

Em voltametria, um sinal de excitação de potencial variável é aplicado sobre uma célula eletroquímica contendo um microeletrodo. Esse sinal dá uma resposta característica de corrente na qual se baseia o método. O sinal de excitação clássico é a varredura linear na qual o potencial de corrente contínua aplicado na célula aumenta linearmente em função do tempo. Neste trabalho a velocidade de varredura aplicada foi

de 1 mV/s e foi realizada uma varredura de 0 V ao potencial obtido com o circuito aberto. A corrente que se desenvolve na célula é então registrada em função do tempo e, portanto, como uma função do potencial aplicado. A partir desses dados um voltamograma é obtido (gráfico da corrente em função do potencial aplicado) semelhante à Figura 16.

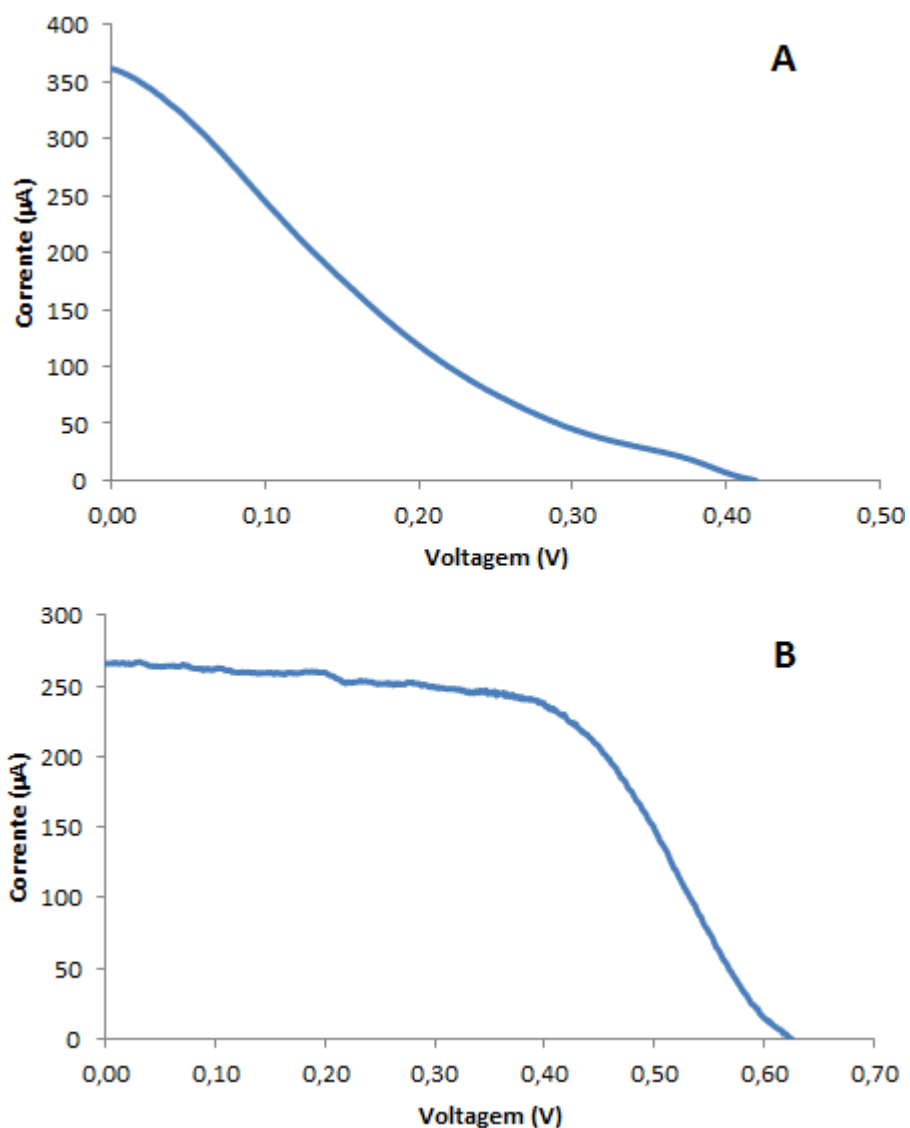


Figura 16. Voltamograma típico para: A) cátodos com oxigênio B) cátodos com ferricianeto.

A corrente máxima esperada (com um desvio para cima) deve ser atribuída, pois irá afetar a sensibilidade da medida.

A partir dos valores de corrente e voltagem obtidos neste experimento pode-se construir as curvas de polarização e potência das células.

4.5. MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

O sistema conhecido como microscopia confocal utiliza uma fonte de laser para promover a excitação dos fluoróforos. Através de um conjunto de lentes o microscópio é capaz de focar um cone de luz laser em uma profundidade predeterminada da amostra a ser estudada. Mudando-se o ponto focal (mantida a profundidade) é possível iluminar todo o plano em estudo, ponto a ponto. Ao retornar pelo mesmo caminho óptico, a luz devida a fluorescência é separada utilizando-se um conjunto de espelhos chamados divisor de luz. Em seguida a luz separada passa por um pequeno orifício, chamado pinhole, capaz de separar a luz proveniente do ponto focado, eliminando a luz emitida por pontos fora de foco. Com isso só a luz dos pontos em foco é registrada, com a ajuda de tubos fotomultiplicadores. Estes sinais gerados pelas fotomultiplicadoras são processados por um computador e assim imagens bidimensionais extremamente precisas podem ser construídas. A obtenção de imagens sucessivas de diferentes planos da mesma amostra possibilita construir imagens tridimensionais e imagens tridimensionais em movimento. O inconveniente dessa técnica é a degradação dos fluoróforos, o que leva à utilização do confocal para o estudo de fenômenos mais rápidos, no caso de espécimes vivos, ou para estudar detalhes internos das células em espécimes vivos ou fixados.

Nesse trabalho a técnica de microscopia confocal de varredura a laser foi usada para analisar os biofilmes formados no ânodo, utilizando um microscópio confocal modelo LSM 780 da “Carl Zeiss Microscopy”. Antes de serem analisados, os biofilmes passaram por um processo de fixação, imersos em solução de 5% de formaldeído/glutaraldeído de um dia para outro, desidratados em soluções de etanol a 25%, 50%, 75% e 95% respectivamente e embebidos em solução de agarose a 0,1%. Após este processo, os biofilmes foram imersos em 50 μ M de isotiocianato de fluoresceína (FITC) em PBS (solução tampão salina de fosfato) e analisados usando uma excitação 2-photon com um comprimento de onda de 820 nm. A espessura e a morfologia do biofilme foram analisadas usando o software ImageJ®.

4.6. FISH – HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU*

“Fluorescence *in situ* hybridization” (FISH) ou hibridização fluorescente *in situ* é uma técnica citogênica desenvolvida por pesquisadores biomédicos utilizada para detectar, localizar, visualizar, identificar e enumerar a presença ou ausência de seqüências específicas de DNA ou RNA em cromossomos, sem alterar a morfologia ou integridade celular. FISH é utilizado para achar características específicas no DNA para uso na medicina e identificação de espécies. FISH também é utilizado para detectar e localizar lugares específicos do RNA em células, amostras de tecido e células tumorais, análise de danos cromossômicos, mapeamento genético, toxicologia molecular, genômica comparativa, biologia evolutiva, ecologia microbiana e diagnóstico de doenças. Além disso, pode ser aplicada em detecção de microrganismos em ambientes complexos como microbiota intestinal, cavidade oral, infecções do trato respiratório, hemoculturas, simbioses⁷³. Neste contexto, essa técnica é utilizada neste trabalho para diferenciar dois tipos de bactérias em uma comunidade, podendo-se identificar a presença ou não das mesmas bem como o tipo de organização com a qual estas se apresentam.

Após a descoberta de que moléculas de RNA conseguem o anelamento com seqüências complementares de DNA ou RNA para formar híbridos DNA-RNA e RNA-RNA, biólogos começaram a considerar a possibilidade da hibridização em preparos intracelulares de DNA-RNA. A hibridização é uma reação muito dinâmica em que uma seqüência alvo desnaturada e uma sonda de fita simples de DNA ou RNA complementar formam um híbrido estável pela ação do calor⁷³.

No procedimento histoquímico da FISH, o princípio básico é o anelamento da sonda com a seqüência alvo, para a visualização em microscópio epifluorescente. Entende-se por sonda, uma seqüência de oligonucleotídeos complementares e específicos marcados com substâncias fluorescentes as quais se anelam ao alvo. Há duas possíveis marcações das sondas, a direta e a indireta. O processo mais utilizado, por ser mais rápido e de fácil execução, é a marcação direta. Um ou mais fluorocromos são diretamente conjugados às sondas que se ligam nas regiões 5' ou 3' do alvo.

A técnica consiste na fixação, permeabilização, hibridização, lavagem para remoção das sondas em excesso e detecção por microscopia fluorescente⁷³ (Figura 17).

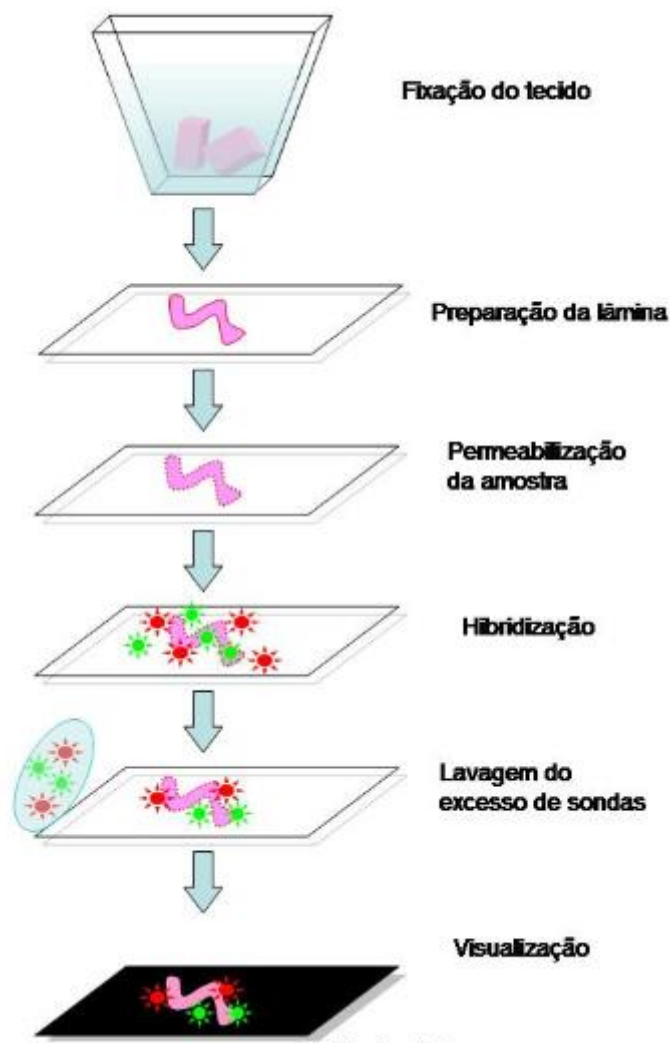


Figura 17. Principais etapas da hidridização fluorescente *in situ*.

Antes da hibridização, as amostras contendo os micro-organismos são fixadas para proteger o RNA da degradação de RNAses endógenas e permeabilizadas para permitir que as sondas penetrem na célula. A maioria das aplicações da FISH tem como alvo o RNA ribossomal. A utilização deste alvo justifica-se primeiramente por todas as células necessitarem de ribossomos para a translação, portanto, podem estar presentes em todas as células vivas. A segunda razão é a sequência do rRNA ser evolutivamente conservada em relação a outras sequências de genes dentro de uma mesma espécie, não sendo possível desenhar uma sonda para identificar grandes domínios taxonômicos como filos, classes ou ordens. A terceira e última razão é, que, como cada célula contém

muitos ribossomos, esse alvo é naturalmente amplificado podendo atingir um número de 100.000 cópias por célula.

As sondas utilizadas em FISH são oligonucleotídeos entre 15 e 30 bases com única molécula fluorescente ligada covalentemente ao 5'-terminal. Neste trabalho utilizou-se uma sonda do 16S rRNA das espécies estudadas. Os fluorocromos utilizados foram isotiocianato de fluorecina (FITC), para *G. metallireducens* e um derivado das rodaminas, Tetramethyl-Rhodamine-Isothiocyante (TRITC) para *G. sulfurreducens* (Tabela II).

Tabela II. Fluorocromos utilizados e seus respectivos comprimentos de onda

Fluorocromo	Comprimento de onda (nm)		
	Excitação	Emissão	Cor
FITC	492	528	Verde
TRITC	557	576	Vermelho

A partir desta técnica foi possível visualizar a organização da cocultura no biofilme, verificar a pureza das demais culturas e medir a espessura do biofilme formado no eletrodo. Os procedimentos foram seguidos rigorosamente conforme o protocolo FISH e, em seguida, as amostras foram analisadas com microscópio confocal de varredura a laser.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em torno de 70 células foram construídas e as diferentes condições e resultados referentes a estas avaliações são apresentados a seguir. Com a otimização de parâmetros relacionados à configuração da célula foi possível obter um melhor desempenho das MFCs. A seguir seguem alguns exemplos de células construídas, as condições de construção, as respectivas curvas de polarização e curvas de potência obtidas.

A célula representada pela Figura 18 foi uma das primeiras células construídas com um valor significativo de potência. A densidade máxima de potência atingida foi de 0,087 W/m², sendo que a área de ânodo utilizada foi de 6,0 x 10⁻⁴ m². Quando a célula

foi construída não houve preocupação com a distância entre os eletrodos e o cátodo utilizado foi de oxigênio.

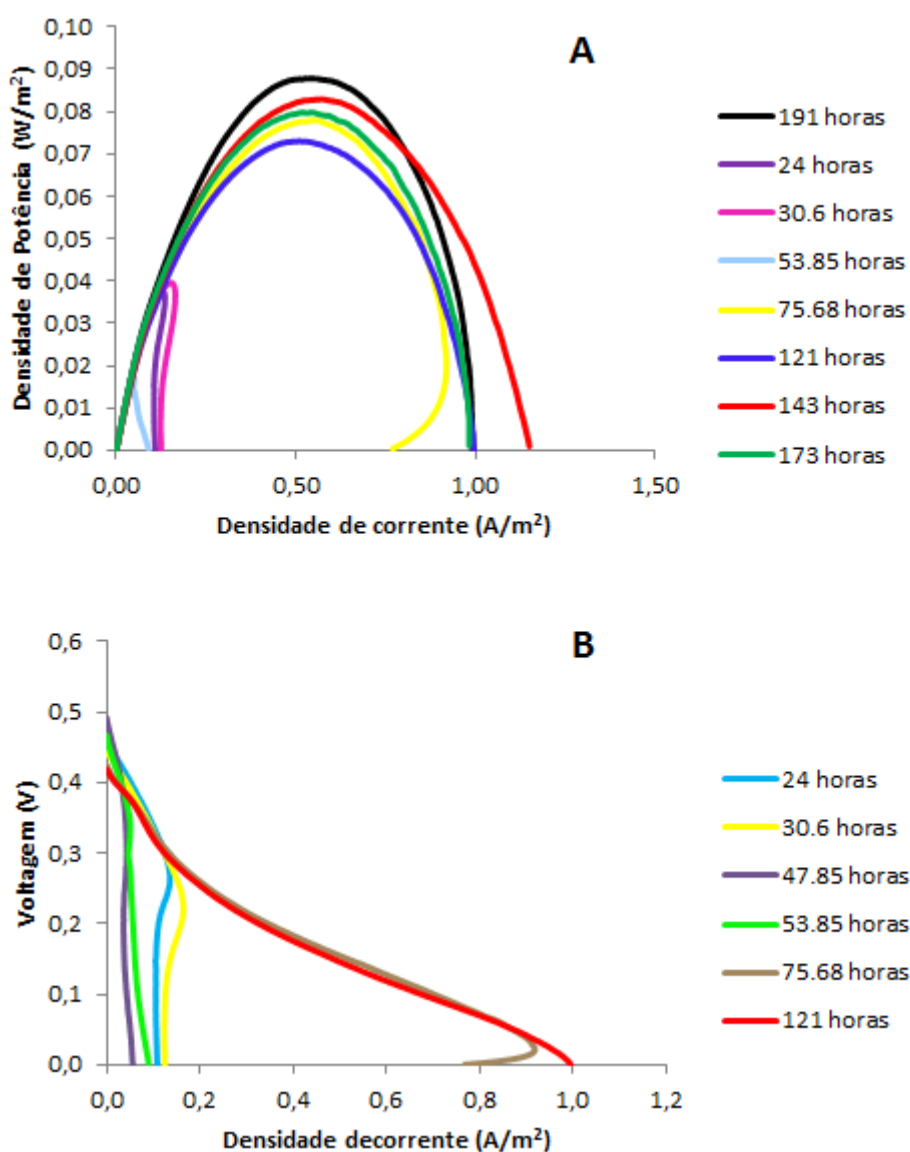


Figura 18. A) Curva de potência nas respectivas horas de operação e B) Curva de polarização nas respectivas horas de operação para a célula constituída por cátodo de O₂ e área de ânodo de $6,0 \times 10^{-4} \text{ m}^2$.

Na construção da célula representada pela Figura 19 houve a preocupação de manter os eletrodos o mais próximo possível, facilitando o transporte de prótons através da diminuição da distância entre os mesmos. Para tanto os eletrodos foram acomodados na “boca” das células em formato H, o mais próximo possível da membrana semipermeável. Este cuidado passou a ser tomado para todas as demais células

construídas, visto que houve um aumento de potência após a utilização desse procedimento. A densidade de potência máxima atingida foi de $0,16 \text{ W/m}^2$, sendo que a área de ânodo foi reduzida de $6,0 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ para $4,0 \times 10^{-4} \text{ m}^2$. O cátodo utilizado foi de oxigênio.

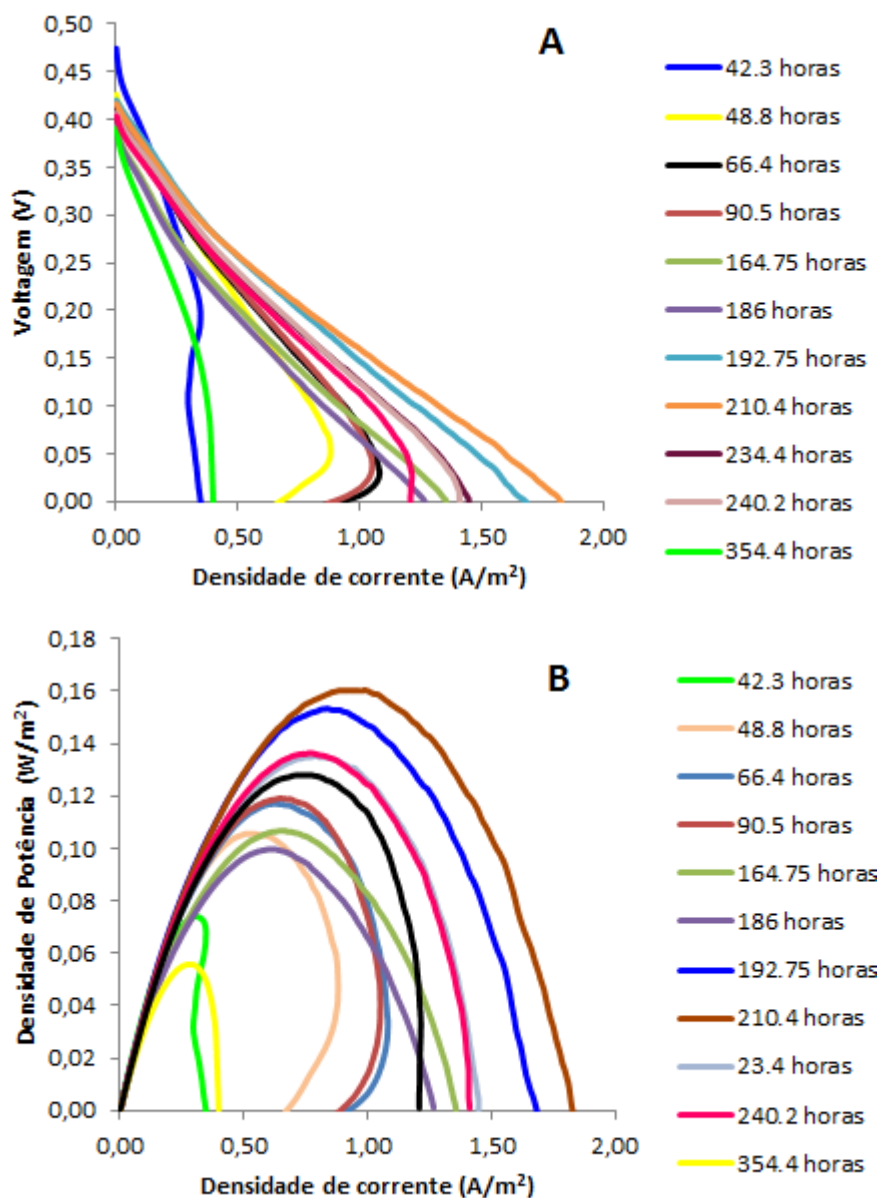


Figura 19. A) Curva de polarização nas respectivas horas de operação e B) curva de potência nas respectivas horas de operação. Ambas as curvas são referentes a célula constituída por cátodo de O_2 e área de ânodo de $4,0 \times 10^{-4} \text{ m}^2$, distância mínima entre eletrodos e membrana semipermeável.

Na construção da célula representada pela Figura 20 a área do ânodo foi reduzida para $1,82 \times 10^{-4} \text{ m}^2$, pois foi notado que uma diminuição na área do ânodo produziu um aumento na densidade de corrente, o que nos mostra as curvas de polarização e potência da célula. A densidade de potência máxima passou para $0,51 \text{ W/m}^2$ com a utilização de cátodo de oxigênio.

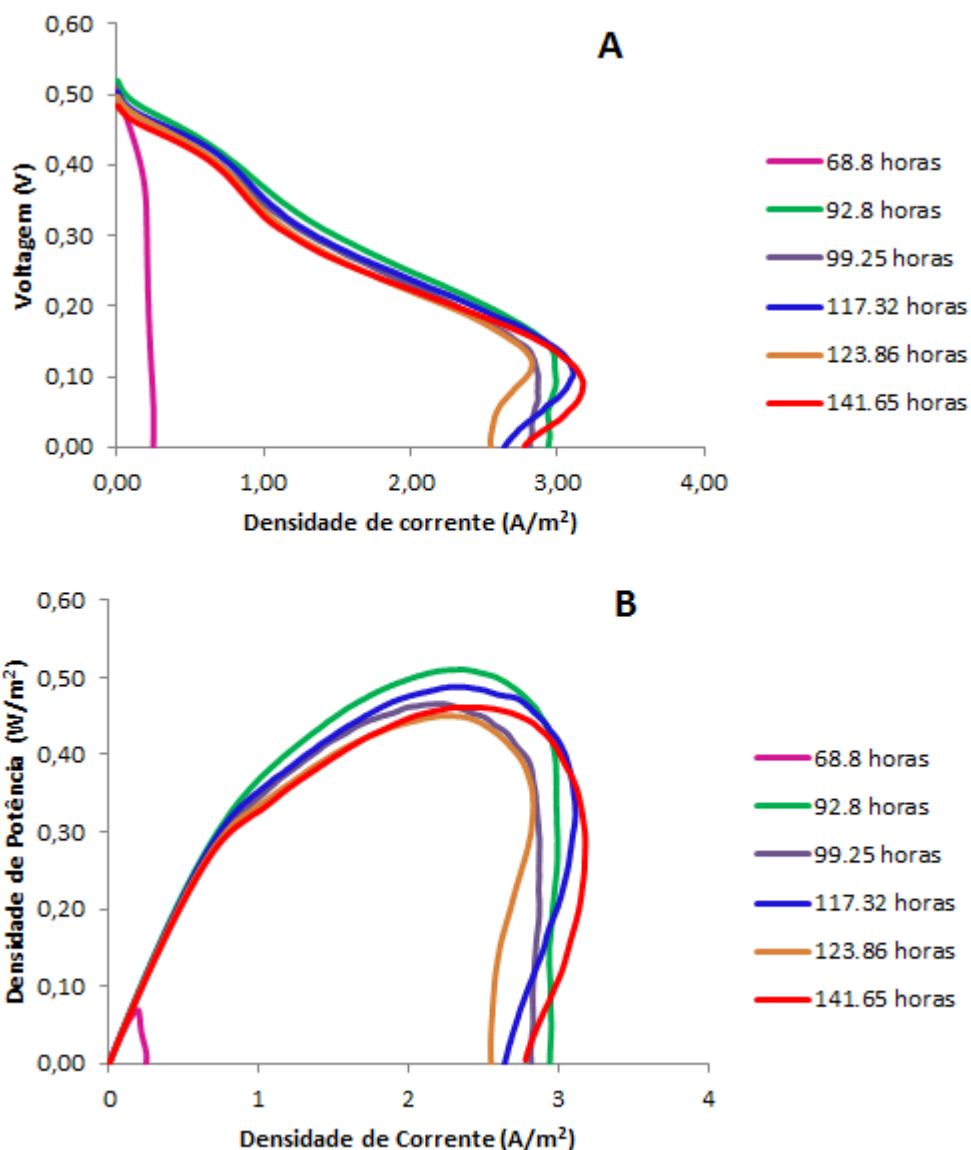
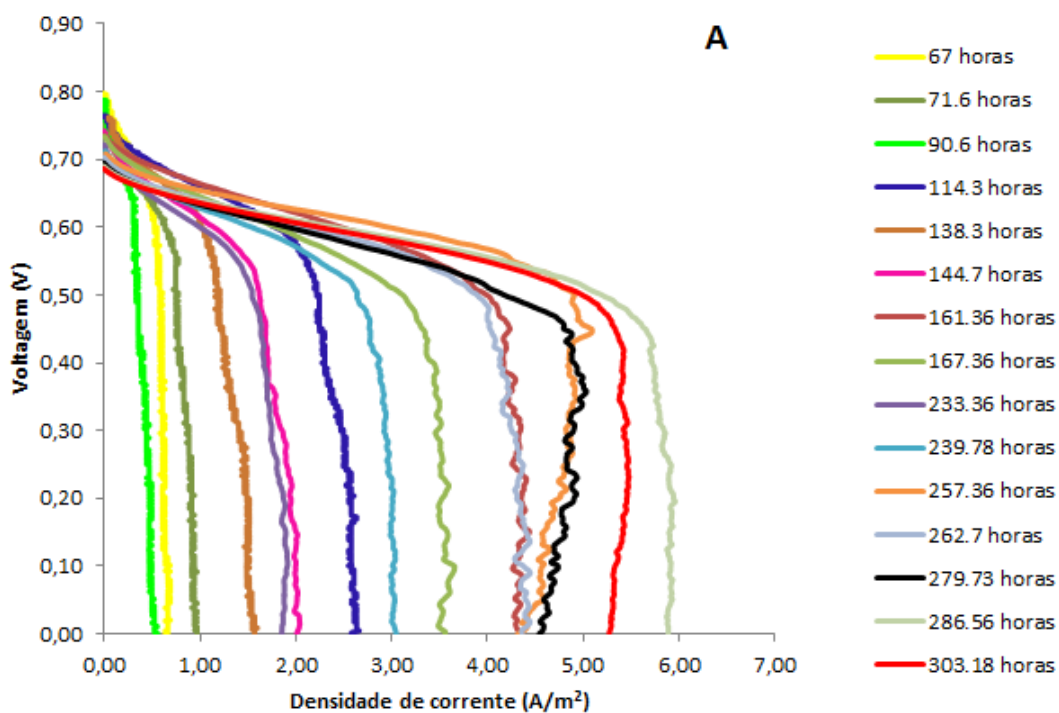


Figura 20. A) Curva de polarização nas respectivas horas de operação e B) curva de potência nas respectivas horas de operação. Ambas as curvas se referem a célula constituída por cátodo de O₂ e área de ânodo de $1,82 \times 10^{-4} \text{ m}^2$.

As demais células construídas tiveram a área do ânodo reduzida até que a redução do tamanho do ânodo não implicasse em um aumento de potência. O oxigênio no compartimento catódico foi substituído por ferricianeto, o que aumentou consideravelmente os valores de potência máxima obtidos. A célula referente à Figura 21 possui todas estas condições otimizadas e ferricianeto no compartimento catódico. A área do ânodo foi de $3,6 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ e a potência máxima obtida foi de $2,61 \text{ W/m}^2$.



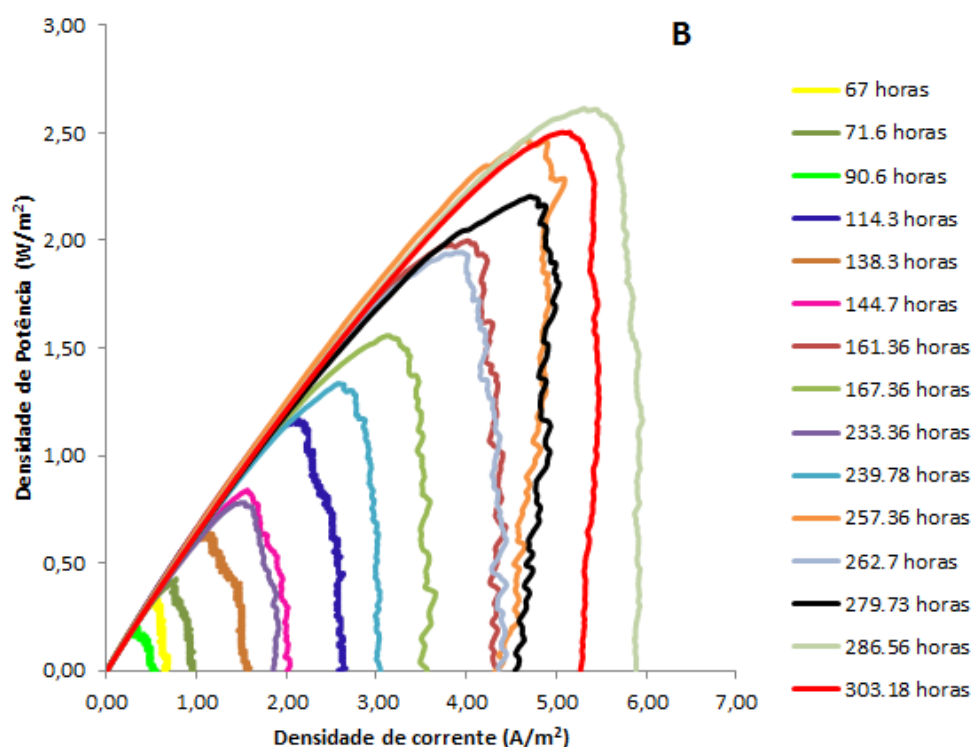


Figura 21. A) Curva polarização nas respectivas horas de operação e B) curva de potência nas respectivas horas de operação. As curvas são referentes a célula com condições otimizadas, ferricianeto no compartimento catódico e área de $3,6 \times 10^{-5} \text{ m}^2$.

A seguir é feita uma avaliação dos resultados obtidos com as células construídas.

5.1. DIFERENÇAS ENTRE CÁTODOS DE OXIGÊNIO E FERRICIANETO

5.1.1. Voltametria de Varredura Linear (LSV) – Linear Sweep Voltametry

Para comparar o desempenho entre cátodos contendo oxigênio ou ferricianeto, foram utilizadas culturas puras de *G. sulfurreducens*, devido ao menor tempo de incubação comparado a *G. metallireducens*, pelos maiores resultados de potência reportados e por possuir mais dados na literatura a respeito desta bactéria.

Após a remoção das bactérias planctônicas, os experimentos de LSV foram realizados diariamente para monitorar mudanças na produção de energia nas células ao longo do tempo. Assim que o OCP se mostrou estável, um potenciostato foi usado para varrer a voltagem do OCP a 0 V vs OCP a uma taxa constante de 1 mV/s.⁵³ As MFCs

alcançaram o pico de potência depois de aproximadamente 150 horas de operação (2 bateladas), independentemente do tipo de cátodo usado. O resultado é consistente com outros trabalhos que utilizam biofilmes de *Geobacters* e que observaram estados estacionários depois de 140 horas de operação.⁵⁵

Em células que utilizam $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ no cátodo, a substituição do meio de cultura no compartimento anódico produziu picos de energia seguidos por reduções graduais que se recuperaram rapidamente com as trocas posteriores. A potência e voltagem apresentaram um platô nas células que utilizaram oxigênio no cátodo após aproximadamente 150 horas de operação e não mostraram grandes mudanças com a substituição da solução anódica. Isto sugere que acetato foi consumido mais lentamente quando O_2 foi utilizado no compartimento catódico.

Apesar do valor teórico do potencial de redução para o oxigênio (1,23 V) sere maior do que para o ferricianeto, o potencial de circuito aberto para MFCs que utilizaram $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ no cátodo (0,36 V) foi maior do que naquelas que utilizaram O_2 no compartimento catódico. As células que utilizaram $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ apresentaram um OCP de 750 mV comparado com 500 mV para as células que utilizaram O_2 no cátodo, assim deslocando para cima o ponto de início da curva de polarização. Estes dados confirmam que a cinética de redução para o oxigênio é desfavorável em relação ao ferricianeto.

As curvas de LSV para ambos os tipos de MFC exibiram “overshoots” de potência antes de 150 horas de operação. Os “overshoots” são resultado de um rápido aumento no potencial do ânodo com a resistência ao fluxo de corrente reduzida, indicando limitações de transferência de elétrons para o ânodo⁶¹. Esta limitação está relacionada com uma resposta lenta dos microrganismos para se ajustar a nova resistência. Este fenômeno foi reportado na literatura e atribuído a uma grande variedade de fatores,⁵⁶ mas quando permitido ao biofilme amadurecer e aclimatar-se às condições da célula, este fenômeno é eliminado. Apesar de “overshoots” em potência terem sido apenas reportados em MFCs que utilizam culturas variadas, este é o primeiro caso em que este fenômeno foi observado em culturas puras de *Geobacter sulfurreducens*⁵⁶⁻⁶¹. Comumente as MFCs são mantidas em operação geralmente por semanas ou meses antes de serem realizadas medidas eletroquímicas. Observamos que após 150 horas de operação os “overshoots” de potência desaparecem (Figura 22).

Assim, é possível que neste período de “overshoots” o biofilme esteja em desenvolvimento e por isso não tenha sido reportado, pois ocorre no início do crescimento, quando em sua maioria os grupos de pesquisa não realizam medidas eletroquímicas.

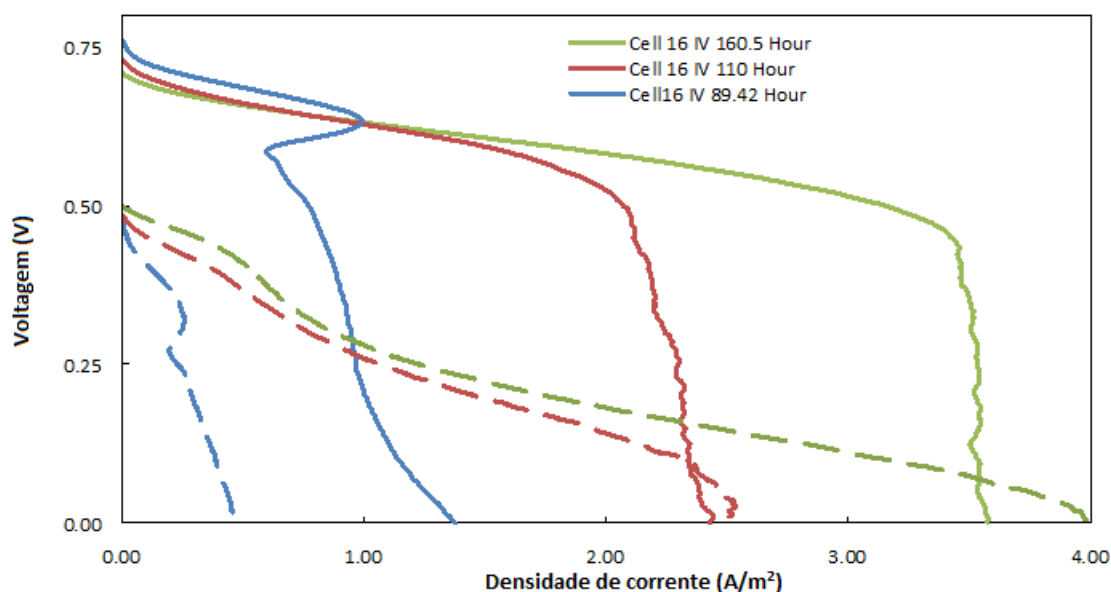


Figura 22. Curvas de polarização representativas para oxigênio no cátodo (linhas pontilhadas) e ferricianeto (linhas contínuas).

Ambas as curvas apresentadas exibem “overshoot” de potência no início do desenvolvimento que desaparece após 150 horas de crescimento. Limitações na densidade de corrente são comparáveis, mas a curva de ferricianeto aproxima-se muito mais do comportamento ideal.

Culturas puras de *Geobacter sulfurreducens* que crescem a baixas densidades de corrente (0,1 - 0,4 A/m²) expressam diferentes citocromos da membrana externa em relação àqueles cultivados em altas densidades de corrente (2,0 – 4,5 A/m²)^{25, 59, 62} de modo que é provável que o período de aclimação que observamos é relacionado a uma mudança na expressão dos citocromos da membrana externa.

Quando operadas com [Fe(CN)₆]³⁻ no compartimento catódico, as MFCs atingiram uma densidade de potência de até 2,6 W/m², comparado com 0,38 W/m² em média, quando O₂ é utilizado no cátodo. O tipo de solução catódica também altera ambos, o perfil e comportamento da curva de polarização. Apesar de algumas diferenças

serem atribuídas ao alto OCP resultante da redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, a diferença de desempenho entre as duas condições apenas aumenta com o aumento da voltagem vs. OCP. Curvas de polarização e potência representativas para MFCs são mostradas na Figura 23.

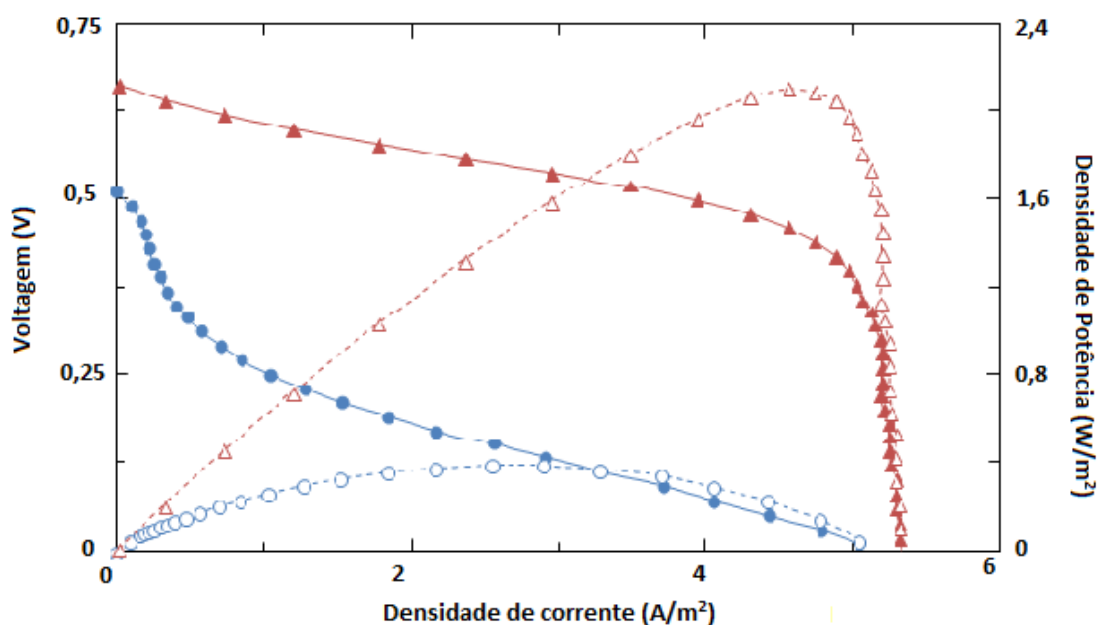


Figura 23. Os triângulos representam as MFCs que utilizam ferricianeto no compartimento anódico, enquanto células com O_2 são representadas por círculos. Curvas de polarização representativas são mostradas de forma preenchida e curvas de densidade de potência na forma aberta para MFCs utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e O_2 no compartimento catódico.

Após alcançarem o estado estacionário, as curvas de polarização das MFC podem ser divididas em três regiões: de ativação, ôhmica e de perdas por transferência de massa, conforme relatado no item 2.8.1. Os biofilmes formados nas células com oxigênio no cátodo mostraram uma queda abrupta na voltagem da região ôhmica, seguido por um longo período de queda gradual de tensão na zona de transferência de massa. Este comportamento produz uma curva parabólica que é típica de O_2 no cátodo conforme citado na literatura.⁴²⁻⁶⁵ Reciprocamente, biofilmes com cátodo usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ exibem perdas ôhmicas menores até chegar a um limite na densidade de corrente no qual aumentar a voltagem em relação ao OPC não produz nenhum aumento

na corrente. A menor diferença na curva de polarização ocorre no potencial do circuito aberto e na densidade de corrente final.

5.2. COMPARAÇÃO ENTRE MFCs USANDO *G. metallireducens*, *G. sulfurreducens* E UMA COCULTURA DAS DUAS ESPÉCIES

A bactéria *G. metallireducens*, comumente encontrada em sedimentos aquáticos, possui altas propriedades biorremediadoras, sendo capaz de oxidar até mesmo compostos aromáticos.^{3,44} Porém pouco foi estudado sobre sua capacidade de gerar energia em MFCs. A potência máxima reportada para células utilizando esse tipo de bactéria com oxigênio no cátodo foi na ordem de 26 – 200 mW/m²,⁴⁴⁻⁶⁹ bastante inferior ao obtido para *G. sulfurreducens*.⁷⁰

Para avaliar o desempenho de MFCs utilizando *G. metallireducens* e verificar a possibilidade de utilizar as suas propriedades biorremediadoras combinadas com a produção de energia elétrica, foram construídas MFCs utilizando culturas puras de *G. metallireducens*, *G. sulfurreducens* e uma cocultura das duas espécies. O compartimento anódico de 3 células foi inoculado com 9 mL de *G. metallireducens*, *G. sulfurreducens* e as duas bactérias respectivamente em meio de cultura previamente descrito (Media I) utilizando 20 mM de acetato de sódio como doador de elétrons e 40 mM de citrato de Fe(III) como acceptor de elétrons. Após a solução no compartimento anódico apresentar turbidez, esta foi substituída pelo mesmo meio de cultura, porém isento de citrato de Fe(III), obrigando as bactérias a utilizar o eletrodo como acceptor de elétrons final. Esta solução foi substituída a cada 3 - 4 dias para garantir o fornecimento da fonte de carbono (acetato) para as bactérias. Já a solução catódica, contendo 50 mM de ferricianeto, foi substituída quando a voltagem atingisse valores inferiores a 0,3 V (potencial de redução do ferricianeto = 0,361 V).

A célula inoculada com *G. sulfurreducens* apresentou uma potência máxima de 2,21 W/m² quando estava em operação por 153 horas. A espessura de biofilme após 314 horas de operação foi de 62,1 µm medida no eixo xz (Figura 24A).

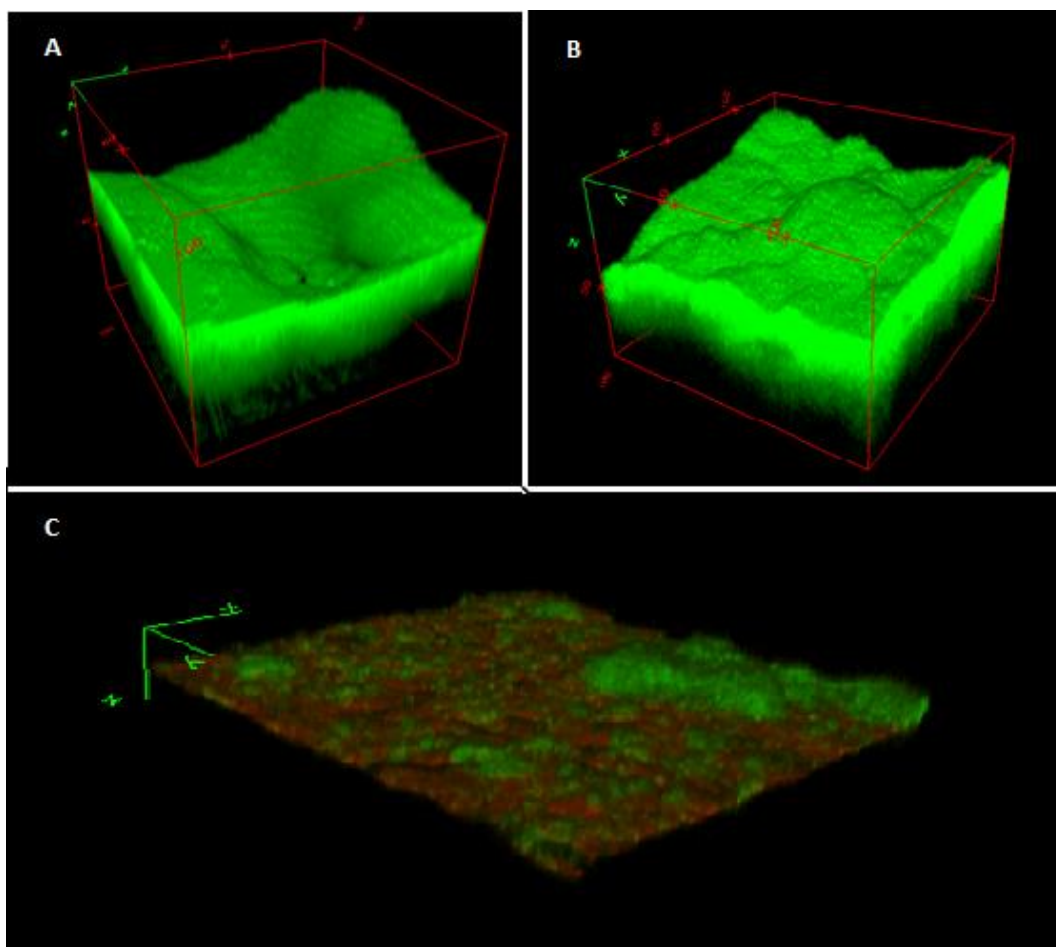


Figura 24. Imagens dos biofilmes obtidas por microscópio confocal de varredura a laser. (A) Biofilme de *G. sulfurreducens* de espessura de 62,1 μm . (B) Biofilme de *G. metallireducens* de espessura de 80 μm . (C) Cocultura analisada por FISH, em vermelho *G. sulfurreducens* e em verde *G. metallireducens*.

O valor de potência atingido foi superior ao citado na literatura para células que utilizam O_2 no compartimento catódico, mas corresponde a potência média obtida nos experimentos realizados no grupo de pesquisa com as condições da célula otimizadas (redução das limitações catódicas atingidas com a diminuição do tamanho do ânodo e utilização de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ no compartimento catódico).

A célula cultivada com *G. metallireducens* demorou mais tempo para alcançar o estado estacionário, o que se pode concluir pela presença de “overshoots” nas curvas de polarização (Figura 25). Como consequência, o pico de potência foi atingido após 240 horas de operação, quando a célula apresentou potência de $3,61 \text{ W/m}^2$.

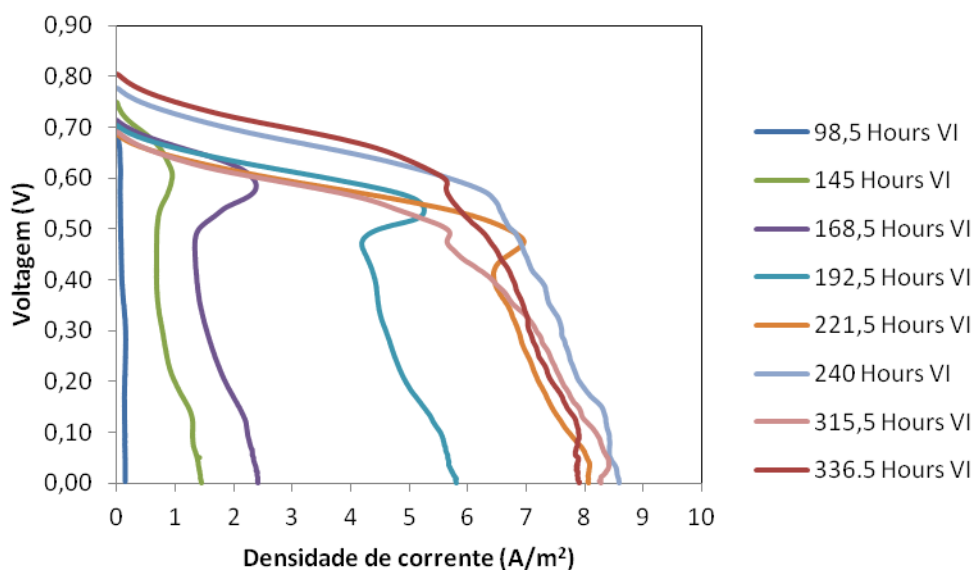


Figura 25. Curvas de polarização para MFC utilizando culturas puras de *G. metallireducens*. Efeito de “overshoot” diminui após 240 horas de operação.

A Figura 26 apresenta uma comparação entre a potência atingida nas células construídas com as culturas puras das duas espécies.

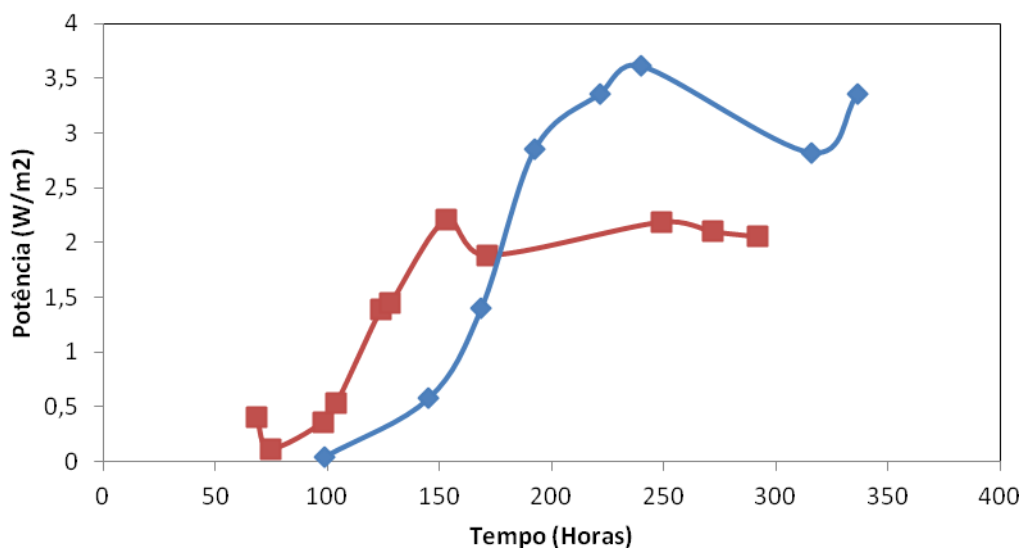


Figura 26. Gráfico de densidade de potência atingido e MFC para uma cultura pura de *G. metallireducens* em azul e *G. sulfurreducens* em vermelho.

O biofilme presente no ânodo foi fixado após 336 horas de operação apresentando uma espessura de 80 μm (Figura 24B). O experimento demonstrou que *G. metallireducens* além de poder ser utilizada para biorremediação apresenta uma potência elevada, podendo ser usada também em células de combustível microbianas para a produção de eletricidade.

A célula inoculada com as duas espécies apresentou biofilme com espessura de apenas 8 μm (Figura 24C) e potência máxima de 0,016 W/m^2 (Figura 27), muito baixa se comparada às células inoculadas com culturas puras.

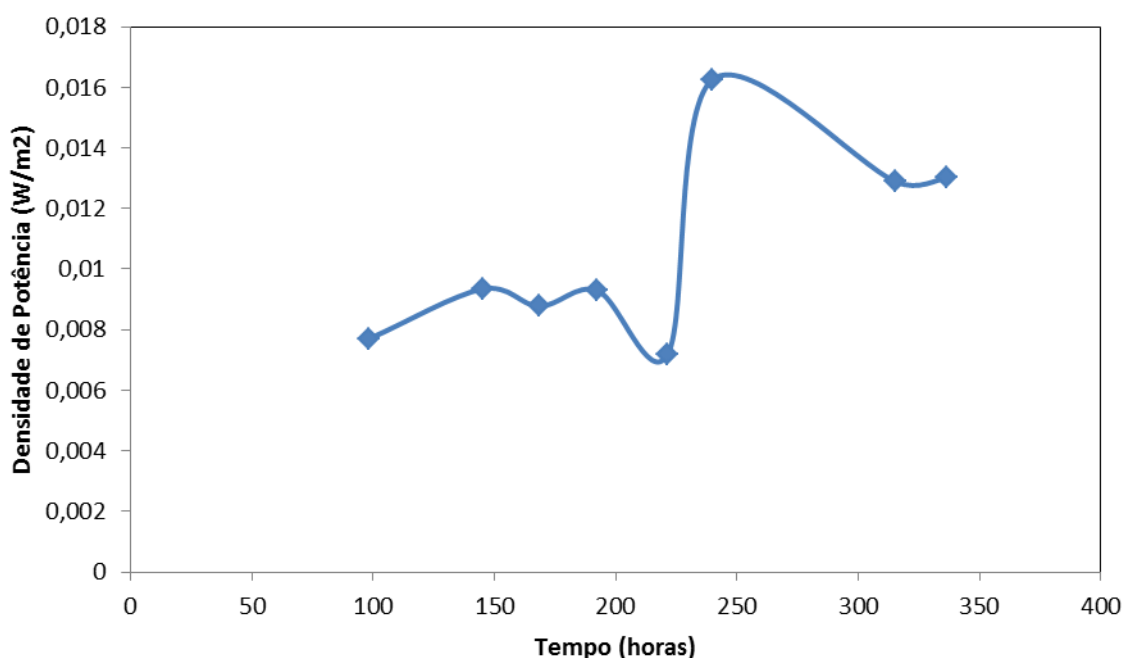


Figura 27. Gráfico de potência para uma MFC utilizando uma cocultura de *G. metallireducens* e *G. sulfurreducens*

Conforme podemos observar na Figura 24C, a espécie *G. sulfurreducens*, em vermelho, localiza-se na superfície do eletrodo de maneira uniforme e a *G. metallireducens*, de coloração verde, sobre a primeira, porém não sobre toda a superfície. O experimento sugere que quando uma cocultura é formada, ocorre a transferência direta de elétrons entre as duas espécies conforme relatado por *Summers et al*⁷¹ o que impede a transferência de elétrons para o eletrodo e consequentemente a formação do

biofilme. Além disso, pode-se perceber uma relação direta entre a espessura do biofilme e a potência produzida nas três células.

5.2.1 Medida da densidade de pilis

Com o intuito de identificar a origem das diferenças de potência apresentadas entre os 3 sistemas cultivados, foi feita a medida da densidade de pilis contidos em uma amostra pré cultivada de *G. sulfurreducens*, *G. metallireducens* e uma cocultura das duas espécies. O resultado foi expresso em densidade óptica.

Para a extração dos pilis foi utilizado o método descrito por Helaine ET AL.⁷⁴ As 3 amostras foram concentradas por centrifugação a 6000 rpm por 5 min em um tubo de polipropileno. O meio de cultura foi removido (sobrenadante). Em seguida a amostra foi ressuspensa em uma solução de 50 mM de Tris (pH 8,0) e 150 mM de NaCl, a qual foi centrifugada novamente (6000 rpm por 5min) e o sobrenadante descartado. Esse passo foi repetido mais uma vez. A amostra foi ressuspensa em 10 mL de uma solução 150 mM de etanolamina a pH 10,5, a qual remove os pilis (proteínas) das células. Agitada em pulsos de 30 s por um total de 2 min. Centrifugado novamente por 20 min a 50000 rpm na centrífuga de alta velocidade utilizando tubos específicos para a mesma. O sobrenadante (solução de interesse) foi cuidadosamente removido e filtrado com um filtro Millipore®. A análise seguiu com a precipitação dos pilis, através da adição de uma solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gota a gota até uma diluição final de 1:9 no sobrenadante. A solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi ressuspensa em 1 mL de 50 mM Tris a pH 8,0 e em seguida filtrado em um filtro para peso molecular inferior a 10000 Da. Foi adicionado 3 mL de 50 mM solução Tris a pH 8,0, centrifugado a 4500 rpm por 10 min e medida a densidade óptica do sobrenadante.

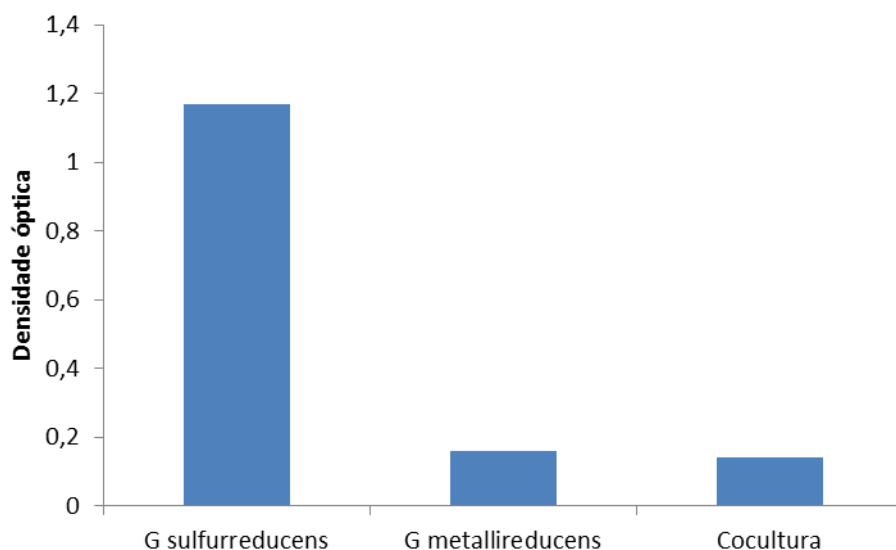


Figura 28: Medida da densidade óptica dos pilis das espécies Geobacter

Os valores obtidos não foram coerentes com as densidades de potência produzidas pelas MFCs. Visto que o biofilme mais espesso foi obtido com as *G. metallireducens*, era esperado que este apresentasse a maior densidade de pilis, porém foi constatado que a amostra de *G. sulfurreducens* se diferenciou em relação as demais. O método apresenta erros implícitos no processo e o resultado obtido é apenas um resultado aproximado, mas esperava-se que estes fossem coerentes com a espessura e potência obtidas no experimento com as MFCs.

5.3. TESTES PARA A UTILIZAÇÃO DE OUTRAS FONTES DE CARBONO

A produção de biodiesel gera glicerol como subproduto que é utilizado na indústria farmacêutica, produção de sabão e cosméticos, porém com o crescimento da produção de biodiesel, o glicerol não tem sido absorvido pela indústria e grande parte acaba se tornando resíduo.

Devido à capacidade das *G. metallireducens* em oxidar uma grande quantidade de compostos⁷² foi testada a possibilidade do uso de glicerol como fonte de carbono para esta espécie, uma alternativa para a utilização do resíduo gerado pela produção de biodiesel. Este teste também foi feito para *G. sulfurreducens*, que, segundo a literatura⁷² tem capacidade de oxidar apenas acetato e H₂.

Primeiramente foram preparados 4 frascos de 80 mL cada com meio de cultura específico (Media I) abstraindo-se o doador de elétrons acetato. Citrato de Fe(III) foi utilizado como aceptor de elétrons. O material usado bem como o meio de cultura, foram previamente autoclavados. Glicerol foi utilizado como fonte de carbono, porém teve que ser adicionado ao meio de cultura após o processo de esterilização em autoclave por sofrer decomposição ao calor. 5, 10, 20 e 30 mM de glicerol foram injetados respectivamente a cada frasco a partir de uma solução mãe de glicerol 50% que foi injetada ao meio de cultura através de um filtro estéril de 20 μ m de espessura para eliminar qualquer possibilidade de contaminação. A cada frasco foi adicionado 8 mL *G. metallireducens* previamente cultivadas. Dois frascos de controle também foram preparados, um utilizando 20 mM de acetato como fonte de carbono e outro sem doador de elétrons. Em ambos os frascos foram adicionados 8 mL de bactérias. Todo o procedimento foi realizado dentro de uma câmara anaeróbica. O mesmo experimento foi repetido para *G. sulfurreducens*.

O meio de cultura inicialmente de cor marrom escuro, torna-se turvo, mudando inicialmente para amarelo claro e em seguida tornando-se esbranquiçado quando há crescimento de bactérias. Na Figura 29 e Figura 30 pode-se verificar o crescimento de *G. metallireducens* no controle contendo acetato, como esperado, além de crescimento da bactéria no meio contendo 20 mM de glicerol, depois de 7 dias de inoculação.



Figura 29. *G. metallireducens* inoculada no controle, sem fonte de carbono, em 20 mM de glicerol e no controle com acetato (esquerda para direita).



Figura 30. *G. metallireducens* inoculada no controle sem glicerol, 5, 10, 20 e 30 mM de glicerol (esquerda para direita). Pode-se ver o crescimento de bactérias apenas no frasco contendo 20 mM de glicerol

Os frascos inoculados com *G. sulfurreducens*, não apresentaram nenhuma mudança na coloração, ou seja, não houve crescimento da bactéria quando inoculada com glicerol.

Um novo experimento foi realizado para *G. metallireducens* com o intuito de testar o desenvolvimento da bactéria em diferentes concentrações. Foi utilizando 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 mM de glicerol e os resultados obtidos podem ser verificados na Figura 31.



Figura 31. *G. metallireducens* inoculado no controle com acetato, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 e 28 mM de glicerol e controle sem fonte de carbono (esquerda para direita).

A bactéria se desenvolveu em todas as concentrações de glicerol testadas. Para avaliar a melhor concentração, foi medida a densidade óptica das amostras após 7 dias

de inoculação (Figura 32).

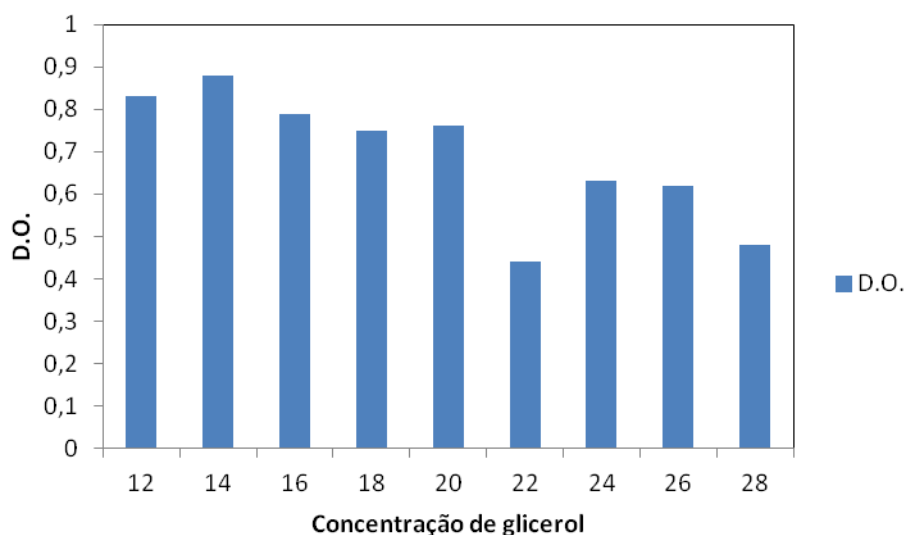


Figura 32. Densidade óptica (D.O.) das amostras nas respectivas concentrações. 14 mM demonstrou ser a concentração mais apropriada para o crescimento das bactérias em glicerol.

Apesar dos resultados serem similares, a concentração na qual houve um melhor desenvolvimento bacteriano foi de 14 mM de glicerol, o que pode ser concluído a partir dos resultados de densidade óptica obtidos.

Para a avaliação da densidade óptica foi utilizado o equipamento “WPA Biowave OP 800” que é utilizado para dar uma indicação de células bacterianas através da medição da densidade óptica de uma suspensão de células a 600 nm. É importante destacar que para as amostras turvas, tais como culturas de células, a absorvância medida é devido à dispersão da luz e não devido a absorção molecular. A leitura é afetada pela ótica do sistema (a distância focal, a geometria da fenda de saída do instrumento e o monocromador óptico). Diferentes tipos de espectrofotometria darão diferentes leituras para a mesma amostra turva. Para que as leituras utilizando o equipamento “Biowave” possam ser comparáveis a um espectrofotômetro tradicional, um factor de correção está incluído no software Biowave II. Os resultados obtidos foram cerca da metade do instrumento tradicional, sugerindo que um fator de correção de 2,0 seria apropriado neste caso. Por esta razão, esse é o valor padrão programado,

porém pode ser modificado a partir de alterações realizadas nas configurações do equipamento.

6. CONCLUSÕES

As medidas experimentais que compararam os dois tipos de cátodo demonstraram que as limitações catódicas são removidas quando o cátodo de oxigênio é substituído pelo que contém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Isto tem implicações importantes para futuras melhorias no desempenho das MFCs.

A comparação entre culturas demonstrou que *G. metallireducens* além de poder ser utilizada para biorremediação apresenta uma potência elevada, podendo ser usada também como cultura pura em células de combustível microbianas, para a produção de eletricidade.

A cocultura estudada demonstrou que ocorre a transferência direta de elétrons entre as duas espécies de *Geobacter*, o que impede a transferência de elétrons para o eletrodo e conseqüentemente a formação do biofilme. Isso pode ser afirmado tendo como base os resultados publicados por Summer et al.⁷¹ Além disso, pode-se perceber uma relação direta entre a espessura do biofilme e a potência produzida nas três células, porém essa relação não é consistente quando a densidade de pilis é avaliada.

A espécie *G. metallireducens* demonstrou ainda ser útil na utilização de glicerol como fonte de carbono, podendo servir como espécie remediadora para este resíduo.

7. SUJESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros sugere-se a construção de uma célula de combustível microbiana utilizando-se glicerol como substrato e a avaliação da potência produzida.

Sugere-se também a avaliação dos metabólitos produzidos na degradação do glicerol em uma cultura de *G. metallireducens*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franks, A.; Nevin, K.; *Energies* **2010**, 3, 899-919
2. Davis F.; Higson SP.; *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 7,1224-35.
3. Meckenstock, R.; *FEMS Microbiology Letters.* **1999**, 177, 67-73.
4. Dantas, P.V.; Peres, S.; Campos-Takaki, G.M.; La Rotta, C.E.; *Journal of the Electrochemical Society* **2013**, 160, (10) G142-G148.
5. Rachinski, S.; Carubelli, A.; Mangoni, A.P.; Mangrich, A.S.; *Química Nova* **2010**, 33 (8) 1773-1778.
6. Gomes, A.S.O.; La Rotta, C.E.; Nitschke, M.; Gonzalez, E.R.; *Polymer Electrolyte Fuel Cells*, **2011**, 11. 41 (1) 2011-2017.
7. Potter, M. C.; *Proc. R. Soc. London* **1911**, 84, 260.
8. Cohen, B.; *J. Bacteriol.* **1931**, 21, 18.
9. Canfield, J. H.; Goldner, B. H.; Lutwack, R.; NASA Technical report, Magna Corporation, Anaheim, CA, **1963**, p. 63
10. Cohn, E. M.; *Dev. Ind. Microbiol.*, **1963**, 4, 53.
11. Lewis, K.; *Bacteriol. Rev.* **1966**, 30, 101.
12. Schröder U.; *Phys Chem Chem Phys* **2007** 9, 2619-29.
13. Bennetto H.P.; *National Centre for Biotechnology Education.* **1990**.

14. Madiga, M.T.; Martink, J. M.; Parker, J.; Brock Biology of Microorganisms, *Prentice Hall International, Inc.*, Upper Saddle River, NJ, 8th ed, (1999).
15. Roller, S. D.; Bennetto, H. P.; Delaney, G. M.; Mason, J. R.; Stirling, J. L.; Thurston, C. F.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1984**,34 B, 3.B.
16. Park, D. H.; Zeikus, J. G.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **2000**, 66, 1292.
17. Lovley, D.; *Annu. Rev. Microbiol.* **2012**, 66, 391–409.
18. Lovley, D.; *Nature Reviews* **2006**, 4, 497-508.
19. Inoue, K.; Leang, C.; Franks, A.E.; Woodard, T.L.; Nevin, K.P.; Lovley, D.R.; *Environ. Microbiol. Rep.* **2011**, 3, 211–17.
20. Magnuson, T.S.; Isoyama, N.; Hodges-Myerson, A.L.; Davidson, G.; Maroney, M.J.; *Biochem. J.* **2001**, 359, 147–52.
21. Qian, X.; Reguera, G.; Mester, T.; Lovley, D.R.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, 277, 21–27.
22. Leang, C.; Coppi, M.V.; Lovley, D.R.; *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 2096–103
23. Busalmen, J.P.; Esteve-Nunez, A.; Berna, A.; Feliu, J.M.; *Agnew. Chem. Int.* **2008**, 47, 4874–77
24. Busalmen, J.P.; Esteve-Nunez, A.; Berna, A.; Feliu, J.M.; *Bioelectrochemistry* **2010**, 78, 25–29.
25. Holmes, D. E.; Chaudhuri, S. K.; Nevin, K. P.; Mehta, T.; Methe, B. A.; Liu, A.; Ward, J. E.; Woodard, T. L.; Webster, J.; Lovley, D. R., *Environmental Microbiology* **2006**, 8, (10), 1805-1815.

26. Nevin, K.P.; Kim, B.C.; Glaven, R.H.; Johnson, J.P.; Woodard, T.L.; *PLoS One* **2009**, *4*, 5628.
27. Qian, X.; Mester, T.; Morgado, L.; Arakawa, T.; Sharma, M.L.; Inoue, K.; Joseph, C.; Salgueiro, C.A.; Maroney, M.J.; Lovley, D.R.; *Acta*, **2011**, 1807,404–412.
28. Rollefson, J.B.; Stephen, C.S.; Tien, M.; Bond, D.R.; *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 1023–33.
29. Richter, H.; Nevin, K.P.; Jia, H.; Lowy, D.A.; Lovley, D.R.; Tender, L.M.; *Energ. Environ. Sci.*, **2009**, *2*, 506–16.
30. Reguera, G.; Nevin, K.P.; Nicoll, J.S.; Covalla, S.F.; Woodard, T.L.; Lovley, D.R.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7345–48
31. Malvankar, N.S.; Vargas, M.; Nevin, K.P.; Franks, A.E.; Leang, C.; *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 573–79
32. Franks, A.E.; Nevin, K.P.; Glaven, R.H.; Lovley, D.R.; *ISME J.* **2010**, *4*:509–19.
33. Reguera, G.; *Nature* **2005**, *435*, 1098–1101.
34. Childers, S.E.; Ciuffo, S.; Lovley, D.R.; *Nature* **2002**, *416*, 767–69.
35. Tremblay, P.; Aklujkar, M.; Leang, C.; Nevin, P.; Lovley, D.R.; *Environmental microbiology reports* **2012**, *4*(1), 82-88
36. Bond, D.R.; Lovley, D.R.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69* (3) 1548-1555.
37. Leang, C.; Malvankar, N.; Franks, A.E.; Nevin, K.P.; *Energy Environ. Sci.*, **2013**, *6*, 1901–1908.

38. Nevin, K. P.; Richter, H.; Covalla, S. F.; Johnson, J. P.; Woodard, T. L.; Orloff, A. L.; Jia, H.; Zhang, M.; Lovley, D. R.; *Environmental Microbiology* **2008**, 10(10), 2505–2514.
39. Yi, H.; Nevin, K.P.; Kim, B.C.; Franks, A.E.; Klimes, A.; Tender, L.M.; Lovley, D.R.; *Biosens. Bioelecron.* **2009**, 24(12) 3498-3503.
40. Mink, J.E.; Hussain, M.M.; *ACS Nano.* **2013**, 7 (8) 6921-6927.
- 41 Liu, H.; Logan, B.E.; *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 4040-4046.
42. Logan, B.; Cheng, S.; Watson, V.; Estadt, G.; *Environ Sci Technol*, **2007**, 41, (9), 3341-3346.
43. Cheng, S.; Liu, H.; Logan, B. E.; *Environ Sci Technol*, **2006**, 40, (7), 2426-2432.
44. Min, B.; Cheng, S.; Logan, B.; *Water Research* **2005**, 39, 1675–1686.
45. Gregoire K.P.; Becker J.G.; *Bioresource Technology* **2012**, 119, 208–215.
46. Lovley, D.R.; Baedeker, M.J.; Lonergan, D.J.; Philips, E.J.; Siegel, D.I.; *Nature* **1989**, 339, 297-300.
47. Cheng, S. A.; Wu, J. C.; *Bioelectrochemistry*, **2013**, 92, 22-26.
48. Cheng, S.; Liu, H.; Logan, B. E.; *Environ Sci Technol* **2006**, 40, (1), 364-369 (2006).
49. Kim, J. R.; Kim, J.-Y.; Han, S.-B.; Park, K.-W.; Saratale, G. D.; Oh, S.-E., *Bioresource Technol*, **2011**, 102, (1), 342-347.

50. Xiang, L.; Boxun, H.; Suib, S.; Yu, L.; Baikun, L.; *Journal of Power Sources* **2010**, 195, (9), 2586-91.
51. Rabaey, K.; Read, S. T.; Clauwaert, P.; Freguia, S.; Bond, P. L.; Blackall, L. L.; Keller, J.; *Isme Journal*, **2008**, 2, (5), 519-527.
52. Logan, B. E.; Shaoan, C.; *Electrochem Commun*, **2007**, 9, (3), 492-6.
51. Ghangrekar, M. M.; Shinde, V. B.; *Bioresource Technol* **2007**, 98, (15), 2879-2885.
52. Oh, S.; Min, B.; Logan, B. E.; *Environ Sci Technol*, **2004**, 38, (18), 4900-4904.
53. Logan, B. E.; Hamelers, B.; Rozendal, R. A.; Schrorder, U.; Keller, J.; Freguia, S.; Aelterman, P.; Verstraete, W.; Rabaey, K.; *Environ Sci Technol*, **2006**, 40, (17), 5181-5192.
54. Rismani-Yazdi, H.; Carver, S. M.; Christy, A. D.; Tuovinen, I. H.; *Journal of Power Sources*, **2008**, 180, (2), 683-694.
55. Liu, Y.; Kim, H.; Franklin, R. R.; Bond, D. R.; *Chemphyschem*, **2011**, 12, (12), 2235-2241.
56. Watson, J.V.; Logan, E.B.; *Electrochemistry communications*, **2011**, 13, 54-56.
57. Nien, P.-C.; Lee, C.-Y.; Ho, K.-C.; Adav, S. S.; Liu, L.; Wang, A.; Ren, N.; Lee, D.-J.; *Bioresource Technol*, **2011**, 102, (7), 4742-4746.
58. Ieropoulos, I.; Winfield, J.; Greenman, J.; *Bioresource Technol* **2010**, 101, (10), 3520-3525.
59. Hong, Y.; Call, D. F.; Werner, C. M.; Logan, B. E., *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 28, (1), 71-76.

60. Aelterman, P.; Rabaey, K.; Pham, H. T.; Boon, N.; Verstraete, W.; *Environ Sci Technol* **2006**, 40, (10), 3388-3394.
61. Winfield, J.; Ieropoulos, I.; Greenman, J.; Dennis, J.; *Bioelectrochemistry*, **2011**, 81, (1), 22-27.
62. Nevin, K. P.; Kim, B.-C.; Glaven, R. H.; Johnson, J. P.; Woodard, T. L.; Methe, B. A.; DiDonato, R. J. Jr.; Covalla, S. F.; Franks, A. E.; Liu, A.; Lovley, D. R.; *Plos One*, **2009**, 4, (5).
63. Shijie, Y.; Qingliang, Z.; Jinna, Z.; Junqiu, J.; Chunli, W.; Maoan, D.; Shiqi, Z.; *Journal of Power Sources*, **2007**, 173, (1), 172-7.
64. Feng, Y.; Wang, X.; Logan, B. E.; Lee, H., *Appl Microbiol Biot* **2008**, 78, (5), 873-880.
65. Yujie, F.; Qiao, Y.; Xin, W.; Logan, B. E.; *Journal of Power Sources*, **2010**, 195, (7), 1841-4.
66. Butler, J.; Lovley, D.; *BMC Genomics* **2007**, 8, 108.
67. Liu, H.; Ramnarayananr, R.; Logan, B.E.; *Environ. Sci. Technol.*, **2004**, 38, 2281-2285.
68. Gregoire, K.P.; Becker, J.G.; *Bioresource Technology* **2012**, 119, 208–215.
69. Zhang, T.; Gannon, S.M.; Nevin K. P.; Franks A. E.; Lovley, D. ; *Environmental Microbiology*, **2010**, 12 (4), 1011–1020.
70. Pant D.; Bogaert G.V.; Diels L.; Vanbroekhoven, K.; *Bioresource Technology*, **2009**.

71. Summers, Z.; Fogarty, H.E.; Leang, C.; Franks, A.E.; Malvankar, N.S.; Lovley, D.; *Science*, **2010**, 330, 1413-1415.

72. Lovley, D. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 59, p.2-64, 2011.

73. Neves, S.M.N.; Guedes, R.M.C.; *Arq. Inst. Biol.* **2012**, 79 (4), 627-632.

74. Helaine, S.; Carbonnelle, E.; Prouvensier, L.; Bereti, J.; Nassif, X.; Pelicic, V.; *Molecular Microbiology*. **2005**, 55 (1), 65-71.