Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Utilização dos subprodutos da produção fermentativa de
hidrogênio para a geração de energia em uma célula
microbiana a combustível”**

Vinícius Fabiano dos Passos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Utilização dos subprodutos da produção fermentativa de
hidrogênio para a geração de energia em uma célula
microbiana a combustível”**

Vinícius Fabiano dos Passos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**.

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Reginatto Spiller

VERSÃO CORRIGIDA

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Passos, Vinícius Fabiano

Utilização dos subprodutos da produção fermentativa de hidrogênio para a geração de energia em uma célula microbiana a combustível. Ribeirão Preto, 2018.

113 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientadora: Reginatto, Valeria

1. *Clostridium* 2. Ácidos orgânicos 3. Energia elétrica 4. Bioenergia

FOLHA DE APROVAÇÃO

PASSOS, Vinícius Fabiano

Título: Utilização dos subprodutos da produção fermentativa de hidrogênio para a geração de energia em uma célula microbiana a combustível

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Reginatto Spiller

Aprovado em ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação ...

*Aos meus avós Dirce, João e Maria,
por todo amor e cuidado em todos momentos de minha vida*

“Avós são amor que nunca envelhece e sabedoria que nunca acaba”

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer todas as pessoas que, talvez acreditassem mais em mim do que eu mesmo. Foi uma caminhada longa, às vezes difícil, mas que me fez crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente. À Deus por sempre ter me dado força e guiado meus passos.

Quero agradecer àqueles que me deram e dão amor, educação e exemplo. Aos meus pais Emílio e Daniela, minha madrastra Elisângela, meus avós Dirce, Maria, João e ao José, muito obrigado pelo apoio incondicional, pela estrutura e por me darem conselhos e conforto. O pouco que consegui foi graças ao amor e dedicação que sempre tiveram comigo. Aos meus irmãos, Gabriel, Victor Hugo e Maria Eduarda agradeço por tê-los em minha vida e tudo que faço é pensando em sempre ser exemplo para vocês.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Valeria Reginatto Spiller, por toda orientação e envolvimento com este trabalho. Muito obrigado por ter aberto as portas de seu laboratório quando decidi procurá-la para começar um estágio, lá em 2013. Foram alguns anos de convívio, os quais ficarão gravados através de seus ensinamentos. Agradeço pelo exemplo de pessoa que é, que me inspirou e ainda vai me inspirar a sempre agir da melhor forma possível.

Tenho algumas famílias de consideração, mas em especial, tenho duas que as considero como minhas, as famílias Landim e Landini. Tio Landim e Tia Ana assim como Tio Hamilton e Tia Rita, muito obrigado por sempre me apoiarem desde que os conheci e os adotei como verdadeiros pais, assim como todos outros tios que tenho o privilégio de conviver. São exemplos de pessoas que carrego sempre em minha mente.

Agradeço a todos meus amigos que fazem com que nossa caminhada seja mais alegre e que, em momentos difíceis, nos dão força e fazem com que a gente continue em frente. Não citarei nomes para não esquecer de ninguém, mas meu muito obrigado a todos vocês!

Agradeço aos meus amigos de laboratório Bruno, Carolina, Gabriela, Jonatã, Larissa, Lucas, Lucca, Rafaella, Thalita e Thamiris os quais direta ou indiretamente contribuíram muito com este trabalho, tanto na colaboração quanto nos momentos de diversão. Em especial, quero agradecer a Bruna pela contribuição, amizade e companhia no laboratório durante todo esse período. Você é uma pessoa que está pronta para o que

vier e sua perseverança, empenho e alegria me faz admirá-la. Também quero agradecer à Bianca pela amizade e pelo período que passamos juntos. Sua determinação e amor pelo que faz a torna exemplo para todos.

Agradeço ao grupo de Eletrocatalise e Eletroquímica Ambiental do Departamento de Química da FFCLRP/USP, e em especial à Profa. Adalgisa Rodrigues de Andrade pela contribuição neste trabalho, tanto por ter disponibilizado seu laboratório para a realização de parte deste trabalho, bem como por todo respaldo e experiência na parte eletroquímica.

Agradeço aos técnicos do Departamento de Química da FFCLRP/USP André, Janaína, Mércia e Rodrigo pelo auxílio e/ou ajuda com equipamentos para a realização de experimentos.

Agradeço ao Prof. Fabrício Butierres Santana da FURG/RS pelo envio do lodo, material utilizado neste trabalho.

Agradeço ao laboratório do Prof. Bruno Spinosa De Martinis do Departamento de Química da FFCLRP/USP pela disponibilidade e auxílio no cromatógrafo a gás.

Agradeço ao Prof. Fernando Dini Andreote do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP pelo estágio concedido em seu laboratório, assim como ao seu grupo de pesquisa pelo auxílio e aprendizado na área de biologia molecular.

Agradeço ao programa de pós-graduação do Departamento de Química da FFCLRP/USP pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho, assim como sua secretária, Lâmia, por todo trabalho prestado durante o período.

Finalmente, gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida no período. Enfim, a todos que, embora não citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

***“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas
dificuldades que superou no caminho”***

(Abraham Lincoln)

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIACÕES	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O hidrogênio como combustível.....	3
2.2. Formas de obtenção de hidrogênio	5
2.3. Produção de H ₂ por fermentação	10
2.3.1. Produção de H ₂ por <i>Clostridium</i> sp.....	10
2.4. Células a Combustível Microbianas (CCM).....	16
2.4.1. Compartimento catódico	22
2.4.2. Compartimento anódico	22
2.4.3. Aplicações de uma célula a combustível microbiana.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Microrganismos	28
4.2. Composição de meios de cultura	28
4.3. Ensaio de produção fermentativa de H ₂ em batelada.....	31
4.3.1. Determinação das variáveis cinéticas do ensaio de fermentação	33
4.4. Construção e operação da Célula a Combustível Microbiana (CCM).....	34
4.4.1. Parâmetros eletroquímicos	36

4.5. Métodos analíticos	37
4.5.1. Determinação dos sólidos voláteis e totais.....	37
4.5.2. Determinação dos ácidos orgânicos da produção fermentativa de H ₂	37
4.5.3. Análise e composição do gás da produção fermentativa de H ₂	38
4.5.4. Determinação da concentração de glicose	39
4.5.5. Quantificação da concentração celular.....	39
4.6. Análise da morfologia do biofilme formado no ânodo por microscopia	39
4.7. Quantificação da comunidade bacteriana por PCR em tempo real.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Ensaio cinéticos de fermentação de glicose pelo <i>C. beijerinckii</i> Br21	42
5.2. Ensaio cinéticos de produção de H ₂	54
5.3. Utilização dos subprodutos da fermentação da produção biológica de H ₂ para a geração de energia em uma célula a combustível microbiana	60
5.3.1. Abundância do gene 16S por qPCR.....	63
5.3.2. MEV do biofilme do ânodo.....	66
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS	72
8. ANEXOS	94
8.1. Curvas analíticas de CG.....	94
8.2. Curvas analíticas de CLAE.....	95
8.3. Correlação entre métodos de quantificação de concentração celular	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Previsão da produção de energia no mundo.....	1
Figura 2. Evolução do número de publicações da base de dados <i>Web of Science</i> TM para as palavras-chave <i>microbial fuel cell</i> e <i>microbial fuel cell + wastewater treatment</i>	3
Figura 3. Métodos de produção de hidrogênio	5
Figura 4. Via metabólica da fase acidogênica para <i>Clostridium</i>	13
Figura 5. Sistema fermentativo e bioeletroquímico para geração de energia.....	15
Figura 6. Representação esquemática de uma CCM, baseada na redução do oxigênio no compartimento catódico	17
Figura 7. Representações esquemáticas de diferentes tipos de CCMs. (a) forma H, (b) câmara única, (c) câmara dupla, (d) empilhada, (e) sedimento e (f) tubular.....	19
Figura 8. Esquema geral de uma CCM (a), com ampliação do bioânodo (b) representando; diferentes tipos de transferência de elétrons pelos microrganismos exoeletrogênicos	24
Figura 9. CCMs tubulares testadas para produção de energia usando águas residuais produzidas na cervejaria de Foster em Yatala, Austrália	25
Figura 10. Resumo experimental do trabalho.....	27
Figura 11. Aparato experimental utilizado para quantificar o H ₂ produzido.	32
Figura 12. Esquema da célula a combustível microbiana.	35
Figura 13. Curvas de crescimento celular do <i>C. beijerinckii</i> Br21 em diferentes meios de cultura.	43
Figura 14. Curvas de crescimento do <i>C. beijerinckii</i> Br21 com os respectivos ajustes sigmoidais e pH (A) e velocidades específicas de crescimento celular (μ) (B) em diferentes meios de cultura.	45
Figura 15. Concentração dos produtos em diferentes tempos da fermentação de glicose pelo <i>C. beijerinckii</i> Br21. A) meio RCM; B) meio TYA; C) meio AnS; D) meio P2 e E) meio CGM.	48

Figura 16. Crescimento celular e variação do pH durante a fermentação com o <i>C. beijerinckii</i> Br21 no meio P2, com diferentes modificações.....	51
Figura 17. Produtos da fermentação do <i>C. beijerinckii</i> Br21 nas diferentes composições do meio P2. A – controle; B – P2 mod-1; C – P2 mod-2; D – P2 mod-3	52
Figura 18. Concentração de ácidos orgânicos produzidos pela fermentação de glicose nos diferentes meios de cultura.	54
Figura 19. Curva de crescimento celular do <i>C. beijerinckii</i> Br21 (A) e variação do pH (B) em função do tempo nos ensaios fermentativos com meio P2 mod-2.	56
Figura 20. Volume de H ₂ gerado em função do tempo nos ensaios fermentativos.....	57
Figura 21. Concentração dos subprodutos solúveis dos ensaios de fermentação para a produção biológica de H ₂ em quatro experimentos distintos.	59
Figura 22. Densidade de potência em função do tempo nas CCM alimentadas com ácidos orgânicos e o efluente da fermentação para a produção de H ₂	61
Figura 23. Número de cópias do gene 16S rRNA por grama de lodo nas diferentes CCMs.	65
Figura 24. Imagens de MEV do tecido de carbono inicial (A) e (B), e após 7 dias de operação quando alimentado com a mistura sintética (C) e (D).....	67
Figura 25. Eletrodo com menor ampliação (A), ampliação ao centro do eletrodo (B), com maior quantidade de microrganismos da CCM-Mis.....	68
Figura 26. Imagem de MEV do eletrodo com o biofilme após 7 dias de operação da CCM-Mis.....	69
Figura 27. Imagem de MEV do biofilme formado na CCM-Eflu.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre propriedades do hidrogênio com outros combustíveis	4
Tabela 2. Vantagens e desvantagens de diferentes processos biológicos de produção de hidrogênio	9
Tabela 3. Rendimento de H ₂ utilizando diferentes inóculos e substratos	14
Tabela 4. Comparação de performances de CCMs de diferentes configurações em sistemas que empregam diferentes inóculos e substratos	21
Tabela 5. Composição dos meios de cultura para o crescimento de <i>Clostridium</i> sp.....	29
Tabela 6. Modificações no meio de cultura P2	30
Tabela 7. Composição do meio de cultura da CCM.....	31
Tabela 8. Parâmetros cinéticos das fermentações em diferentes meios de cultura	49
Tabela 9. Parâmetros cinéticos das fermentações em meios P2 modificado.....	53
Tabela 10. Parâmetros cinéticos dos ensaios de fermentação para a produção de H ₂ pelo <i>C. beijerinckii</i> Br21 com o meio P2 mod-2.....	58
Tabela 11. Consumo de substrato nas CCMs alimentadas com acetato, butirato, lactato, mistura sintética dos ácidos e efluente da fermentação, e suas respectivas eficiências coulômbicas	62

LISTA DE ABREVIACÕES

ADP	Adenosina Difosfato
AnS	<i>Anaerobic Sugar medium</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BES	<i>Bioelectrochemical System</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CGM	<i>Clostridial Growth Medium</i>
CICC	<i>China Center of Industrial Culture Collection</i>
CLAE (HPLC)	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
CCM (MFC)	Célula a Combustível Microbiana (<i>Microbial Fuel Cell</i>)*
CCM-HAc	Célula a Combustível Microbiana alimentada com ácido acético
CCM-HBut	Célula a Combustível Microbiana alimentada com ácido butírico
CCM-HLac	Célula a Combustível Microbiana alimentada com ácido láctico
CCM-Mis	Célula a Combustível Microbiana alimentada com mistura de ácidos
CCM-Eflu	Célula a Combustível Microbiana alimentada com efluente
CoA	Coenzima A
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DCT	Detector de Condutividade Térmica
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO₆₀₀	Densidade Ótica em 600 nm
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DSM	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</i>
EC	Eficiência Coulômbica
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
Fd	Ferredoxina
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>

*Apesar de célula microbiana a combustível ser o termo comumente utilizado, a partir daqui será empregado o termo célula a combustível microbiana, por sugestão dos avaliadores.

GOX	Glicose Oxidase
H_{máx}	Volume máximo de produção de H ₂
IEA	<i>International Energy Agency</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
MEC	<i>Microbial Electrolysis Cell</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N/A	Não Avaliado
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NFOR	NADH-Ferredoxina Oxidurreductase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEM	<i>Proton Exchange Membrane</i>
PFOR	Piruvato Ferredoxina Oxidorredutase
P_i	Fosfato inorgânico
PTFE	Politetrafluoretileno
PYG	<i>Peptone-Yeast-Glucose medium</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
RCM	<i>Reinforced Clostridial Medium</i>
RID	<i>Refractive Index Detector</i>
R_m	Velocidade máxima de produção de H ₂
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
r_x	Velocidade instantânea de crescimento celular
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TEED	Transferência Eletrônica Extracelular Direta
TYA	<i>Tryptone Yeast-extract Acetate medium</i>
μ_x	Velocidade específica de crescimento celular
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
X_{máx}	Concentração de celular máxima
Y_{x/s}	Rendimento de célula por substrato consumido
Y_{p/s}	Rendimento de produto por substrato consumido
λ	Tempo de fase lag

RESUMO

PASSOS, V. F. **Utilização dos subprodutos da produção fermentativa de hidrogênio para a geração de energia em uma célula microbiana a combustível**. 2018. 113p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O biohidrogênio, obtido a partir da fermentação de carboidratos, surge como alternativa aos combustíveis derivados de petróleo. O hidrogênio possui elevada densidade energética (141,9 J/kg) e a sua queima não emite carbono na atmosfera. Além disso, tecnologias modernas como as Células a Combustível Microbianas (CCM) estão sendo desenvolvidas para produção de energia elétrica a partir de matérias primas renováveis. O funcionamento dessas células envolve algumas reações, entre elas a oxidação dos compostos orgânicos, catalisada por microrganismos. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi combinar duas formas de obtenção de energia renovável: a produção fermentativa de hidrogênio por uma cepa de *Clostridium beijerinckii* Br21 e o aproveitamento dos subprodutos dessa fermentação na geração de energia elétrica, através de uma CCM com um consórcio de microrganismos. Foi realizado um estudo de diferentes composições de meio de cultura para a produção fermentativa de H₂ pelo *C. beijerinckii* Br21 visando aumentar a concentração de ácidos orgânicos a partir da glicose. Como principais subprodutos da fermentação foram detectados os ácidos láctico, acético e butírico nas concentrações de 0,26, 0,30 e 2,90 g/L, respectivamente. Desse modo, uma CCM, na qual uma cultura mista de microrganismos cresceu no bioânodo foi alimentada com estes ácidos orgânicos separadamente (cerca de 1 g/L) e, posteriormente, com o efluente da produção de H₂ para geração de energia elétrica. Em 7 dias de operação da CCM, a densidade de potência média se estabilizou em 1,2, 0,50, 0,62, 0,73 e 0,60 W/m² nas CCMs alimentadas com os ácidos acético, butírico, láctico, a mistura dos ácidos e com o efluente, respectivamente. Além disso, foi verificado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) que o ácido láctico, o ácido butírico e o efluente da fermentação promoveram maior crescimento do biofilme. Entretanto, na CCM alimentada com ácido acético, a qual teve o menor crescimento do biofilme, foi obtida a maior densidade de potência (1,2 W/m²). Portanto, nota-se que é possível combinar processos para aproveitar a energia contida em subprodutos da fermentação de H₂ para gerar outro tipo de energia: a energia elétrica em uma célula a combustível microbiana. Desta forma as matérias primas renováveis podem ser aproveitadas de forma integral.

Palavras-chave: *Clostridium*, ácidos orgânicos, energia elétrica

ABSTRACT

PASSOS, V. F. **Use of fermentative hydrogen production byproducts to generate energy in a microbial fuel cell.** 2018. 113p. Dissertation (Master's Degree). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Biohydrogen obtained from carbohydrate fermentation constitutes an alternative to fuel oil derivatives. Hydrogen has high energy density (141.9 J/kg), and its burning does not release carbon into the atmosphere. Moreover, modern technologies such as Microbial Fuel Cells (MFCs) are being developed to produce electric energy from renewable raw materials. These cells operate through reactions, like organic compound oxidation, catalyzed by microorganisms. This study has combined two ways of obtaining renewable energy: fermentative hydrogen production by *Clostridium beijerinckii* Br21 strain and use of fermentation byproducts in electric energy production by a MFC associated with a microorganism consortium. Different culture medium compositions were evaluated for fermentative hydrogen production by *C. beijerinckii* Br21 in an attempt to increase the concentration of organic acids originating from glucose. The main fermentation byproducts were lactic, acetic, and butyric acids at concentrations of 0.26, 0.30, and 2.90 g/L, respectively. The MFC containing a mixture of microorganisms grown on the bioanode was fed with these organic acids separately (approximately 1 g/L) and subsequently fed with effluent from hydrogen production to generate electric energy. On day 7 of MFC operation, the average power density stabilized at 1.2, 0.50, 0.62, 0.73, and 0.60 W/m² in MFCs fed with acetic acid, butyric acid, lactic acid, a mixture of the acids, and the effluent, respectively. Scanning Electron Microscopy (SEM) and quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) revealed that lactic acid, butyric acid, and fermentation effluent promoted higher biofilm growth. However, the MFC fed with acetic acid provided the lowest biofilm growth and the highest power density (1.2 W/m²). Therefore, it is possible to combine processes to take advantage of the energy contained in hydrogen fermentation byproducts to generate another type of energy: electric energy in a microbial fuel cell. In this way, entire renewable raw materials can be used.

Keywords: *Clostridium*, organic acids, electric energy

1. INTRODUÇÃO

Assuntos relacionados ao esgotamento dos combustíveis fósseis e sobre os impactos que eles causam ao meio ambiente têm sido frequentemente levantados e debatidos. Uma das maiores questões é a substituição das formas atualmente praticadas de geração de energia a partir de combustíveis fósseis, com preços flutuantes e cuja queima produz gases de efeito estufa, por sistemas produtores de energia limpa. De acordo com a *International Energy Agency* (IEA), a projeção de emissão de CO₂ na atmosfera aumentará de 50% em 2030 para 80% em 2050 (IEA, 2009). Estas previsões tem desencadeado o interesse pelo desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de combustíveis a partir de recursos renováveis (RODIONOVA et al., 2016).

A Figura 1 mostra o panorama da produção de energia mundial até 2035. De acordo com os estudos feitos pela BP Energy Outlook 2035 (2015), a tendência de produção de energia derivada de combustíveis fósseis é diminuir, enquanto que a energia baseada em fontes renováveis, como os biocombustíveis, é aumentar significativamente até 2035.

Figura 1. Previsão da produção de energia no mundo (“BP Energy Outlook 2035”, 2015).

Dentro desse contexto, os sistemas biológicos para a produção de energia têm sido vistos com grande interesse, pois é possível utilizar recursos renováveis, inclusive residuais, tais como águas residuárias e resíduos agroindustriais como matérias primas. O hidrogênio também surge como alternativa atraente de combustível, pois a sua combustão resulta em apenas água, ou seja, não emite gases tóxicos no meio ambiente (KALINCI; HEPBASLI; DINCER, 2009; PERERA et al., 2012). Em escala industrial, o hidrogênio é atualmente produzido por processos térmicos e químicos, porém mais recentemente tem sido investigada a possibilidade de sua produção por via biológica (REGINATTO; ANTÔNIO, 2015; SARMA et al., 2017). O principal gênero de bactéria produtor de hidrogênio é o *Clostridium* que é capaz de gerar hidrogênio (gás) através da fermentação de carboidratos, além de ácidos orgânicos, como subprodutos solúveis. Esses mesmos ácidos ainda podem ser oxidados e liberar mais energia. Neste sentido, é possível acoplar tecnologias no sentido de aproveitar de forma integral a matéria prima. Por exemplo, as Células a Combustível Microbianas – CCM, ou em inglês *Microbial Fuel Cell (MFC)*, tem sido investigadas como um sistema para produção de energia elétrica a partir de efluentes, inclusive efluentes da produção fermentativa de H₂, contendo ácidos orgânicos. O uso de CCM para esse fim envolve algumas reações, entre elas a de oxidação dos compostos orgânicos, catalisada por microrganismos. Essas reações geram eletricidade através da transferência de elétrons para um circuito externo (LOGAN et al., 2006; RACHINSKI et al., 2010; SANTORO et al., 2017).

Tanto a tecnologia para a produção biológica de H₂, quanto à geração de energia em uma CCM tem efeitos ambientais positivos, pois proporcionam o tratamento de resíduos utilizando-os como matéria prima para a produção de biocombustível e/ou energia.

Na Figura 2 é possível verificar a evolução das publicações científicas nessas áreas entre o ano 2000 até o presente (dezembro 2017), usando como palavras-chave célula a combustível microbiana (*microbial fuel cell*) e célula a combustível microbiana aplicada ao tratamento de resíduos (*microbial fuel cell + wastewater treatment*). Podemos observar que há um crescimento exponencial do interesse da comunidade científica nessa área, revelando a importância dos estudos nessa tecnologia para posteriores aplicações (Fonte: *Web of Science*TM, acesso em 27 de dezembro de 2017).

Figura 2. Evolução do número de publicações da base de dados *Web of Science*TM para as palavras-chave *microbial fuel cell* e *microbial fuel cell + wastewater treatment* (Fonte: *Web of Science*TM, acesso em 27 de dezembro de 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O hidrogênio como combustível

Atualmente, estudos acerca de combustíveis limpos vêm sendo realizados devido à preocupação ambiental com relação aos compostos carbônicos emitidos na atmosfera. Assim, o hidrogênio (H₂) está sendo explorado para aplicações energéticas devido a duas principais características. O H₂, não contribui com o efeito estufa, ou seja, em sua combustão direta e completa gera somente moléculas de água (Equação 1), enquanto outros combustíveis liberam carbono no meio ambiente (0,86 kg C/kg gasolina, por exemplo), conforme Tabela 1 (MIDILLI et al., 2005; DAS; VEZIROGLU, 2008).

Outra característica a ser considerada é a quantidade de energia contida no combustível. O H₂ possui alta densidade energética (141,9 J/kg) comparada com outros combustíveis, ou seja, possui três vezes mais energia que derivados do petróleo, como a

gasolina (47,4 J/kg) e o gás natural (50,0 J/kg), e cinco vezes mais que a energia contida no etanol (29,9 J/kg), conforme mostrado na Tabela 1 (PIERA; MARTÍNEZ-VAL; MONTES, 2006; WONG; WU; JUAN, 2014).

Tabela 1. Comparação entre propriedades do hidrogênio com outros combustíveis (MIDILLI et al., 2005)

Combustível	Densidade energética (J/kg)	Emissão de carbono (kg C/kg combustível)
Hidrogênio	141,9	0,00
Gás natural	50,0	0,46
Gasolina	47,4	0,86
Biodiesel	37,0	0,50
Carvão	30,0	0,50
Etanol	29,9	0,50
Metanol	22,3	0,50

O H_2 não é encontrado na natureza, sendo necessário desenvolver processos economicamente viáveis e limpos para sua obtenção e seu uso como combustível. Atualmente existem diversos métodos de produção de H_2 que podem se dividir em duas categorias: i) derivados de combustíveis fósseis; e ii) derivados de fontes renováveis (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017).

Porém, 96% da produção de hidrogênio mundial é derivada de fontes não renováveis, como os combustíveis fósseis (48% gás natural; 30% óleo; 18% carvão) (WUNSCHERS; LINDBLAD, 2002; WONG; WU; JUAN, 2014; MOLINER; LÁZARO; SUELVE, 2016). Dessa forma, há um interesse pelo aumento da produção de hidrogênio a partir de materiais renováveis, como a produção biológica que, atualmente, corresponde a apenas 1% da produção mundial de H_2 (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

2.2. Formas de obtenção de hidrogênio

O hidrogênio pode ser produzido a partir de diversas matérias primas, incluindo combustíveis fósseis e fontes renováveis por processos químicos, termoquímicos, eletrolíticos, fotolíticos e biológicos (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014), como pode ser observado na Figura 3. Os processos que geram H_2 através de combustíveis fósseis requerem altas temperaturas ($> 850^{\circ}C$) e altas pressões (KAPDAN; KARGI, 2006), assim como a eletrólise da água que demanda muita energia devido ao uso de uma corrente elétrica contínua (CONTE et al., 2001). Por outro lado, a produção biológica de hidrogênio apresenta as vantagens de ser operada a temperaturas e pressões ambientes, além da utilização de matérias primas renováveis, abrindo a possibilidade do emprego de materiais residuais que seriam lançados no meio ambiente (DAS; VEZIROGLU, 2001, 2008; KALINCI; HEPBASLI; DINCER, 2009).

Figura 3. Métodos de produção de hidrogênio (adaptado de NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017).

A reforma a vapor do gás natural é o método mais difundido e utilizado para a produção de hidrogênio e consiste na sua reação com vapor, na presença de um catalisador, produzindo hidrogênio e dióxido de carbono (Equações 2 e 3) (HUFTON; MAYORGA; SIRCAR, 1999; NAVARRO; PEÑA; FIERRO, 2007).

A oxidação parcial de hidrocarbonetos consiste na reação desses compostos com quantidades limitantes de oxigênio a altas temperaturas (Equação 4) (NAVARRO; PEÑA; FIERRO, 2007; KALAMARAS; EFSTATHIOU, 2013).

A gaseificação do carvão é outro processo para a produção de hidrogênio em grande escala. O hidrogênio é produzido pela decomposição térmica dessa matéria prima, na presença de água, conforme Equação 5 (NAVARRO; PEÑA; FIERRO, 2007; KALINCI; HEPBASLI; DINCER, 2009).

Porém, o hidrogênio também pode ser gerado a partir da eletrólise da água. Neste processo, a molécula de água é clivada em moléculas de hidrogênio e oxigênio através da passagem de uma corrente elétrica contínua (Equação 6). Embora seja uma tecnologia bem estabelecida para geração de H_2 de forma limpa, o custo é alto devido ao uso de uma corrente contínua para a realização dessa reação endotérmica (CONTE et al., 2001; KALAMARAS; EFSTATHIOU, 2013; SANTOS; SEQUEIRA, 2013).

Alternativamente, os processos biológicos para a produção de hidrogênio a partir de materiais renováveis vêm se desenvolvendo nos últimos anos, os quais podem ser divididos em dois distintos grupos: i) processos que dependem de luz, tais como a biofotólise direta e indireta da água e a fotofermentação; e ii) processos independentes de luz, como a fermentação (KALINCI; HEPBASLI; DINCER, 2009; KIRTAY, 2011).

A biofotólise da água utiliza a luz como fonte de energia para decompor a molécula de água em hidrogênio e oxigênio, a qual pode ser dividida em processo direto

e indireto. Na biofotólise direta os elétrons oriundos da fotossíntese, realizada pelas microalgas (algas verdes), são absorvidos pelos fotossistemas I e II e transferidos para a ferredoxina. Esses elétrons são reaproveitados para a formação de moléculas de H₂, através da ação da enzima hidrogenase (Equação 7) (DAS; VEZIROGLU, 2008; KIRTAY, 2011; HOSSEINI et al., 2015).

Já na biofotólise indireta, as cianobactérias, realizam a fotossíntese e geram carboidratos com energia armazenada, a qual é utilizada para gerar H₂ a partir da água com a ação da nitrogenase, conforme Equações 8 e 9 (DAS; VEZIROGLU, 2008; KIRTAY, 2011; HOSSEINI et al., 2015).

Uma das vantagens desses processos é o uso da água como fonte para a geração do H₂, entretanto, a concomitante produção de O₂ é vista como uma barreira, uma vez que essa molécula é prejudicial para as enzimas envolvidas na geração de H₂, como a hidrogenase e a nitrogenase (KIRTAY, 2011; HOSSEINI et al., 2015). Além disso, a constante necessidade de luz e a sua homogeneidade no sistema são desvantagens desses processos.

A fotofermentação é outro processo de produção biológica de H₂ que necessita de constante iluminação. Os microrganismos responsáveis pela produção são as bactérias fotossintetizantes púrpuras não sulfurosas que utilizam a energia da luz e compostos reduzidos, como os ácidos orgânicos, para serem convertidos em H₂ e CO₂ pela ação da enzima nitrogenase (Equação 10) (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

Por fim, o processo biológico que não depende de luz para a produção de H₂ é a fermentação, realizada por microrganismos anaeróbios estritos e/ou facultativos. Dentre os processos biológicos, a fermentação é o processo mais estudado e o que se encontra mais próximo de uma aplicação industrial. Os microrganismos fermentativos produtores de H₂ convertem a matéria orgânica rica em carboidratos (como por exemplo, a glicose)

em ácidos orgânicos, hidrogênio e dióxido de carbono (Equação 11) (DAS; VEZIROGLU, 2001, 2008; VERAS et al., 2017).

A Tabela 2 sintetiza as vantagens e desvantagens de cada processo biológico para a obtenção de H_2 .

Tabela 2. Vantagens e desvantagens de diferentes processos biológicos de produção de hidrogênio (adaptado de DAS; VEZIROGLU, 2008; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014)

Processo / microrganismo	Vantagens	Desvantagens
Produção biológica de H₂	Pressão e temperatura ambiente	Baixa velocidade e rendimento de H₂
Biofotólise direta / algas verdes	Produção de H ₂ a partir da água Não necessita de ATP	Necessita de iluminação Inibição das hidrogenases pelo O ₂ Baixa eficiência fotoquímica
Biofotólise indireta / cianobactérias	Produção de H ₂ a partir da água Capacidade de fixar N ₂ e produzir H ₂ pelas nitrogenases	Necessita de iluminação Necessidade de ATP pelas nitrogenases É produzido uma mistura de H ₂ e CO ₂
Fotofermentação / bactérias fotossintéticas	Ampla espectro de luz pode ser utilizada Utilização de diferentes resíduos e efluentes como substrato	Necessita de iluminação O ₂ é um inibidor da nitrogenase Eficiência de conversão da luz é baixa É produzido mistura de H ₂ e CO ₂
Fermentação / bactérias fermentativas	Não necessita de iluminação Variedade de fontes de carbono como substrato Produção de subprodutos com alto valor agregado Utilização de materiais lignocelulósicos como substrato O ₂ não limita, por se tratar de um processo anaeróbio	O ₂ é um inibidor da hidrogenase Baixos rendimentos de H ₂ Altas pressões parciais de H ₂ limitam a produção É produzido uma mistura de H ₂ e CO ₂

2.3. Produção de H₂ por fermentação

A produção fermentativa de hidrogênio se destaca por ser um processo biológico independente de luz, podendo ser utilizada diversas fontes de carbono, incluindo águas residuárias e biomassa lignocelulósica como substratos para a produção do hidrogênio (MASSET et al., 2012; AL-SHORGANI et al., 2014; NASR et al., 2017). O H₂ pode ser obtido com o emprego de culturas mistas como biocatalisadores, tais como lodos anaeróbios de sistema de tratamento de efluentes (KARGI; EREN; OZMIHCI, 2012; SIVAGURUNATHAN et al., 2015; HAN et al., 2016; AKHLAGHI et al., 2017; ZINATIZADEH et al., 2017), dejetos de animais (DING et al., 2017) e resíduos alimentícios (XING et al., 2010). Apesar dos sistemas produtores de H₂ com cultura mista não necessitarem de condições de esterilidade, o seu rendimento é comprometido pela presença de bactérias consumidoras de H₂ (LAMAISON et al., 2015; ELBESHBISHY et al., 2017; GOUD et al., 2017). Dessa forma, estratégias devem ser adotadas a fim de maximizar a produção de H₂, como a uso de culturas puras.

Normalmente, rendimentos mais elevados são obtidos quando se usa culturas puras de microrganismos produtores de H₂. Dentre essas bactérias, as do gênero *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* e especialmente *Clostridium* são citadas como produtoras de hidrogênio (MARU et al., 2012; SIVAGURUNATHAN; KUMAR; LIN, 2014; CABROL et al., 2017).

2.3.1. Produção de H₂ por *Clostridium* sp.

As bactérias do gênero *Clostridium* estão entre as mesofílicas que possibilitam o maior rendimento de hidrogênio, sendo as espécies *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii* as mais estudadas (CABROL et al., 2017). Esse gênero possui a seguinte taxonomia: filo Firmicutes, classe Clostridia, ordem Clostridiales, família Clostridiaceae. É um dos maiores gêneros bacterianos, possuindo mais de 150 espécies. Dentre suas principais características estão a de serem bactérias gram-positivas e anaeróbias estritas. Esses microrganismos são capazes de formar endósporos, ou seja, possuem um mecanismo de defesa contra adversidades que possam ocorrer no ambiente em que se encontram, tais como calor e compostos tóxicos à célula. Devido ao elevado número de espécies, as bactérias pertencentes a esse gênero são encontradas e cultivadas nos mais diversos meios de cultura, diferentes pH e temperatura. Desse modo, esses

microrganismos são considerados notáveis para a biotecnologia, devido ao seu amplo metabolismo (DÜRRE, 2008).

O *C. acetobutylicum* e *C. beijerinckii* caracterizam-se por apresentar duas fases distintas de crescimento, nas quais podem ser obtidos diferentes produtos do seu metabolismo. A fase acidogênica, que compreende a formação dos ácidos acético e butírico, e outra conhecida como solventogênica, a qual envolve a síntese de solventes como Acetona, Butanol e Etanol, conhecida como fermentação ABE (KARIMI et al., 2015). Na acidogênese, há o crescimento celular exponencial (fase log) com a produção de gases (H_2 e CO_2) e, principalmente, dos ácidos acético (Equação 12) e butírico (Equação 13), com consequente queda do pH do cultivo. Nesta fase, o lactato (Equação 14) e o etanol (Equação 15) também podem ser formados, mas não estão relacionados com a biossíntese de H_2 , uma vez que a via de formação destes compostos competem por equivalentes redutores.

O decréscimo do pH do meio, ocasionado pelo acúmulo de ácidos orgânicos, nesta fase da fermentação, parece atuar como indutor da biossíntese das enzimas da segunda fase, a solventogênica. Na fase solventogênica, as células de *Clostridium* permanecem predominantemente na fase estacionária de crescimento e, especialmente, butanol e acetona são formados. Os ácidos acético e butírico, anteriormente formados, retornam ao interior da célula e são os substratos da produção de solventes, ocasionando um leve aumento do pH do meio. A formação de solventes neutros parece ser uma resposta adaptativa do microrganismo ao baixo pH do meio.

Bioquimicamente, o início da fermentação se dá com a conversão do substrato à piruvato, via glicólise. A partir do piruvato, a via metabólica do *Clostridium* é capaz de produzir diversos produtos, dentre eles o hidrogênio, de acordo com a ação de enzimas específicas (Figura 4).

A partir da clivagem do piruvato pela ação da piruvato ferredoxina oxidurreductase (PFOR) é produzido CO_2 e acetil-CoA que segue para a formação dos ácidos acético e butírico. A ferredoxina que compõe a PFOR é capaz de transferir elétrons para a enzima hidrogenase que utiliza os íons H^+ como aceptores finais de elétrons. Desse modo, a ferredoxina é reoxidada formando H_2 . Outra etapa que envolve a formação de hidrogênio é a reoxidação do NADH. Através da ação da NADH-ferredoxina oxidurreductase (NFOR), os elétrons do NADH são transferidos à ferredoxina e posteriormente aos íons H^+ , gerando H_2 (MASSET et al., 2012).

Em cada etapa descrita acima há a geração de 2 mols de H₂, ou seja, teoricamente, a cada mol de glicose oxidada são formados 4 mols de hidrogênio. Entretanto, esse rendimento pode ser afetado pela pressão parcial de H₂, ou seja, a reoxidação do NADH pela NFOR somente é realizada sob baixas pressões parciais de H₂ e, se houver altas pressões parciais de H₂ a NFOR é inibida e o NADH necessita ser reoxidado de outra forma, gerando outros produtos e, conseqüentemente, afetando o rendimento de H₂. Por exemplo, a formação de etanol (Equação 15) e ácido láctico (Equação 14) também são possíveis rotas para a reoxidação do NADH (Figura 4). Porém, quando estes compostos são formados não há a geração de H₂ pelo *Clostridium* e, portanto, o rendimento de H₂ é diminuído. Dessa forma, dependendo dos metabólitos formados durante a fermentação, a quantidade de hidrogênio formada será diferente (SINHA; PANDEY, 2011)

O rendimento teórico de H₂ quando acetil-CoA é totalmente convertido em ácido acético é de 4 mols de hidrogênio por mol de glicose, conforme Equação 12. Entretanto, quando há a formação de ácido butírico, o rendimento teórico é de 2 mols de hidrogênio (Equação 13) (JIANG et al., 2013).

Figura 4. Via metabólica da fase acidogênica para *Clostridium* (adaptado de LÜTKE-EVERSLOH; BAHL, 2011; SÁ et al., 2013).

Enzimas: 1-lactato desidrogenase; 2-piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR); 3-hidrogenase; 4-NAD(P)H-ferredoxina oxidoreductase (NFOR); 5-fosfotranscetilase quinase; 6-acetatoquinase; 7-fosfotransbutirase quinase; 8-butiratoquinase.

A produção do H_2 tem sido bastante estudada, sendo a escolha da matéria prima uma variável determinante no custo da fermentação. Dentre as fontes de carbono, o *Clostridium* metaboliza uma ampla variedade de substratos: pentoses (xilose, arabinose), hexoses (glicose, manose, galactose, frutose), mono, di e polissacarídeos (RAGANATI et al., 2015a, 2015b), bem como resíduos agroindustriais (LI et al., 2016) e materiais lignocelulósicos hidrolisados ricos em carboidratos (KUJAWSKA et al., 2015).

Estudos recentes utilizaram diferentes inóculos, tanto de cultura pura, quanto mista, com os mais variados substratos a fim de avaliar o rendimento de biohidrogênio – $Y_{p/s}$ (mol H_2 /mol substrato consumido), cuja compilação de resultados está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento de H₂ utilizando diferentes inóculos e substratos

Inóculo	Substrato	Rendimento (mol H ₂ /mol substrato)	Referência
Lodo de ETE	resíduos alimentícios	2,10	KIM et al., 2011
Lodo de ETE	glicose	3,04	AMIN et al., 2017
Lodo de ETE	sacarose	2,87	SALEM et al., 2017
Lodo de UASB	glicose	0,21	LAMAISSON et al., 2015
Lodo de UASB	glicose	1,38	SIQUEIRA; REGINATTO, 2015
Lodo anaeróbio	xilose	1,67	QUÉMÉNEUR et al., 2011
<i>C. beijerinckii</i> DSM 1820	glicose	2,69	NASR et al., 2017
<i>C. beijerinckii</i> DSM 1820	glicose	1,45	MASSET et al., 2012
<i>C. beijerinckii</i> Br21	glicose	1,29	FONSECA; GUARAZZONI; REGINATTO, 2016
<i>C. beijerinckii</i> Br21	sacarose	1,43	FONSECA; GUARAZZONI; REGINATTO, 2016
<i>C. beijerinckii</i> DSM 1820	glicose	2,54	GOMEZ-FLORES; NAKHLA; HAFEZ, 2017
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> DSM 14923	glicose	2,20	NASR et al., 2017
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> DSM 14923	amido	1,07	NASR et al., 2017
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	farelo de arroz	2,13	DADA; YUSOFF; KALIL, 2013
<i>C. termitidis</i> ATCC 51846	glicose	1,99	GOMEZ-FLORES; NAKHLA; HAFEZ, 2015
<i>C. termitidis</i> ATCC 51846	celulose	1,11	GOMEZ-FLORES; NAKHLA; HAFEZ, 2015
<i>C. felsineum</i> DSM 794	glicose	0,62	MASSET et al., 2012
<i>C. pasteurianum</i> DSM 525	glicose	0,66	MASSET et al., 2012
<i>C. butyricum</i> CWBI 1009	glicose	0,97	MASSET et al., 2012

Um dos gargalos da produção de H_2 por fermentação é que apenas parte da energia contida nos carboidratos é aproveitada na produção de H_2 por fermentação, a outra parte permanece na forma de ácidos orgânicos, especialmente o acético e o butírico (Equações 12 e 13, respectivamente).

Dessa forma, esses ácidos ainda podem ser recuperados (ZHOU et al., 2018) ou aproveitados em outros processos, tais como a fotofermentação para o aumento do rendimento de H_2 (CHENG et al., 2011; ÖZKAN et al., 2012; SILVA et al., 2016; ZHANG et al., 2017b), a metanogênese para gerar outro combustível, o metano (CHENG et al., 2016; DING et al., 2016; YUN et al., 2018), ou, os ácidos orgânicos podem ser empregados como matérias primas para a geração de energia elétrica em Células a Combustível Microbianas – CCM (ELMEKAWY et al., 2015; PASUPULETI et al., 2015; CERRILLO; VIÑAS; BONMATÍ, 2017; SIVAGURUNATHAN et al., 2017).

Dentro desse contexto, estas duas tecnologias, fermentação acidogênica e CCM, têm sido vistas como complementares, uma vez que os subprodutos da produção fermentativa de H_2 contendo ácidos orgânicos podem ser utilizados como substratos, ou seja, fonte de compostos a serem oxidados em uma CCM, gerando energia elétrica adicional, como esquematizado na Figura 5 (AQUINO NETO; REGINATTO; DE ANDRADE, 2017; BUNDHOO, 2017).

Figura 5. Sistema fermentativo e bioeletroquímico para geração de energia, adaptado de AQUINO NETO; REGINATTO; DE ANDRADE (2017).

2.4. Células a Combustível Microbianas (CCM)

POTTER (1911) foi o primeiro pesquisador a reportar um sistema bioeletroquímico (BES), ou seja, um sistema eletroquímico catalisado por microrganismos para geração de energia e/ou remoção de matéria orgânica (ELMEKAWY et al., 2015; JIANG et al., 2016; HEIDRICH et al., 2018). Michael Cresse Potter demonstrou um fluxo de corrente entre dois eletrodos de platina inseridos em uma cultura de *Escherichia coli*, a qual foi capaz de liberar energia através da desintegração de compostos orgânicos. A partir das observações de Potter surgiu a concepção atual das Células a Combustível Microbianas (CCM), as quais são sistemas bioeletroquímicos que se destacam como tecnologias para obtenção de energia que combinam o tratamento de efluentes e biorremediação com a conversão de energia química em energia elétrica (LOGAN; REGAN, 2006; PASSOS et al., 2016; HE et al., 2017). Esses sistemas utilizam microrganismos para gerar eletricidade em células a combustível baseado em processos bioquímicos de geração de energia, ou seja, através da conversão da energia química contida na matéria orgânica em energia elétrica (LOGAN, 2009; RACHINSKI et al., 2010; PENTEADO et al., 2016; ASAI et al., 2017).

Dentre as vantagens de uma CCM pode-se citar a conversão direta de energia do substrato em energia elétrica; menor produção de lodo em relação ao processo de digestão anaeróbia; não necessidade de aeração; possibilidade de instalação em áreas sem infraestrutura elétricas; geração de energia sem a necessidade de separação e/ou purificação; e, possibilidade de tratamento de efluentes industriais (GUDE, 2016; HE et al., 2017).

A estrutura de uma CCM consiste em basicamente dois compartimentos, os quais são separados por uma membrana trocadora de prótons (PEM, do inglês *proton exchange membrane*) que impede a difusão de O₂ para o ânodo e permite a passagem dos prótons gerados para o cátodo. No ânodo ocorre a oxidação da matéria orgânica mediada por microrganismos. No cátodo, os elétrons e os prótons gerados através da oxidação ocorrida no ânodo, reduzem um aceptor de elétrons, geralmente o oxigênio, produzindo água. Esses dois eletrodos são conectados por um circuito externo onde há a trajetória dos elétrons para o aproveitamento de sua energia (GUDE, 2016; YUAN et al., 2016; HE et al., 2017). A diferença de potencial elétrico (ddp) provocada entre essas reações gera um fluxo de elétrons que pode ser mensurado e utilizado para realizar trabalho. Um esquema geral de uma CCM é apresentado na Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática de uma CCM, baseada na redução do oxigênio no compartimento catódico (adaptado de LOVLEY, 2006).

Diferentes configurações de CCM vêm sendo analisadas com o objetivo de melhorar o sistema no sentido de obter uma melhor eficiência. As CCMs podem se apresentar nas formas representadas na Figura 7: a) forma H; b) câmara única; c) câmara dupla; d) empilhadas; e) sedimento; e, f) tubular (KHAN et al., 2017). Todas apresentam um ânodo anaeróbico e um cátodo aeróbico (podendo ou não ter aeração no caso da câmara dupla e em forma de H (Figura 7A e C), e sendo aberto para o ar no caso da câmara única (Figura 7B) (LOGAN et al., 2006; DU; LI; GU, 2007).

As CCMs em forma de H têm baixas densidades de potência e altas resistências internas e são limitadas apenas a uso laboratorial (Figura 7A). Em CCM de câmara única, uma densidade de potência elevada geralmente é alcançada em comparação com uma CCM em forma de H (Figura 7B). A CCM de câmara dupla possui uma área de superfície maior para a transferência de prótons (Figura 7C). As CCMs empilhadas são o tipo de configuração em que é possível obter uma bateria de células a combustível, não afetando a eficiência coulômbica de cada célula, e assim aumentando a eficiência em geração de energia (Figura 7D). Já as CCMs de sedimentos são usadas como fontes de energia para operar sensores remotos (Figura 7E), as quais estão ganhando muita importância na área de pesquisa de energia sustentável, pois ajudam no tratamento de sedimentos marinhos

ou de água doce além de gerar eletricidade (LOGAN et al., 2006; WU et al., 2016). Entretanto, esse tipo de configuração é restrito a uma série de razões como a cinética microbiana, alterações de temperatura, limitações de transferência de massa e difusão de cátions e disponibilidade de oxigênio (SCHAMPHELAIRE et al., 2008). Por fim, atenções têm sido focadas em CCMs do tipo tubular, pois elas aumentam o tempo de retenção de lodo e reduz o tempo de retenção hidráulica, o que reduziria o custo operacional em longo prazo (KHAN et al., 2017).

Figura 7. Representações esquemáticas de diferentes tipos de CCMs. (a) forma H, (b) câmara única, (c) câmara dupla, (d) empilhada, (e) sedimento e (f) tubular (adaptado de KHAN et al., 2017).

O desempenho de uma CCM é determinado de diferentes maneiras, tais como: i) potencial, em volts (V); ii) corrente, em *ampères* (A); iii) potência, em watts por metro quadrado (W/m^2); e iv) eficiência coulômbica (%), ou seja, o quanto de substrato consumido foi utilizado para gerar energia. Entretanto, esse desempenho pode ser limitado pela resistência interna da célula, ou seja, a atividade catalítica no ânodo, a difusão do substrato e difusão e consumo de prótons e elétrons caracterizam essa limitação (LEHNEN, 2014).

Além disso, outros fatores relativos às configurações das CCMs, diferenças no material usado nos eletrodos também podem influenciar no desempenho das CCMs. Dessa forma, faz-se necessário otimizar todos esses parâmetros para que haja diminuição da resistência interna do sistema e, conseqüentemente, aproveitar todo o potencial que uma CCM pode oferecer (CHENG et al., 2006).

A Tabela 4 compara diferentes configurações, densidades de potência, substratos, fontes de inóculo e eficiências coulômbicas de CCMs descritas em recentes estudos da literatura.

Tabela 4. Comparação de performances de CCMs de diferentes configurações em sistemas que empregam diferentes inóculos e substratos

Configuração	Inóculo	Substrato	Densidade de potência (mW/m ²)	Eficiência coulômbica (%)	Referência
Câmara única	lodo de ETE	esgoto doméstico	282	23	AHN et al., 2014
Câmara única	lodo anaeróbico cervejaria	efluente produção H ₂	1540	89	CHOI; AHN, 2015
Câmara única	lodo de ETE	esgoto doméstico	488	20	KONDAVEETI et al., 2017
Câmara única	lodo anaeróbio	esgoto doméstico	315	26	STAGER et al., 2017
Câmara única	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	lactato + Fe ³⁺	158	N/A	WU et al., 2013
Câmara dupla	lodo de ETE	resíduo de casa de laranja	359	16	MIRAN et al., 2016a
Câmara dupla	lodo de ETE	palha de colza	54	10	JABLONSKA et al., 2016
Câmara dupla	lodo de ETE	resíduo de casca de limão	371	32	MIRAN et al., 2016b
Câmara dupla	lodo industrial	glicose + fenol	66	N/A	HASSAN et al., 2018
Câmara dupla	lodo de ETE	acetato	135	N/A	PASSOS et al., 2016
Câmara dupla	bactérias redutoras de SO ₄ ²⁻	lactato + Cu ²⁺	224	N/A	MIRAN et al., 2017
Câmara dupla	<i>Bacillus cereus</i> e <i>Klebsiella oxytoca</i>	efluente de curtume	44	N/A	RAJESWARI et al., 2016
Tubular	lodo anaeróbio	esgoto doméstico	48	5	KARLUVALI et al., 2015

N/A: não avaliado

2.4.1. Compartimento catódico

O cátodo da CCM pode ser formado por um tecido de carbono impregnado com algum metal com poder catalítico, como por exemplo a platina, para catalisar a reação de redução do oxigênio (aceptor final de elétrons), a partir dos elétrons gerados no ânodo e os prótons que permeiam a membrana. A Equação 16 representa a reação que ocorre nesse compartimento, o qual é aeróbio e o oxidante, por exemplo o O_2 é reduzido, formando água como produto (LOGAN; REGAN, 2006; CHOUDHURY et al., 2017; SANTORO et al., 2017).

Também é possível que a reação de redução no compartimento catódico seja mediada por microrganismos. A versatilidade dos biocátodos nos permite usar não apenas oxigênio, mas também contaminantes como possíveis aceptadores de elétrons, permitindo a remoção de nutrientes e a biorremediação em conjunto com a geração de eletricidade (HUANG; REGAN; QUAN, 2011). ZHANG et al. (2012) utilizaram um ânodo inoculado com lodo de estação de tratamento de esgoto, enquanto que o biocátodo foi inoculado com solo para aumentar a performance de uma CCM.

2.4.2. Compartimento anódico

No compartimento anódico, um tecido de carbono abriga os microrganismos anaeróbios, os quais tem a função de oxidar a matéria orgânica presente no meio. A Equação 17 representa a reação que ocorre no ânodo, utilizando a glicose como fonte de matéria orgânica. Nessa oxidação do material orgânico, tendo como exemplo a glicose, há a formação de dióxido de carbono, 24 prótons e 24 elétrons (DU; LI; GU, 2007).

Os elétrons gerados na oxidação são transferidos diretamente para o eletrodo, fluindo em seguida para o cátodo pelo circuito externo. Os prótons formados também são conduzidos para o cátodo a fim de manter a neutralidade de carga, através da membrana trocadora de prótons, que separa o ânodo do cátodo.

As bactérias que possuem a habilidade de transferir para fora de suas células os elétrons oriundos da oxidação dos materiais orgânicos, quando em ambiente anaeróbio,

são denominadas de bactérias exoeletrogênicas (LOGAN, 2009). O funcionamento de uma CCM depende da formação de um biofilme no tecido de carbono do ânodo, ou seja, as culturas puras ou mistas de bactérias necessitam aderir à superfície do eletrodo para que haja uma transferência de elétrons eficiente para o cátodo (FRANKS; MALVANKAR; NEVIN, 2010; READ et al., 2010; BARANITHARAN et al., 2015). Para que uma CCM tenha bom desempenho e, conseqüentemente, boa eficiência é preciso que os microrganismos presentes no biofilme do ânodo sejam exoeletrogênicos, ou seja, que possuam a capacidade de transferir elétrons, oriundos da oxidação da matéria orgânica, extracelularmente.

Como fontes desses microrganismos podem ser empregadas culturas mistas ou puras, sendo as mistas as mais comuns. A utilização de consórcio de microrganismos, ou seja, uma cultura mista contendo microrganismos exoeletrogênicos apresenta vantagens em relação às culturas puras, tais como: i) menores custos de operação; ii) ausência da necessidade de esterilização; e, iii) alta capacidade de adaptação às condições ambientais e maior capacidade de manutenção de condições anaeróbias pela presença de microrganismos facultativos (ZHANG et al., 2014). Dessa forma, as CCMs podem ser inoculadas com culturas mistas (lodos) de diferentes naturezas, tais como lodos de estação de tratamento de esgoto doméstico e águas residuárias (PASSOS et al., 2016; ALARAJ et al., 2017; STAGER; ZHANG; LOGAN, 2017; VICARI et al., 2017), solo (HEIDRICH et al., 2018), sedimento (XU; GE; HE, 2015), água do mar (GRATTIERI et al., 2017a, 2017b).

Dentre os gêneros de bactérias exoeletrogênicas mais encontradas em biofilmes nos ânodos de CCMs pode-se citar a *Shewanella* sp., *Geobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (KIM; CHA; KIM, 2012; ZHANG et al., 2017a; BIAN et al., 2018; PANG; GAO; CHOI, 2018; PINTO; CORADIN; LABERTY-ROBERT, 2018).

HEIDRICH et al. (2018) relataram a predominância do gênero *Geobacter* sp. em uma cultura mista oriunda de esgoto doméstico e industriais, quando uma CCM foi utilizada para a oxidação de acetato como matéria orgânica. Recentemente, YANG et al. (2017) relataram a importância de outros microrganismos, além dos exoeletrogênicos, tais como bactérias do gênero *Azoarcus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Rhodopseudomonas* sp. que auxiliam na transferência de elétrons.

Os microrganismos exoeletrogênicos, quando oxidam a matéria orgânica, geram elétrons que são transferidos para um eletrodo no ânodo, que flui para o cátodo através de um material condutor. Essa transferência de elétrons que ocorre da membrana da célula

bacteriana para o eletrodo, seguindo para o aceitor final, pode ocorrer de maneira direta e/ou indireta, por meio de três diferentes mecanismos: i) transferência direta, na qual o elétron é liberado através de citocromos presentes na membrana externa da célula; ii) transferência através de mediadores, os quais são compostos químicos redox exógenos ou produzidos pelos microrganismos capazes de capturar os elétrons e transportá-los para o eletrodo; e, iii) transferência por nanofios, que são estruturas de ligação que se formam entre o microrganismo e o eletrodo. Na Figura 8 é possível observar uma representação dos três distintos mecanismos de transferência de elétrons (SHUKLA et al., 2004; RINALDI et al., 2008; LOGAN, 2009; WRIGHTON et al., 2011).

Figura 8. Esquema geral de uma CCM (a), com ampliação do bioânodo (b) representando; diferentes tipos de transferência de elétrons pelos microrganismos exoeletrogênicos: transferência direta (verde), transferência por nanofios (roxo), e transferência através de mediadores (azul). Em marrom, bactérias não exoeletrogênicas que podem estar presentes em culturas mistas (adaptado de LOGAN, 2009).

2.4.3. Aplicações de uma célula a combustível microbiana

O aproveitamento da atividade metabólica dos microrganismos pode fornecer energia para uma variedade de aplicações (LOGAN; REGAN, 2006).

Dentre as possíveis aplicações está o uso das CCMs em estações de tratamentos de efluentes municipais e/ou industriais. Através da aplicação dos efluentes na CCM seria possível a geração de energia, além do seu tratamento, podendo até a indústria ou ETE ser autossuficiente em energia elétrica, isto é, produzir a energia que consome e não depender de companhias de energia elétrica. Além disso, outra vantagem em relação aos tratamentos biológicos convencionais é a não necessidade de aeração e a redução da produção de lodo (LOGAN, 2008; LOGAN et al., 2015; MATHURIYA; YAKHMI, 2016; ZHANG; HU; LEE, 2016; WU et al., 2016). Como exemplo, a primeira escala piloto de CCM (volume de 1 m³) foi instalada em Yatala, Queensland (Austrália) com o objetivo de tratamento de água residuárias de uma cervejaria (Figura 9) (LOGAN, 2010).

Figura 9. Células a combustível microbianas tubulares testadas para produção de energia usando águas residuais produzidas na cervejaria de Foster em Yatala, Austrália (LOGAN, 2010).

As CCMs também podem ser usadas como fontes de energia para sensores ambientais, biorremediação *in situ* e descoloração de corantes (LOGAN; REGAN, 2006; JABEEN; FAROOQ, 2017). Várias outras aplicações foram relatadas por SANTORO et al. (2017), incluindo a primeira pilha de CCM autossustentável (LEDEZMA et al., 2013); o funcionamento de um relógio de pulso digital (PAPAHARALABOS et al., 2013); o carregamento de um telefone celular básico (IEROPOULOS et al., 2013) e mais recentemente de um *smartphone* (WALTER et al., 2017); e alimentação de LEDs para iluminação interna (GAJDA et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Obter energia na forma de H_2 por fermentação de glicose pelo *Clostridium beijerinckii* Br21 e utilizar os ácidos orgânicos, componentes do efluente da fermentação, em uma célula a combustível microbiana operada com um consórcio de microrganismos, visando a produção de energia elétrica.

3.2. Objetivos específicos

- a. Avaliar diferentes composições de meios de cultura para o crescimento do *C. beijerinckii* Br21 visando o aumento da produção de H_2 e ácidos orgânicos;
- b. Caracterizar e quantificar os subprodutos da fermentação da glicose pelo *C. beijerinckii* Br21;
- c. Operar uma célula a combustível microbiana com meio de cultura sintético contendo os principais ácidos orgânicos detectados no efluente da fermentação;
- d. Aplicar o próprio efluente gerado na produção fermentativa de H_2 , rico em ácidos orgânicos, para geração de energia elétrica em uma célula a combustível microbiana;
- e. Analisar a morfologia do biofilme formado no bioânodo da CCM por microscopia eletrônica de varredura;
- f. Quantificar a comunidade microbiana do inóculo da CCM e após a sua operação com cada substrato.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados nesta dissertação podem ser divididos em duas etapas. Na primeira etapa, foram estudadas diferentes composições de meios de cultura visando crescimento do *C. beijerinckii* Br21 e a consequente produção de H_2 e ácidos orgânicos. Na segunda etapa, foi verificada a possibilidade de aproveitamento dos ácidos orgânicos e do efluente da fermentação em uma célula a combustível microbiana. O desenho experimental geral da dissertação está representado na Figura 10.

Figura 10. Resumo experimental do trabalho.

4.1. Microrganismos

Para a produção fermentativa de H₂ foi utilizada a cepa de *C. beijerinckii* Br21 isolada e identificada pelo nosso grupo de pesquisa (FONSECA; GUARAZZONI; REGINATTO, 2016).

Para a geração de energia elétrica em uma CCM foi utilizado um lodo (cultura mista) proveniente de dragagem do porto de Rio Grande/RS (coordenadas 32°07'S 52°05'O), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Fabrício Butierres Santana da Universidade Federal do Rio Grande/RS (FURG).

4.2. Composição de meios de cultura

Para avaliar a capacidade do *C. beijerinckii* Br21 de produzir os ácidos orgânicos foram testados cinco diferentes meios de cultura descritos na literatura para o crescimento celular de *Clostridium* sp. (RCM – *Reinforced Clostridial Medium*; TYA – *Tryptone Yeast-extract Acetate medium*; AnS – *Anaerobic Sugar medium*; P2 e CGM – *Clostridial Growth Medium*) (WIESENBERN et al., 1988; AL-SHORGANI et al., 2016). A Tabela 5 apresenta a composição desses meios de cultivo.

Tabela 5. Composição dos meios de cultura para o crescimento de *Clostridium* sp.

Reagentes (g/L)	RCM	TYA	AnS	P2	CGM
Glicose	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Peptona	10,0	---	10,0	---	---
Extrato de carne	10,0	---	---	---	---
Tryptona	---	6,0	---	---	---
NaCl	5,0	---	1,0	---	1,0
Acetato de sódio	3,0	---	---	---	---
Acetato de amônio	---	3,0	---	---	---
Extrato de levedura	3,0	2,0	5,0	1,0	5,0
Na₂CO₃	---	---	1,0	---	---
K₂HPO₄	---	---	3,0	0,50	0,75
KH₂PO₄	---	0,50	---	0,50	0,75
(NH₄)₂SO₄	---	---	1,0	---	2,0
Cisteína	---	---	---	0,50	---
Cisteína HCl	0,50	---	---	---	---
MgSO₄ . 7H₂O	---	0,30	---	0,40	0,70
MgCl₂ . 6H₂O	---	---	0,20	---	---
CaCl₂ . 2H₂O	---	---	0,20	---	---
MnSO₄ . 4H₂O	---	---	---	0,01	0,01
FeSO₄ . 7H₂O	---	0,01	---	---	0,01
FeSO₄ . 5H₂O	---	---	---	0,01	---
Biotina	---	---	---	8x10 ⁻⁵	---
Ácido 4-aminobenzóico	---	---	---	0,001	---
L-asparagina	---	---	---	---	2,0

* q.s.p 1000 mL

O meio de cultura P2, descrito na literatura para o cultivo do *Clostridium* sp. (HAN et al., 2013; KUDAHETTIGE-NILSSON et al., 2015; MOON et al., 2015) foi modificado a fim de aumentar a produção de ácidos orgânicos. A Tabela 6 apresenta as modificações efetuadas nesse meio de cultivo.

Tabela 6. Modificações no meio de cultura P2

Composto (g/L)	Controle	P2 mod-1	P2 mod-2	P2 mod-3
Glicose	30,0	30,0	30,0	60,0
Extrato de levedura	1,0	6,0	6,0	6,0
K₂HPO₄	0,5	0,5	0,5	0,5
KH₂PO₄	0,5	0,5	0,5	0,5
Cisteína	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO₄ . 7H₂O	0,4	0,4	0,4	0,4
MnSO₄ . 4H₂O	0,01	0,01	0,01	0,01
FeSO₄ . 5H₂O	0,01	0,01	0,01	0,01
Biotina	8x10 ⁻⁵	8x10 ⁻⁵	8x10 ⁻⁵	8x10 ⁻⁵
Ácido 4-aminobenzóico	0,001	0,001	0,001	0,001
NaCl	---	1,0	1,0	1,0
CaCl₂	---	0,2	0,2	0,2
NH₄Cl	---	---	2,0	---

* q.s.p. 1000 mL

Para avaliar a produção de H₂ a partir da fermentação da glicose pelo *C. beijerinckii* Br21 foi utilizado o meio de cultura o P2 mod-2, que forneceu a maior concentração de ácidos orgânicos.

O meio de cultura utilizado para operar a CCM com a cultura mista foi o descrito por LOVLEY; PHILLIPS (1988) para o enriquecimento de bactérias exoeletrogênicas, conforme composição descrita na Tabela 7. As fontes de carbono foram modificadas e estudadas separadamente na concentração final de 1,0 g/L, quais sejam: o ácido acético, o ácido butírico, o ácido lático, a mistura dos três ácidos orgânicos, além do efluente da fermentação do H₂ (com diferentes concentrações de subprodutos e glicose residual).

Tabela 7. Composição do meio de cultura da CCM (LOVLEY; PHILLIPS, 1988)

Composto	Concentração (g/L)
Fonte de carbono	1,0
NaHCO ₃	2,5
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	1,9
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0,6
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,1
KCl	0,1
NH ₄ Cl	1,5
NaCl	0,1
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,1
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,1
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,005
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,001
Extrato de levedura	0,05

* q.s.p. 1000 mL

4.3. Ensaios de produção fermentativa de H₂ em batelada

O *C. beijerinckii* Br 21 armazenado em freezer -80°C foi utilizado para o preparo do pré-inóculo. A partir dessa cultura armazenada foi feito o cultivo em frascos tipo penicilina de 50 mL, contendo 14 mL do meio P2 mod-2 para o crescimento do pré-inóculo. Antes de fechar os frascos, gás inerte (argônio) foi borbulhado para assegurar a anaerobiose do sistema. Após 24 horas de crescimento a 35°C esta cultura foi centrifugada a 8981 g por 5 minutos, o sobrenadante foi dispensado e as células ressuspendidas em solução de NaCl (0,9% m/v) até apresentar a densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,1. Este foi o procedimento padrão realizado para o preparo dos inóculos nos ensaios de fermentação.

Os ensaios de fermentação para a produção de H₂ foram conduzidos em frascos tipo penicilina de 100 mL, contendo 56 mL de meio de cultura P2 mod-2 (Tabela 6 – item 4.2), adicionado de glicose (diminuída para 9 g/L com base na estequiometria para a produção de H₂), 4 mL do pré-inóculo (aproximadamente 7% (v/v)) e borbulhado gás

argônio, para garantir a anaerobiose. Os frascos foram incubados a 35°C e a duração das fermentações foi de aproximadamente 50 horas. Um controle de pH manual foi realizado com a adição de NaOH 0,5 mol/L nos ensaios para garantir que o pH não baixasse de 5,0.

O crescimento do *Clostridium*, o consumo do substrato e a formação dos produtos foram verificados pela coleta periódica de amostras do meio de fermentação, com seringa estéril. O crescimento dos microrganismos foi acompanhado medindo-se a DO_{600} em espectrofotômetro. As amostras para a determinação da concentração de glicose e dos ácidos orgânicos foram filtradas em filtro 0,45 μm e guardadas a -18°C para posterior análises químicas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados como a média e seus desvios médios.

O volume de H_2 em função do tempo foi mensurado por um sistema de frascos invertidos, contendo solução de NaOH 5% (m/v) e uma proveta, que auxiliou na quantificação de H_2 , de acordo com o volume de NaOH deslocado, conforme Figura 11.

Figura 11. Aparato experimental utilizado para quantificar o volume de H_2 produzido.

4.3.1. Determinação das variáveis cinéticas do ensaio de fermentação

A partir dos dados de concentração de microrganismo em função do tempo nos diferentes meios de cultivo (Tabela 5) foi possível determinar algumas variáveis cinéticas de crescimento: o tempo de fase lag, isto é, o tempo para o início do seu crescimento exponencial, o $X_{m\acute{a}x}$, que é a máxima concentração de células obtida na fermentação e as velocidades de crescimento.

Para a determinação das velocidades de crescimento, foram ajustadas curvas sigmoidais aos valores de concentração celular (X) em função do tempo a fim de obter valores de X em cada tempo de fermentação (de 0 a 100 horas), através da Equação 18.

$$y = \frac{A_2 + (A_1 - A_2)}{1 + e^{\frac{(x - x_0)}{dx}}} \quad (\text{Equação 18})$$

onde: A_1 e A_2 são coeficientes lineares dados pelo ajuste sigmoidal; X é a concentração celular; X_0 a concentração celular inicial de células (mg/L) e dx um parâmetro do ajuste.

A partir desse ajuste, foi calculada a velocidade instantânea de crescimento celular (r_x), através da Equação 19.

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (\text{Equação 19})$$

onde dx/dt é a primeira derivada da função $f(t) = X$.

A velocidade específica de crescimento (μ), ou seja, a velocidade em que o microrganismo se reproduz levando-se em conta a quantidade de células no meio foi calculada de acordo com a Equação 20.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{ou seja, } \frac{r_x}{X} \quad (\text{Equação 20})$$

Nos ensaios referentes à produção de hidrogênio em batelada, o modelo de Gompertz modificado foi utilizado para estimar os parâmetros cinéticos. O volume de H_2 acumulado no ensaio em função do tempo foram tratados no programa *Statistica 7* e modelados conforme Equação 21, para a obtenção de R_m , $H_{m\acute{a}x}$ e λ .

$$P = H_{m\acute{a}x} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Equação 21})$$

onde P representa o volume de H_2 acumulado no ensaio (mL); $H_{m\acute{a}x}$ é o volume máximo de produção de H_2 (mL); R_m indica a velocidade máxima de produção de H_2 (mL/h); o tempo de fase lag (h) é representado por λ ; e t é o tempo do experimento (h).

O rendimento de célula, por substrato consumido, ou seja, a quantidade de substrato convertido em célula ($Y_{x/s}$) e os rendimentos de produtos (H_2) por substrato consumido ($Y_{p/s}$) foram calculados de acordo com as Equações 22 e 23.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (\text{Equação 22})$$

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (\text{Equação 23})$$

onde X é a concentração de célula ao final da fermentação e X_0 a concentração inicial de células (mg/L); S_0 e S são as concentração de substrato no início e ao final do ensaio em mg/L e P_0 e P é a concentração de produto no início e final da fermentação, respectivamente.

Para isso, o volume de H_2 foi convertido em número de mols (mmol) utilizando a equação dos gases ideais (Equação 24).

$$P V = n R T \quad (\text{Equação 24})$$

onde P é a pressão atmosférica (1 atm); V é o volume de H_2 produzido (L); n é o número de mol de hidrogênio; R é a constante universal de um gás ideal (0,082 atm L/K mol); e T é a temperatura da fermentação (308 K).

4.4. Construção e operação da Célula a Combustível Microbiana (CCM)

A CCM foi preparada e operada no Laboratório de Eletrocatalise e Eletroquímica Ambiental do Departamento de Química da FFCLRP/USP, com auxílio da Profa. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade.

A CCM foi construída em um cilindro de vidro dividido ao meio por uma membrana trocadora de prótons (Nafion[®] 117, DuPont, EUA). Esta membrana foi prensada a quente com um tecido de carbono de 15 cm², do tipo camada difusora (HT1400W, ELAT[®] GDL-BASF) com 20% de platina (A6 ELAT[®]) (AQUINO-NETO et al., 2011) para constituir o cátodo. O cátodo era aberto ao ar, ou seja, o O_2 foi o acceptor final de elétrons.

O bioânodo da CCM foi formado pelo mesmo tecido de carbono do cátodo de 4 cm², porém sem a platina, pois o catalisador foram os microrganismos. O ânodo foi ligado a um potenciostato por meio de um fio de platina. A Figura 12 mostra a arquitetura desse aparato experimental.

Figura 12. Esquema da célula a combustível microbiana.

Ao compartimento anódico de 19 mL foi adicionado 6 mL de lodo, contendo 19,1 g/L de sólidos totais voláteis (aproximadamente 45% (v/v)) e 7 mL de meio de cultura LOVLEY; PHILLIPS (1988). Antes de iniciar a medida do potencial, foi promovido o crescimento dos microrganismos no tecido de carbono do ânodo pela aplicação de uma corrente de 660 μ A por 7 dias na CCM, permanecendo ligada a um potenciostato (EG&G Princeton Applied Research, 273A, EUA). Após o período de crescimento, o lodo em suspensão, ou seja, não aderido ao tecido de carbono, foi removido do compartimento anódico. O compartimento anódico foi alimentado com novo meio de cultura e borbulhado gás argônio por 5 min para garantir a ausência de O₂. A CCM foi operada por mais 7 dias com a aplicação da mesma corrente para o acompanhamento do potencial. Esse procedimento foi realizado em duplicata para cada substrato, ou seja, com ácido acético, butírico, láctico, a mistura destes ácidos e com o efluente da fermentação.

Além disso, nas mesmas condições descritas acima foi operada uma CCM contendo todos os elementos da CCM, exceto os microrganismos, ou seja, uma CCM controle. O valor de potencial obtido na CCM controle foi descontado do potencial da

CCM com os microrganismos, a fim de se conhecer o real valor de potência gerado pela oxidação bioquímica do substrato pelos microrganismos.

4.4.1. Parâmetros eletroquímicos

A corrente externa de 660 μA , na qual foi operada a CCM, foi definida em um teste preliminar após o crescimento do biofilme. Para isso, o biofilme neste experimento preliminar foi crescido com o auxílio de um multímetro e uma resistência externa de 1000 Ω . Desse modo, após o crescimento, foi feita uma varredura aplicando-se diferentes valores de corrente e medido os potenciais através de um potenciostato. Desse modo, a corrente que forneceu o maior valor de potencial foi a escolhida para operar a CCM.

A diferença de potencial (ddp) gerada na CCM em função do tempo foi medida com o auxílio de um potenciostato (EG&G Princeton Applied Research, 273A, EUA). Estes resultados permitiram calcular a densidade de potência da CCM, de acordo com a Equação 25.

$$P = \frac{I \times U}{A} \quad (\text{Equação 25})$$

onde P (W/m^2) é a densidade de potência da CCM; i (Ampère) é a corrente aplicada na CCM; U (Volt) é o potencial da CCM medido pelo potenciostato; e, A (m^2) é a área geométrica do ânodo.

A Eficiência Coulômbica (EC(%)), ou seja, a porcentagem de substrato consumido pelos microrganismos que convertida em energia elétrica, foi determinada pelo cálculo da quantidade de carga elétrica, em coulombs, da CCM (Equações 26 e 27).

$$Q = i \times t \quad (\text{Equação 26})$$

onde Q (coulombs) é a quantidade de carga elétrica da CCM; i (Ampère) é a corrente aplicada na CCM; e, t (segundos) é o tempo de operação da CCM.

A partir disso, é possível encontrar a quantidade de mol da carga da CCM, através da constante de Faraday ($1F = 96485 \text{ C/mol}$). Dessa forma, é possível calcular a EC da CCM pelo consumo de cada substrato, de acordo com a Equação 27.

$$EC (\%) = \left(\frac{Q/F}{S/MM} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 27})$$

onde EC é a eficiência coulômbica (%); Q é a quantidade de carga elétrica da CCM (C); F é a constante de Faraday (C/mol); S é a quantidade de substrato consumido no ânodo (g/L); e, MM é a massa molar do substrato utilizado (g/mol).

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Determinação dos sólidos voláteis e totais

A análise de sólidos voláteis (SV) e sólidos totais (ST) do lodo utilizado como inóculo na CCM foi determinada por gravimetria e a secagem de filtros de papel através de um forno micro-ondas durante 15 minutos na potência de 180 W. A concentração de sólidos totais foi obtida pela diferença de massa do papel filtro após a filtração e antes da filtração. Já para a determinação dos sólidos totais voláteis, utilizou-se a queima da biomassa em mufla a 600°C por 15 minutos, segundo metodologia descrita por (APHA, 2005).

4.5.2. Determinação dos ácidos orgânicos da produção fermentativa de H₂

Inicialmente, nos ensaios que visavam a avaliação dos meios de cultura, a determinação da concentração dos principais subprodutos solúveis formados pelo *C. beijerinckii* Br21 durante a fermentação foi realizada por meio de cromatografia em fase gasosa (CG) (Agilent 7980A), equipado com detector de ionização por chama (FID) e amostrador automático GC Sampler 80 (Agilent). A técnica *headspace* de preparo e introdução de amostra foi utilizada para isolamento dos analitos da matriz. Foi empregada uma coluna Carbowax de 30 metros, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme (OV). Detector e injetor foram mantidos a 300°C e 220°C, respectivamente. As amostras foram introduzidas no modo de injeção *split*, com uma taxa de 10:1 e o fluxo do gás de arraste foi ajustado para 1 mL/min. Foi empregado o seguinte controle de temperatura do forno: 40°C por 2 minutos, indo até 50°C a uma taxa de 10°C/min. Após, a temperatura final aumenta até 240°C a uma taxa de 35°C/min (mantendo-se por 1 minuto), totalizando 9,4 minutos de corrida. Os fluxos de gases do detector, H₂ e ar sintético, foram de 40 e 400 mL/min, respectivamente e 5 mL/min para o N₂.

Amostras de 500 μL do meio de fermentação foram colocadas em frascos com capacidade de 20 mL, vedados com tampas magnéticas e septo de PTFE cobertos internamente de *teflon*. Isobutanol na concentração final de 1 mg/mL foi adicionado como padrão interno, juntamente com as amostras a serem analisadas. Os frascos foram incubados a 85°C por 10 minutos com agitação de 500 rpm. Após este período, um volume de 400 μL foi injetado no cromatógrafo para ser analisado, com a temperatura da seringa de 85°C. Entre uma amostra e outra, um fluxo de N_2 por 70 segundos foi passado pela seringa para a sua limpeza.

Alternativamente, para quantificar os subprodutos solúveis oriundos da fermentação nos ensaios com as modificações do meio P2, as amostras foram analisadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE, ou HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (LC-20AT, Shimadzu, Japão), de acordo com adaptações nas metodologias descritas por KUMAR; SAINI; GAYEN (2014) e BELLIDO et al. (2015). Com esta metodologia, também foi possível quantificar o ácido láctico e a glicose, os quais não são detectados pela técnica do *headspace* em cromatografia gasosa devido aos compostos não serem voláteis. Foi utilizada coluna Aminex HPX-87H (7,8 mm x 300 mm) com temperatura controlada em 60°C, sob condições isocráticas. A fase móvel consistiu de H_2SO_4 0,005 mol/L com o fluxo de 0,6 mL/min (60 Kgf/cm²). O detector utilizado foi o RID (índice de refração) e a aquisição e o tratamento dos dados foram realizados pelo software LabSolutions.

4.5.3. Análise e composição do gás da produção fermentativa de H_2

As análises da composição de gás nos ensaios de fermentação foram realizadas em cromatógrafo a gás (CG 2014, Shimadzu, Japão) equipado com detector de condutividade térmica (DCT). A coluna empacotada utilizada foi a peneira molecular 5A (2,0 m x 4,7 mm), sendo o gás de arraste argônio numa vazão de 30 mL/min. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram de 80, 50 e 100°C, respectivamente. Uma alíquota do *headspace* foi injetada no cromatógrafo através de uma seringa *gas tight*.

4.5.4. Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada através do kit (Labtest) da glicose oxidase (GOX) e quantificado por espectrofotômetro em comprimento de onda a 505 nm, através de uma curva padrão previamente preparada com solução de glicose.

Alternativamente, o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi empregado para a determinação da concentração de glicose. Esse método foi feito pela reação de 0,75 mL da amostra com 1,5 mL do reagente de DNS a 100°C durante 5 minutos. Após esse período, as amostras foram submetidas a um banho de gelo e adicionados 10 mL de água deionizada, onde foram medidas as absorbâncias a 540 nm em um espectrofotômetro (MILLER, 1959).

Além desses métodos, a análise da concentração de açúcar também foi efetuada por CLAE, de acordo com parâmetros e condições expostos no item 4.5.2.

4.5.5. Quantificação da concentração celular

O crescimento celular foi monitorado durante a fermentação através da medida de densidade ótica a 600 nm (DO_{600}), utilizando um espectrofotômetro (BEL Engineering – UV-M51), o qual afere a turbidez da solução de células.

Para se obter os dados de concentração celular em massa seca, uma correlação entre valores de densidade ótica de uma suspensão de célula, e a massa celular seca foi obtida. Para a construção da correlação foram realizadas diferentes diluições de um cultivo líquido de bactéria e realizada a medida da DO_{600} . A massa seca foi medida centrifugando-se (centrífuga HITACHI CF16RXII) 50 mL de cada uma das diluições, em tubos Falcon®, a 10000 rpm por 30 minutos e colocando em estufa a 105°C por 4 horas. A diferença entre as massas dos tubos vazio e após a secagem é a quantidade de massa seca de células em 50 mL. Com os resultados foi traçado um gráfico relacionando a DO_{600} com a massa celular seca (mg/L), com o qual obteve-se uma equação linear utilizada na conversão dos dados de DO_{600} em a massa celular seca.

4.6. Análise da morfologia do biofilme formado no ânodo por microscopia

A fim de conhecer a estrutura do biofilme formado no tecido de carbono do ânodo foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do biofilme, após a operação

da CCM com a mistura dos ácidos orgânicos sintéticos e com o efluente gerado da produção fermentativa de H_2 . Para realização das microfotografias por MEV, as amostras foram preparadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Esse preparo consistiu numa lavagem com tampão PBS (4°C) e fixadas em 2% de glutaraldeído (Ladd Research Industries, Burlington, VT) durante 3 horas à 4°C e foram colocadas em lâminas de 12 mm de diâmetro revestidas com Biobond (Ciências da Microscopia Eletrônica, Hatfield, PA). As amostras foram fixadas novamente utilizando solução 1% OsO_4 (EM Sciences) durante 2 horas, lavadas em água Mili-Q e incubadas com uma solução saturada de tiocarbohidrazida (EM Sciences), em seguida lavadas novamente com solução de 1% de OsO_4 . As amostras foram desidratadas utilizando um gradiente de água/etanol e, então secas até o ponto crítico para depois serem fixadas sobre porta-amostras (*stubs*) de alumínio (LIU; LOGAN, 2004; XU; LIU, 2011).

Após isso, as amostras foram revestidas com ouro por meio de pulverização catódica em um equipamento Bal-Tec mod. SCD 050 e, sequencialmente, examinadas em um microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss mod. EVO 50 no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

4.7. Quantificação da comunidade bacteriana por PCR em tempo real

As análises de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

As técnicas moleculares tinham o objetivo de caracterizar a diversidade bacteriana do inóculo da CCM, porém, até o presente momento apenas os resultados das análises de quantificação de bactérias por *Quantitative Polymerase Chain Reaction* – qPCR estão concluídas. Essa técnica se baseia na utilização de marcadores fluorescentes nas reações de PCR para detectar a atividade exonuclease da polimerase. O marcador fluorescente, como por exemplo o SYBR Green, quando excitado, se intercala à dupla fita de DNA e emite um sinal que é assimilado por um aparelho bastante sensível e pode ser quantificado e utilizado para determinar a amplificação presente no momento da reação. É possível também detectar o ciclo exato da amplificação alvo, o qual é chamado de C_t (limiar do ciclo de detecção – *cycle threshold*). Esses valores são inversamente proporcionais à

abundância de cópias e são utilizados para estimar a quantidade de DNA presente na amostra inicial (BUSTIN, 2005; ANDREOTE, 2007)

Para quantificar a comunidade bacteriana foram utilizadas as seguintes amostras de microrganismos do compartimento anódico: 1) inóculo (lodo); 2) biofilme após a operação da CCM com o ácido acético; 3) biofilme após a operação da CCM com o ácido butírico; 4) biofilme após a operação da CCM com o ácido lático; 5) biofilme após a operação da CCM com a mistura sintética dos ácidos; 6) biofilme após a operação da CCM com o efluente da fermentação de H₂. O biofilme crescido nos tecidos de carbono (ânodo) foram raspados, lavados com tampão PBS 10X, centrifugadas a 8981g/5min e armazenados a -18° C até o momento das análises.

A análise de qPCR ou PCR em tempo real da região 16S rRNA foi usada para quantificar as comunidades bacterianas totais nas amostras de lodo inicial e nos biofilmes formados durante a operação da CCM.

Uma quantidade conhecida do biofilme raspado foi pesada para extrair o DNA genômico dos microrganismos, utilizando o kit comercial de extração PowerSoil® DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O resultado da extração de DNA foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE 1x (400 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA). Foi aplicado 1 µL do DNA extraído e utilizado como padrão molecular o GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas Life Sciences®) e como corante GelRed™ (0,5 µg/mL) para visualização em transluminador sob luz ultravioleta (DNR – Bio Imaging Systems/MiniBis Pro). As amostras foram submetidas a um campo eletroforético de 80 volts por aproximadamente 40 minutos.

As reações de qPCR foram realizadas com auxílio do equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), utilizando o marcador fluorescente SYBR-Green® Real-Time PCR Mix (Applied Biosystems®).

As reações de qPCR foram realizadas em 20 µL contendo 1 µL do DNA molde, 10 µL do SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems®) e 0,01 pM de cada oligonucleotídeo. Os *primers* utilizados para as amplificações do gene 16S rRNA de bactérias foram o P1 (5' –CCCTACGGGAGGCAGCAG– 3') e P2 (5' –ATTACCGCGGCTGCTGG– 3') (MUYZER; WAAL; UITIERLINDEN, 1993). Para certificar de que não houve contaminação externa, foram realizados controles negativos, ou seja, com a ausência de DNA. Além disso, para monitorar a pureza dos produtos amplificados, curvas de *melting* também foram adicionadas. As condições utilizadas no

PCR foi uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de amplificação de 27 segundos a 95°C; 60 segundos a 62°C e 30 segundos a 72°C (MOSONI et al., 2007).

Para a análise dos resultados foi utilizada uma curva padrão da região 16S rRNA em diluições seriadas (de 10^{-1} a 10^{-15}), com a qual foi possível correlacionar os dados obtidos nas amostras de lodo (valor CT) com os valores da curva. Dessa forma, foi possível determinar o número de cópias do gene 16S por grama de lodo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio cinéticos de fermentação de glicose pelo *C. beijerinckii* Br21

Diferentes meios de cultura foram utilizados para a fermentação visando o crescimento do *Clostridium* e consequentemente a produção de ácidos orgânicos, uma vez que a fase acidogênica ocorre durante a fase logarítmica de crescimento do microrganismo.

Na Figura 13 estão apresentados os resultados da concentração celular do *C. beijerinckii* Br21 em função do tempo. As condições nutricionais do meio CGM promoveram a maior concentração celular, seguido do AnS e RCM, apresentando $X_{máx}$ de 2825,7, 1918,4 e 1603,9 mg/L, respectivamente, ao final dos ensaios (100 horas). Os meios TYA e P2 promoveram a menor concentração celular, cerca de 777,8 e 543,0 mg/L, em 17 e 26 horas, respectivamente.

Comparando-se a composição dos meios de cultivo apresentadas na Tabela 5 (item 4.2 – Materiais e Métodos), parece que a adição da L-asparagina influenciou positivamente no crescimento do microrganismo no meio CGM. Além disso, concentrações mais elevadas de extrato de levedura (5,0 g/L), presentes no meio CGM e AnS, também auxiliam o desenvolvimento do *C. beijerinckii*.

Nas curvas de crescimento (Figura 13) pode-se verificar que a fase logarítmica, ou seja, a fase acidogênica do *Clostridium* ocorreu entre 13 e 40 horas. Após este período, a concentração celular manteve-se aproximadamente constante, evidenciando a fase estacionária de crescimento. Nesta fase de desenvolvimento do *Clostridium* a formação de ácidos acético e butírico cessa e, supostamente, ocorreria a reassimilação dos mesmos para a formação de solventes (acetona, butanol e etanol), caracterizando a solventogênese (JOHNSON; PETERSON; FRED, 1931; KARIMI et al., 2015).

Figura 13. Curvas de crescimento celular do *C. beijerinckii* Br21 em diferentes meios de cultura.

Na Figura 14 estão apresentados os resultados da concentração celular em função do tempo, bem como o ajuste sigmoidal do crescimento celular do *C. beijerinckii* Br21 nos diferentes meios de cultura. A partir dos resultados de concentração celular em função do tempo e dos ajustes sigmoidais das Figuras 14A (à esquerda) foram calculadas as velocidades específicas de crescimento do *C. beijerinckii* Br21, representadas nas Figuras 14B (μ – à direita).

Figura 14. Curvas de crescimento do *C. beijerinckii* Br21 com os respectivos ajustes sigmoidais e pH (A) e velocidades específicas de crescimento celular (μ) (B) em diferentes meios de cultura.

As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) do *C. beijerinckii* Br21 compreenderam uma faixa de 0,19 e 0,43 h⁻¹, nos meios de cultura avaliados. A $\mu_{\text{máx}}$ do *C. beijerinckii* Br21 em meio P2 e CGM foi a mais elevada (0,43 h⁻¹). O meio CGM apresenta maior concentração de extrato de levedura e presença de asparagina. Entretanto, em meio mais simples como o P2, a $\mu_{\text{máx}}$ do microrganismo também foi de 0,43 h⁻¹.

As $\mu_{\text{máx}}$ observadas para o *C. beijerinckii* Br21 encontram-se na mesma ordem de grandeza das relatadas na literatura para o gênero *Clostridium*. Por exemplo, JIANG et al. (2014) obtiveram $\mu_{\text{máx}}$ para o *C. beijerinckii* IB4 de 0,13 h⁻¹, em crescimento em meio de cultura P2 modificado com água de maceração de milho e acetato de amônio como fontes de nitrogênio, e, glicose (60 g/L) como fonte de carbono. O estudo avaliou o controle de pH durante os ensaios fermentativos e concluiu que fermentações conduzidas a pH mais elevados (5,5 e 6,0) levam a um maior crescimento celular durante a acidogênese. Neste trabalho o pH (Figura 14 A) variou de 6,5 a próximo a 4 nos ensaios com todos os meios de cultura, característico da fase acidogênica do *Clostridium*. Já o *C. acetobutylicum* CICC 8012 apresentou velocidade de crescimento de 0,35 h⁻¹ em meio P2 modificado com acetato de amônio, tiamina e uma maior quantidade de extrato de levedura (3 g/L) e 60 g/L de glicose (YAO et al., 2016).

A Figura 15 (A-E) apresenta a concentração dos subprodutos solúveis de fermentação no início, no meio (final da fase logarítmica) e ao final dos ensaios de fermentação, utilizando os diferentes meios de cultura. De uma maneira geral, em todos os meios de cultura foi observada a presença de ácido acético e butírico, produtos da fase acidogênica do *Clostridium*, além do etanol. Deve-se esclarecer que as análises dos produtos da fermentação nesta fase do trabalho foram realizadas por CG e, portanto, o ácido láctico não pôde ser quantificado.

As concentrações dos ácidos orgânicos variaram entre o limite de detecção e 0,6 g/L para o ácido acético e entre o limite de detecção e 4,2 g/L para o ácido butírico, em todos os meios de cultura ao final da fermentação. Estas concentrações são maiores do que as descritas por (QI et al., 2017) e que obtiveram 1 g/L de cada ácido ao final da fermentação, utilizando 50 g/L de uma mistura de glicose e xilose (1:1). JIANG et al. (2014b) também observaram concentrações dos ácidos acético e butírico em torno de 1,5 g/L e 1,6 g/L, respectivamente.

Figura 15. Concentração dos produtos em diferentes tempos da fermentação de glicose pelo *C. beijerinckii* Br21. A) meio RCM; B) meio TYA; C) meio AnS; D) meio P2 e E) meio CGM.

Na Tabela 8 estão sumarizados alguns parâmetros cinéticos dos ensaios de fermentação com os diferentes meios de cultura, tais como a fase lag, o $\mu_{\text{máx}}$, o $X_{\text{máx}}$, o consumo de glicose, o rendimento celular ($Y_{x/s}$) e o rendimento ou fator de conversão de glicose em ácidos (a), ou seja, o $Y_{a/s}$.

A fase lag, ou seja, o tempo de adaptação do microrganismo para entrar na fase log, em todos os meios estudados, variou de 11 a 15 horas.

Foi observado um baixo consumo de glicose em todos os meios, que continham inicialmente 30 g/L de glicose, variando de 1,5 g/L no meio TYA, para 16,4 g/L no meio AnS (Tabela 8). Provavelmente, o baixo consumo de glicose se deve à rápida produção de ácidos, com consequente decréscimo do pH do meio, diminuindo o metabolismo do microrganismo.

A concentração dos ácidos ao final da fermentação depende, obviamente, da quantidade de substrato fermentado e, portanto, é importante observar o fator de conversão da glicose consumida em ácidos orgânicos (rendimento), ou seja, o $Y_{a/s}$ (Tabela 8). Os meios que apresentaram o maior rendimento em ácidos em função da glicose consumida foram os meios RCM e TYA com 0,46 e 0,39 mg ácidos/mg glicose, respectivamente.

As variáveis X (célula) e S (substrato) também podem ser correlacionadas pelos fatores de conversão, o $Y_{x/s}$. Na Tabela 8, pode-se verificar que o maior fator de conversão de substrato em célula foi obtido no meio RCM, 0,53 mgX/mgS. Este valor pode ser considerado elevado, se comparado com os estudos de RAGANATI (2014) que obteve rendimento de célula por substrato consumido de 0,11 mgX/mgS. Quanto maior o $Y_{x/s}$, mais substrato é utilizado para a produção de célula.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos das fermentações em diferentes meios de cultura

Meios	$X_{m\acute{a}x}$ (mg/L)	Lag fase (h)	Glicose consumida (g/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	$Y_{a/s}$ (mgA/mgS)	$Y_{x/s}$ (mgX/mgS)
RCM	1603,9	15	3,69	0,19	0,46	0,53
TYA	77,8	11	1,52	0,20	0,39	0,38
AnS	1918,4	11	16,4	0,39	0,29	0,12
P2	543,0	15	3,70	0,43	0,11	0,13
CGM	2825,7	15	9,11	0,43	0,17	0,28

Com o objetivo de aumentar a produção de ácidos pela cepa de *C. beijerinckii* Br21, foram realizados ensaios fermentativos variando-se a composição do meio P2,

conforme Tabela 6 (Materiais e Métodos). O meio P2 foi escolhido, pois é um dos mais citados na literatura para o crescimento de *Clostridium* (HAN et al., 2013; KUDAHETTIGE-NILSSON et al., 2015; MOON et al., 2015), mesmo que ele não tenha proporcionado o maior crescimento do microrganismo.

Dentre as alterações promovidas no meio P2, aumentou-se a concentração do extrato de levedura, incluiu-se cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, adicionou-se NaCl e CaCl₂ e foi aumentada a concentração da fonte de carbono (glicose) (Tabela 6, Materiais e Métodos). No meio P2 mod-1, a concentração de extrato de levedura foi aumentada de 1 g/L para 6 g/L e NaCl (1 g/L) e CaCl₂ (0,2 g/L) foram adicionados ao meio. Ao meio P2 mod-2, além dos compostos anteriores, incluiu-se NH₄Cl (2 g/L). No meio P2 mod-3 fez-se todas as modificações anteriores, exceto a adição de NH₄Cl, mas a concentração de glicose foi aumentada de 30 para 60 g/L.

Tais modificações foram motivadas por estudos anteriores, como o de RAGANATI et al. (2015) que compararam quatro tipos e/ou combinações de fontes de nitrogênio com resultado positivo na fermentação. Os autores concluíram que não houve fermentação quando utilizado NH₄Cl e NaNO₃ separadamente. Entretanto, extrato de levedura e extrato de levedura combinado com NH₄Cl foram essenciais para a fermentação pelo *C. acetobutylicum* DSM 792.

Outro estudo avaliou diferentes concentrações de extrato de levedura no crescimento celular do *C. acetobutylicum*, bem como na produção de ABE (MECHMECH et al., 2015). Os resultados indicaram que o crescimento do microrganismo e a produção de ácido butírico, precursor do butanol, foram maiores aumentando as concentrações de extrato de levedura.

Alguns metais podem auxiliar no desempenho da fermentação, tais como o cálcio. Esses suplementos são adicionados ao meio de cultura com o objetivo de aumentar o consumo de açúcar e estimular a fase solventogênica do *Clostridium* (HAN et al., 2013). O cálcio promove esses efeitos devido a maior expressão de proteínas, tais como a butiraldeído desidrogenase e a butanol desidrogenase, em espécies de *Clostridium* (LI; YAN; HE, 2015). O NaCl foi incluído, pois em vários outros meios de cultura para o cultivo do *Clostridium*, tais como o AnS, CGM e RCM esse composto é utilizado (WIESENBERN et al., 1988; AL-SHORGANI et al., 2016).

A Figura 16 mostra o crescimento celular do *C. beijerinckii* Br21 e os valores de pH durante a fermentação com variações do meio P2 e de seu controle (meio P2 sem

modificações). Como pode-se observar, os meios P2 mod-1 e mod-2 foram os que mais favoreceram o crescimento do microrganismo, comparado com o controle. Nestes meios foi aumentada a concentração da fonte de nitrogênio, o extrato de levedura (P2 mod-1), e a combinação do extrato de levedura e o NH_4Cl (P2 mod-2). No meio P2-mod3, além do extrato de levedura aumentou-se a concentração de glicose para 60 g/L, não sendo observado o efeito de aumento do crescimento.

Figura 16. Crescimento celular e variação do pH durante a fermentação com o *C. beijerinckii* Br21 no meio P2, com diferentes modificações.

As Figuras 17A a 17D apresentam a concentração dos produtos de fermentação da glicose pelo *C. beijerinckii* Br21 em meio P2 e suas modificações. Como pode-se observar, as alterações efetuadas na composição do meio P2 surtiram efeitos com relação à produção de ácidos orgânicos.

O aumento da concentração de extrato de levedura, nos meios P2 mod-1, mod-2 e mod-3, mostrou que a biossíntese do ácido láctico foi favorecida. Em estudo realizado por MECHMECH et al., (2015) o aumento da concentração do extrato de levedura promoveu um incremento no consumo de substrato (xilose) pelo *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Além disso, os outros componentes adicionados aos meios, tais como o NH_4Cl , CaCl_2 e NaCl influenciaram positivamente na produção dos ácidos acético e butírico.

Entretanto, o aumento da concentração de glicose, no meio P2 mod-3, não se mostrou significativamente diferente dos outros.

Um fator importante para o consumo de substrato é o pH do meio fermentativo. Como o pH diminuiu muito rapidamente ($4,3 \pm 0,1$ em 25 horas para todos os meios P2), o metabolismo do microrganismo diminuiu e o consumo de glicose cessou (9,7 g/L para o controle; 18,6 g/L para o mod-1; 17,9 g/L para o mod-2 e 17,9 g/L para o mod-3).

Figura 17. Produtos da fermentação do *C. beijerinckii* Br21 nas diferentes composições do meio P2. A – controle; B – P2 mod-1; C – P2 mod-2; D – P2 mod-3

Na Tabela 9 pode-se observar alguns parâmetros cinéticos das fermentações realizadas nas diferentes modificações do meio P2, tais como o $X_{máx}$, a produtividade em células, a glicose consumida e os rendimentos celulares ($Y_{x/s}$) e em ácidos ($Y_{a/s}$).

Embora baixo, com relação a concentração inicial de glicose, o consumo de substrato aumentou conforme as modificações efetuadas no meio (passou de 9,7 no meio

controle para aproximadamente 18 g/L nas modificações). Através desses dados, foi possível observar que o meio P2 mod-2 apresentou maiores valores de produtividade celular (14,2 mgX/Lh) e de rendimento em ácidos (0,34 mga/mgS) em função da glicose consumida.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos das fermentações em meios P2 modificado

Meios	$X_{\text{máx}}$ (mg/L)	Produtividade (mgX/Lh)	Glicose consumida (g/L)	$Y_{a/s}$ (mga/mgS)	$Y_{x/s}$ (mgX/mgS)
P2	700,4	7,0	9,7	0,24	0,07
P2 mod-1	850,0	12,9	18,6	0,34	0,04
P2 mod-2	937,3	14,2	17,9	0,34	0,05
P2 mod-3	699,0	10,6	17,9	0,33	0,04

A Figura 18 apresenta uma comparação da concentração dos ácidos formados nos diferentes meios de cultura pelo *C. beijerinckii* Br21. Devido à diferença entre os métodos analíticos utilizados, somente nas modificações do meio P2 foi possível quantificar o ácido lático por CLAE. Dessa forma, o meio P2 mod-2 foi escolhido para dar continuidade ao trabalho, tanto por apresentar maiores rendimentos em célula quanto em ácido ($Y_{x/s}$ e $Y_{a/s}$, respectivamente).

Figura 18. Concentração de ácidos orgânicos produzidos pela fermentação de glicose nos diferentes meios de cultura.

5.2. Ensaios cinéticos de produção de H₂

Tendo em vista os resultados anteriores, onde as modificações realizadas no meio P2 favoreceram a acidogênese, optou-se por explorar a fase acidogênica do *Clostridium* pela quantificação, tanto os produtos da fermentação solúveis em água, especialmente os ácidos orgânicos, como o principal produto gasoso de interesse, o H₂.

A Figura 19A mostra a cinética de crescimento do microrganismo durante o ensaio fermentativo com o *C. beijerinckii* Br21, bem como a variação do pH do meio com o tempo (Figura 19B). Como se pode observar os 4 experimentos, realizados na mesma condição (cada um em triplicata), foi possível traçar um perfil de crescimento celular do microrganismo em função do tempo. Após a fase de crescimento exponencial do *C. beijerinckii* Br21, onde o microrganismo consumiu a glicose para se multiplicar e gerar seus produtos, a média de concentração celular ficou em torno de 808 ± 26 mg/L. Em estudos semelhantes, porém com outra cepa de *C. beijerinckii*, EZEJI et al. (2007) e ZHAO et al. (2011) relataram uma concentração celular máxima de 2340 e 1060 mg/L de células, utilizando os meios P2 e PYG (*Peptone-yeast-glucose medium*), respectivamente.

Com o objetivo de aumentar o consumo do substrato e, consequentemente, produzir mais hidrogênio e ácidos orgânicos o pH do meio fermentativo P2-mod-2 foi controlado. Na Figura 19B pode-se verificar, através dos asteriscos, que quando a fermentação atingia valor de pH próximo a 5,0, NaOH era adicionado para que o metabolismo do microrganismo não diminuísse.

Figura 19. Curva de crescimento celular do *C. beijerinckii* Br21 (A) e variação do pH (B) em função do tempo nos ensaios fermentativos com meio P2 mod-2.

Desse modo, através da Figura 20, pode-se observar que a produção de H_2 é reflexo da concentração celular, ou seja, quanto maior o crescimento do *C. beijerinckii* Br21 maior foi a produção do gás. Além disso, a produção de H_2 a partir da glicose pelo *C. beijerinckii* Br21 é predominantemente pela via do ácido butírico que forma 2 mols de H_2 por mol de glicose, *versus* 4 mols de H_2 por mol de glicose pela via do ácido acético, conforme observado nos rendimentos de H_2 dados na Tabela 9.

Figura 20. Volume de H₂ gerado em função do tempo nos ensaios fermentativos.

A partir dos ensaios de fermentação foi possível estimar os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 10. A partir desses resultados, pode-se observar que a fase lag, ou seja, o tempo em que o microrganismo leva para o início da produção de H₂ foi de $13,7 \pm 2,6$ horas. A média de velocidade de produção de H₂ (R_m) foi de $10,8 \pm 1,4$ mL/h. Entretanto, NASR (2017) utilizando uma cepa de *C. beijerinckii* com glicose como substrato relataram parâmetros cinéticos maiores que os encontrados neste trabalho, tais como R_m de 34,2 mL H₂/h com uma fase lag de 19,5 h. O autor acima mencionado utilizou *C. beijerinckii* DSM 1820, isto é, o uso de uma cepa diferente, bem como as condições experimentais pode explicar a grande diferença nas velocidades de produção de H₂.

Na Tabela 10, pode-se destacar o fator de conversão de substrato em produto H₂ ($Y_{p/s}$) que teve uma média de $1,98 \pm 0,19$ mmol H₂/mmol glicose consumida. Comparando-se o rendimento máximo teórico de 4 mmol H₂/mmol glicose consumida, o valor encontrado na fermentação representa cerca de 50% de eficiência de conversão de substrato em produto. O rendimento de H₂ foi similar ao descrito por FONSECA; GUARAZZONI; REGINATTO (2016), utilizando a mesma cepa, mas galactose como fonte de carbono (2,02 mmol H₂/mmol galactose). MASSET et al. (2012) obtiveram 1,45 mmol H₂/mmol glicose quando empregaram uma cepa de *C. beijerinckii*. Entretanto,

outros estudos relataram rendimentos maiores como o de NASR et al. (2017) e GOMEZ-FLORES; NAKHLA; HAFEZ (2015), que a partir da fermentação da glicose por uma cepa de *C. beijerinckii* obtiveram um rendimento de 2,69 e 2,54 mmol H₂/mmol glicose, respectivamente.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos dos ensaios de fermentação para a produção de H₂ pelo *C. beijerinckii* Br21 com o meio P2 mod-2

Parâmetro cinético	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	médias
X_{máx} (mg/L)	766,6	798,1	837,6	830,4	808,2 ± 25,8
*Fase lag (h)	18,9	12,7	10,5	12,8	13,7 ± 2,6
*Volume máximo de H₂ (mL)	149,9	144,4	166,6	156,5	154,4 ± 7,2
*Velocidade de produção de H₂ (mL/h)	10,5	12,4	12,1	8,3	10,8 ± 1,4
Y_{p/s} mmol H₂/mmol glicose	2,32	1,78	2,00	1,80	1,98 ± 0,19
Y_{x/s} mmol X/mmole glicose	0,10	0,07	0,08	0,08	0,08 ± 0,01
Y_{a/s} mmol a/mmole glicose	0,33	0,38	0,37	0,35	0,36 ± 0,02

*Estimados pelo ajuste do modelo de Gompertz modificado aos dados experimentais.

A partir da Figura 21 pode-se confirmar o favorecimento da via do ácido butírico para a produção de hidrogênio pelo *C. beijerinckii* Br21, pois é o principal subproduto das fermentações. Nos experimentos realizados, a concentração desse ácido variou de 2,0 a 3,5 g/L. NOPARAT; PRASERTSAN; O-THONG (2011) também relataram como principal metabólito solúvel o ácido butírico para diferentes cepas de *C. beijerinckii*.

Em processos fermentativos que visam a produção de H₂, sempre serão gerados subprodutos solúveis, como por exemplo o ácido butírico. Alguns autores apontam as vantagens de se recuperar o ácido butírico do meio líquido e purificá-lo para uso posterior. Este ácido apresenta interesse comercial, especialmente em indústria de alimentos como realçador de sabor da manteiga, ou ainda em outras indústrias como na química para fabricação de polímeros de butiril e nas farmacêuticas para o tratamento de doenças (LIU; YANG, 2006).

Entretanto, numa visão mais atual e com o objetivo do aproveitamento integral do substrato para a produção de energia é possível utilizar este ácido como substrato em sistema bioeletroquímicos, conforme descrito no item 2.4.

Ao menos duas abordagens eletroquímicas são possíveis para complementar a utilização dos ácidos orgânicos gerados durante a fermentação: 1) a utilização dos ácidos como substrato em uma *microbial electrolysis cell* (MEC) para a produção de mais H_2 (KADIER et al., 2016; KHAN et al., 2016), e 2) a utilização dos ácidos orgânicos para a produção direta de energia em uma CCM (CHEN et al., 2013; ELMEKAWY et al., 2015; PASUPULETI et al., 2015; CERRILLO; VIÑAS; BONMATÍ, 2017; SIVAGURUNATHAN et al., 2017), a abordagem escolhida para este trabalho.

Figura 21. Concentração dos subprodutos solúveis dos ensaios de fermentação para a produção biológica de H_2 em quatro experimentos distintos.

5.3. Utilização dos subprodutos da fermentação da produção biológica de H₂ para a geração de energia em uma célula a combustível microbiana

A Figura 22 mostra a potência gerada pelas CCMs em função do tempo, após estabelecido o crescimento do biofilme, utilizando os ácidos acético, butírico, láctico, a mistura dos ácidos e o efluente da fermentação de produção de H₂ como substratos. A densidade de potência da CCM alimentada com acetato (CCM-HAc) apresentou o maior valor, atingindo uma média de 1,2 W/m². Seguido da CCM alimentada com a mistura de ácidos (CCM-Mis), que gerou 0,73 W/m². A alimentação com lactato (CCM-HLac) atingiu 0,62 W/m², similar à densidade de potência obtida pela alimentação com o efluente proveniente da produção de H₂ (CCM-Eflu), uma média de 0,6 W/m². A menor densidade de potência foi observada quando o butirato foi utilizado para alimentar a CCM (CCM-HBut) com 0,5 W/m².

Os valores de densidade de potência obtidos para o efluente da fermentação de H₂ são promissores em comparação com os encontrados na literatura. CHOOKAEW; PRASERTSAN; REN (2014) reportaram valores de 0,092 W/m² em uma CCM de duas câmaras, tendo como inóculo lodo anaeróbio de ETE pré-tratado termicamente. Esta CCM foi alimentada com os produtos da fermentação biológica de H₂ por uma cultura mista a partir do glicerol (subproduto da produção de biodiesel), com eficiência coulômbica de 14%. SCHIEVANO et al. (2016) utilizaram dois tipos de sistemas integrados: uma digestão anaeróbia + CCM (sistema 1) e uma fermentação acidogênica + digestão anaeróbia + CCM (sistema 2), os quais foram inoculados com uma cultura mista pré-tratada termicamente e o produto de cada etapa foi usado como substrato para a etapa seguinte. Em ambos os sistemas obtiveram valores próximos de potência, 0,43 e 0,48 W/m², com eficiências coulômbicas de 19 e 21% para os sistemas 1 e 2, respectivamente, em uma CCM do tipo câmara única.

Figura 22. Densidade de potência em função do tempo nas CCM alimentadas com ácidos orgânicos e o efluente da fermentação para a produção de H_2 . Os valores apresentados já foram descontados da CCM controle (sem microrganismos).

Como pode ser observado na Figura 22, o potencial gerado foi bastante estável em todos os sistemas. Mesmo após 7 dias de operação, as CCMs mantiveram os mesmos valores de potência com uma única alimentação.

Observou-se a potência gerada na CCM-Eflu valor semelhante às demais CCMs alimentadas apenas com os ácidos orgânicos, mesmo tendo a maior carga orgânica, devido a presença de glicose (0,43 g/L) residual da fermentação. Fato esse, que não foi observado por ELMEKAWY et al. (2014) os quais relataram que quanto menor a carga orgânica do efluente, maior é a energia gerada pelo sistema. Os autores investigaram concentrações de substrato que partiram com diluições de 10, 20 e 30% do efluente da fermentação a taxa de carga orgânica de 190, 380 e 570 gDQO/m³ dia, sendo que na menor carga foi observado o maior valor de potência 0,165 W/m². Conclusões semelhantes, isto é, de que baixas cargas orgânicas levam a maior quantidade de energia gerada em uma CCM, foram obtidas em estudos conduzidos por MOHANAKRISHNA; VENKATA MOHAN; SARMA (2010) para efluente oriundo da produção de H_2 . Neste trabalho, a maior complexidade do efluente da fermentação, em relação aos ácidos não afetou o desempenho da CCM, uma vez que as densidades de potência não foram muito

mais baixas em relação aos outros sistemas, exceto da CCM alimentada com acetato. A densidade de potência obtida com a alimentação com acetato ($1,2 \text{ W/m}^2$) foi bastante elevada se comparada a resultados da literatura com o mesmo substrato, como os relatados por SUN et al. (2015), KHATER et al. (2017) e LINKE et al. (2017) os quais obtiveram 0,15, 0,09 e $0,43 \text{ W/m}^2$, respectivamente.

O consumo de ácidos orgânicos, no tempo inicial e após 7 dias de operação estão apresentados na Tabela 11, bem como a eficiência coulômbica das CCMs.

Tabela 11. Consumo de substrato nas CCMs alimentadas com acetato, butirato, lactato, mistura sintética dos ácidos e efluente da fermentação, e suas respectivas eficiências coulômbicas

Sistema	Substrato inicial (g/L)	Substrato final (g/L)	Consumo (g/L)	Consumo (%)	EC (%)	Densidade de potência (W/m^2)
CCM-HAc	0,85	0,46	0,39	45,9	63,3	1,2
CCM-HBut	0,91	0,33	0,58	63,7	63,0	0,5
CCM-HLac	0,87	0,15	0,73	83,9	51,4	0,6
*CCM-Mis	0,89	0,32	0,57	64,0	--	0,7
HAc	0,29	0,16	0,13	44,8		
HBut	0,26	0,15	0,11	42,3		
HLac	0,33	0	0,33	100		
*CCM-Eflu	2,18	0,83	1,35	61,9	--	0,6
HAc	0,21	0,17	0,05	23,8		
HBut	1,37	0,66	0,71	51,8		
HLac	0,16	0	0,16	100		
Glicose	0,43	0	0,43	100		

A partir dos resultados de consumo de substrato foi possível calcular a eficiência coulômbica da CCM. Desse modo, notou-se que quando alimentada com acetato, o consumo de substrato foi menor (45,9%), mas a eficiência da CCM e a densidade de potência são maiores 63,3% e $1,2 \text{ W/m}^2$, respectivamente. A CCM-HBut teve uma eficiência coulômbica (63,0%) semelhante com a CCM-HAc, mas o consumo de substrato foi maior (63,7% e 45,9% para as CCM-HBut e CCM-HAc, respectivamente) e a potência gerada foi menor ($0,5 \text{ W/m}^2$), o que pode ser explicado pela seleção de

microrganismos mais eficientes na transferência de elétrons quando alimentada com acetato.

A eficiência coulômbica da CCM-HLac apresentou o menor valor (51,4%), dentre os substratos testados. O consumo deste substrato foi o maior (83,9%) e a potência gerada ($0,62 \text{ W/m}^2$) foi menor comparada à CCM-HAc ($1,2 \text{ W/m}^2$) e, maior quando comparada com a CCM-HBut ($0,5 \text{ W/m}^2$), ou seja, os microrganismos que compõem o biofilme utilizam o lactato preferencialmente para crescer.

De acordo com a literatura, as eficiências coulômbicas observadas neste trabalho, que variaram entre 51,4 e 63,3 % são bastante elevadas. Por exemplo, SUN; THYGESEN; MEYER (2015) e PRAMANIK; RANA (2017) obtiveram 31 e 23%, respectivamente, de eficiência coulômbica, utilizando cultura mista de microrganismos e acetato como substrato. FUTAMATA et al. (2013), utilizando lactato como fonte de carbono, obtiveram eficiências coulômbicas de 22%. Entretanto, há poucos relatos na literatura com o uso de ácido butírico para geração de energia em CCMs, e cujos valores cerca de $0,3 \text{ W/m}^2$ são inferiores aos observados neste trabalho (LIU; CHENG; LOGAN, 2005; YU et al., 2012).

O consumo de lactato foi maior quando estava na mistura dos ácidos e no efluente do que separadamente, portanto, o ácido orgânico preferencialmente consumido pelas bactérias das CCMs. Entretanto, notou-se que quando utilizado o efluente, a glicose também foi completamente consumida e, mesmo tendo maior carga orgânica, a diferença na geração de energia não foi muito significativa, de apenas 20 mW/m^2 . Portanto, a glicose e o lactato foram utilizados mais para o crescimento das bactérias, mas o acetato foi o substrato com maior aproveitamento para a geração de energia na CCM.

5.3.1. Abundância do gene 16S por qPCR

A amplificação de qPCR e a quantificação de DNA direcionado são muito úteis e freqüentemente usadas para medir o número relativo de cópias de genes em um DNA complexo e também para medir a comunidade microbiana em concentrações muito baixas (SINHA; ROY; DAS, 2016). Desse modo, o número amplificado de cópias de genes de múltiplas cópias de DNA dá a proporção máxima relativa dos microrganismos que compõem a comunidade microbiana (SARATALE et al., 2017).

Quando aplicado as amostras do lodo e dos biofilmes formado nas CCMs alimentadas com ácidos, a mistura deles e o efluente o método forneceu resultados

confiáveis, isto é, o coeficiente de correlação da curva analítica (R^2) foi de 0,995. Isso permitiu análises e comparações padronizadas entre as diferentes amostras. De acordo com a Figura 23, pode-se observar que em todas as CCMs houve crescimento de biofilme confirmado pelo maior número de cópias do gene 16S, em relação ao lodo (inóculo). Além disso, as análises de qPCR indicaram que as populações microbianas estavam presentes em maiores quantidades nas CCMs alimentadas com ácido butírico, ácido láctico e com o efluente da produção de H_2 (10^{13} cópias do gene 16S/g lodo).

Em estudos de CCMs da literatura, VILAJELIU-PONS et al. (2016) e SOTRES et al. (2016) relataram 10^6 e 10^9 cópias do gene 16S/g lodo no ânodo da célula a combustível microbiana, utilizando lodo de estações de tratamento de água e esgoto e matadouro, respectivamente. Comparado ao trabalho citado podemos concluir que nas amostras dos biofilmes analisadas houve uma elevada adesão de microrganismos, pois os valores foram acima de 10^{12} cópias do gene 16S/g lodo no ânodo da célula microbiana (Figura 23).

A abundância do gene 16S da CCM-HBut (10^{13} cópias do gene 16S/g lodo) foi maior que o sistema alimentado com acetato, embora o acetato tenha fornecido os maiores valores de potência. Provavelmente este substrato foi utilizado para o crescimento celular, não disponibilizando carga orgânica para geração de energia elétrica. Além disso, como o consumo do substrato da CCM-HBut foi maior, comparado ao consumo da CCM-HAc e a eficiência coulômbica manteve-se semelhante, mesmo não tendo atingido os mesmos valores de potência.

A abundância do gene 16S foi similar (10^{13} cópias do gene 16S/g lodo) quando alimentado com HLac em relação à CCM-HBut, ou seja, nestas CCMs houve um crescimento celular maior que a CCM-HAc. Entretanto, o crescimento maior tanto em butirato como em lactato, não representou maior densidade de potência, comparada ao CCM-HAc (Tabela 11).

Na CCM-Mis apesar da abundância do gene 16S ser menor que a da CCM-HLac, a densidade de potência gerada foi semelhante à da CCM-HLac, 0,73 e 0,62 W/m², respectivamente. Já na CCM-Eflu, a elevada concentração de ácido butírico não foi favorável na geração de maior densidade de potência, ou seja, provavelmente esse ácido foi usado pelas bactérias para crescimento celular ou transformado em os outros menores, como o acético.

Mesmo com o menor número de cópias de 16 S/g lodo na CCM-HAc, ou seja, um dos menores crescimentos celulares de biofilme, a potência gerada nesta célula foi a

maior, assim como a eficiência coulômbica. Isto indica que nesta CCM foram aderidos os microrganismos mais especializados na transferência de elétrons, ou que o acetato é o substrato preferencial das bactérias exoeletrogênicas deste biofilme.

De acordo com ESTEVEZ-CANALES et al. (2018) o acetato é o doador de elétrons preferido de *Geobacter sulfurreducens*, fato que pode ser comprovado pela alta eficiência e alta potência gerada na CCM-HAc. Entretanto, KIM et al. (2012) e KARLUVALI et al. (2015) relataram densidades de potência menores em CCMs com predominância de bactérias do gênero *Geobacter* (0,02 e 0,05 W/m², respectivamente) comparadas às densidades de potência deste trabalho. Já em um estudo realizado por LUO et al. (2016) com uma CCM alimentada com lactato foi possível observar a maior produção celular de *Shewanella oneidensis* MR-1, enquanto que quando alimentada com outro substrato, o fumarato, a bactéria foi capaz de produzir maior potência. Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho, corroboram com trabalhos da literatura, onde a diferença de substratos pode ter selecionado populações de distintos microrganismos exoeletrogênicos. Neste trabalho o acetato foi o substrato preferencial.

Figura 23. Número de cópias do gene 16S rRNA por grama de lodo nas diferentes CCMs.

5.3.2. MEV do biofilme do ânodo

Com o objetivo de analisar a morfologia do biofilme formado nos tecidos de carbono dos ânodos das CCMs foram feitas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram observados os biofilmes das CCM-Mis (Figuras 24, 25 e 26) e CCM-Eflu (Figura 27), além do controle, eletrodo sem o crescimento dos microrganismos (Figura 24A e B). No eletrodo controle foi observado a fibra do tecido de carbono e poucas deposições que parecem minerais do meio de cultura e/ou resquícios da camada difusora do eletrodo. Já na Figuras 24 C e D pode ser observado microrganismos aderidos ao tecido de carbono da CCM-Mis na forma de bastonetes com tamanhos variados.

Outros trabalhos como os de CHA et al. (2010) e BARANITHARAN et al. (2015), que utilizaram como inóculo uma cultura mista proveniente de um digestor anaeróbio de estações de tratamento de efluentes domésticos, também foram relatados microrganismos com forma de bastonete. Entretanto, nos trabalhos de KUMAR et al. (2015) e RAJESWARI et al. (2016) foram encontradas células tanto em forma de bastonetes quanto esféricas. Fato esse também observado neste trabalho nas imagens da CCM-Eflu (Figura 27).

Figura 24. Imagens de MEV do tecido de carbono inicial (A) e (B), e após 7 dias de operação quando alimentado com a mistura sintética (C) e (D).

Foi observado um biofilme mais denso nas partes mais internas do tecido de carbono (Figura 25). CHA et al. (2010) descreveram que as bactérias formam um filme mais uniforme e denso quando utilizado um eletrodo de maior porosidade, facilitando a sua aderência. Entretanto, devido ao eletrodo possuir uma camada difusora de teflon em sua superfície, a qual é hidrofóbica, os microrganismos parecem preferir o interior do eletrodo, onde são encontradas condições mais favoráveis ao desenvolvimento, tais como anaerobiose e ambiente hidrofílico.

Figura 25. Eletrodo com menor ampliação (A), ampliação ao centro do eletrodo (B), com maior quantidade de microrganismos da CCM-Mis.

Na Figura 26 foram observadas estruturas nanométricas, ligando bactérias em forma de bastonetes supondo-se que estes sejam os nanofios, um dos mecanismos responsáveis pela transferência de elétrons utilizada pelos microrganismos nessa CCM. Apesar da formação das estruturas para a transferência de elétrons, não se pode descartar a transferência de elétrons por outros mecanismos, com a possível formação de outros compostos produzidos pela própria bactéria, que podem atuar como mediadores, além da

transferência de elétrons que pode ser realizada diretamente por esses microrganismos ao eletrodo (TEED – transferência eletrônica extracelular direta).

Dessa forma, espécies de *Shewanella* são relatadas por possuírem como principal mecanismo de transferência de elétrons extracelulares a formação de nanofios. GORBY et al. (2006) publicaram que tanto bactérias do gênero *Shewanella* sp. quanto outros microrganismos são capazes de formar nanofios para uma transferência eletrônica eficiente e distribuição de energia. Além disso, PIRBADIAN et al. (2014) fizeram observações *in vivo* na formação desses nanofios em *Shewanella oneidensis* MR-1.

Entretanto, de acordo com BUSALMEN et al. (2008) e ESTEVEZ-CANALES et al. (2018), o mecanismo de transferência de elétrons em *Geobacter* sp. se faz com o auxílio de citocromos do tipo c. Por outro lado, em estudo mais recente, ALVES et al. (2016) relataram que os citocromos podem formar nanofios, os quais são uma nova classe de proteínas encontradas no genoma de várias espécies *Geobacter* e são propostas por serem responsáveis pela transferência de elétrons de longo alcance.

Figura 26. Imagem de MEV do eletrodo com o biofilme após 7 dias de operação da CCM-Mis. Formação de nanofios que atuam na transferência eletrônica extracelular, com espessura de 78,8 nm.

Na Figura 27 pode ser observada uma diversidade ainda maior de formatos de células, com a formação de um biofilme espesso. Neste biofilme, cuja alimentação da CCM foi com o efluente da fermentação, a concentração de 16S/g de lodo foi uma das maiores (10^{13} cópias do gene 16S/g lodo) entre as CCMs analisadas, o que pode ser confirmado visualmente, através da micrografia de seu biofilme.

Figura 27. Imagem de MEV do biofilme formado na CCM-Eflu.

Assim, o efluente da fermentação de H_2 , rico em ácidos orgânicos, provou ser um bom substrato para a geração de energia em CCM. Entretanto, se a via metabólica preferencial do *Clostridium*, para a produção de H_2 fosse pelo ácido acético, além do maior rendimento em H_2 , um efluente enriquecido em acetato, provavelmente,

promoveria maior densidade de potência na CCM.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho revelou uma vasta área de pesquisa a ser explorada para a obtenção de um biocombustível (H_2) pela fermentação de carboidratos e de energia pelas reações de oxirredução realizada por microrganismos.

A otimização do um meio de cultura para a produção de ácidos orgânicos foi realizada com sucesso, entretanto a via do butirato é a via metabólica preferencial do *C. beijerinckii* Br21.

Como grande parte da energia permaneceu na forma de ácidos orgânicos (ácidos acético, butírico e láctico), esses produtos da fase acidogênica do *Clostridium* foram aproveitados para alimentar o ânodo de uma CCM, visando a geração de energia via bioeletroquímica.

A CCM forneceu energia a partir da oxidação de ácidos orgânicos sintéticos e também do efluente da fermentação de H_2 . Foi observada uma boa estabilidade da CCM, sem a necessidade de alimentação, durante o período de 7 dias. A comparação entre os dados de potência com relatos da literatura não é trivial, isto pois, existem algumas diferenças experimentais encontradas em cada trabalho. No entanto, os valores de densidade de potência obtidos neste trabalho foram muito bons, em comparação com os resultados publicados em muitos dos recentes trabalhos relacionados a células a combustível microbianas.

A partir das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura foi possível identificar duas formas de bactérias (bacilo e cocos) e também a formação de nanofios, que deve ter sido uma das formas para transferir os elétrons utilizadas pelos microrganismos que compõe o biofilme.

A caracterização do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) revelou que o ácido láctico, o ácido butírico e o efluente da fermentação promoveram maior crescimento do biofilme. Entretanto, na CCM alimentada com ácido acético, a qual teve o menor crescimento do biofilme, foi obtida a maior densidade de potência ($1,2 \text{ W/m}^2$), ou seja, o ácido acético é o substrato preferencial dos microrganismos exoeletrogênicos do biofilme.

Por fim, bioenergia pôde ser produzida através de dois caminhos complementares para o aproveitamento integral de matérias primas renováveis: produção de H₂ pela fermentação e geração de energia elétrica através de uma CCM.

O presente trabalho se mostrou muito promissor haja vista a elevada densidade de potência obtida quando comparado aos diversos trabalhos que vem sido publicados na literatura a respeito de células a combustível microbianas.

7. REFERÊNCIAS

AHN, Y.; HATZELL, M. C.; ZHANG, F.; LOGAN, B. E. Different electrode configurations to optimize performance of multi-electrode microbial fuel cells for generating power or treating domestic wastewater. **Journal of Power Sources**, v. 249, p. 440–445, 2014.

AKHLAGHI, M.; BONI, M. R.; GIOANNIS, G. De; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R.; ROSSI, A.; SPIGA, D. A parametric response surface study of fermentative hydrogen production from cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 473–483, 2017.

AL-SHORGANI, N. K.; TIBIN, E.-M.; ALI, E.; HAMID, A. A.; YUSOFF, W. M. W.; KALIL, M. S. Biohydrogen production from agroindustrial wastes via *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 16, p. 11–21, 2014.

AL-SHORGANI, N. N.; HAFEZ, M.; ISA, M.; MOHTAR, W.; YUSOFF, W.; SAHAID, M.; ABDUL, A. Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* strain and characterization of its fermentation performance on agricultural wastes. **Renewable Energy**, v. 86, p. 459–465, 2016.

ALARAJ, M.; FENG, S.; ROANE, T. M.; PARK, J. Effect of power shape on energy extraction from microbial fuel cell. **Journal of Power Sources**, v. 366, p. 86–92, 2017.

ALVES, M. N.; FERNANDES, A. P.; SALGUEIRO, C. A.; PAQUETE, C. M. Unraveling the electron transfer processes of a nanowire protein from *Geobacter sulfurreducens*. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1857, n. 1, p. 7–13, 2016.

AMIN, M. M.; BINA, B.; TAHERI, E.; ZARE, M. R.; GHASEMIAN, M.; GINKEL, S. W. V; FATEHIZADEH, A. Metabolism and kinetic study of bioH₂ production by anaerobic sludge under different acid pretreatments. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 24–29, 2017.

ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 2007.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association**, v. 21st, n. Washington, DC, 2005.

AQUINO-NETO, S.; FORTI, J. C.; ZUCOLOTTO, V.; CIANCAGLINI, P.; DE ANDRADE, A. R. Development of nanostructured bioanodes containing dendrimers and dehydrogenases enzymes for application in ethanol biofuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 2922–2926, 2011.

AQUINO NETO, S.; REGINATTO, V.; DE ANDRADE, A. R. Microbial fuel cells and wastewater treatment. In: [s.l: s.n.]p. 1–30.

ASAI, Y.; MIYAHARA, M.; KOUZUMA, A.; WATANABE, K. Comparative evaluation of wastewater-treatment microbial fuel cells in terms of organics removal, waste-sludge production, and electricity generation. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 30, p. 2–8, 2017.

BARANITHARAN, E.; KHAN, M. R.; PRASAD, D. M. R.; TEO, W. F. A.; TAN, G. Y. A.; JOSE, R. Effect of biofilm formation on the performance of microbial fuel cell for the treatment of palm oil mill effluent. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 15–24, 2015.

BELLIDO, C.; INFANTE, C.; COCA, M.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Efficient acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium beijerinckii* from sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 332–338, 2015.

BIAN, B.; SHI, D.; CAI, X.; HU, M.; GUO, Q.; ZHANG, C.; WANG, Q.; XUELIANG, A.; YANG, J. 3D printed porous carbon anode for enhanced power generation in microbial fuel cell. **Nano Energy**, v. 44, p. 174–180, 2018.

BP Energy Outlook 2035. . [s.l: s.n.].

BUNDHOO, Z. M. A. Coupling dark fermentation with biochemical or bioelectrochemical systems for enhanced bio-energy production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 26667–26686, 2017.

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

BUSTIN, S. A. Real-Time PCR. **Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics**, p. 1117–1125, 2005.

CABROL, L.; MARONE, A.; TAPIA-VENEGAS, E.; STEYER, J.-P.; RUIZ-FILIPPI, G.; TRABLY, E. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 158–181, 2017.

CERRILLO, M.; VIÑAS, M.; BONMATÍ, A. Microbial fuel cells for polishing effluents of anaerobic digesters under inhibition, due to organic and nitrogen overloads. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 12, p. 2912–2920, 2017.

CHA, J.; CHOI, S.; YU, H.; KIM, H.; KIM, C. Directly applicable microbial fuel cells in aeration tank for wastewater treatment. **Bioelectrochemistry**, v. 78, p. 72–79, 2010.

CHEN, Y.; LUO, J.; YAN, Y.; FENG, L. Enhanced production of short-chain fatty acid by co-fermentation of waste activated sludge and kitchen waste under alkaline conditions and its application to microbial fuel cells. **Applied Energy**, v. 102, p. 1197–1204, 2013.

CHENG, J.; DING, L.; LIN, R.; LIU, M.; ZHOU, J.; CEN, K. Physicochemical characterization of typical municipal solid wastes for fermentative hydrogen and methane co-production. **Energy Conversion and Management**, v. 117, p. 297–304, 2016.

CHENG, J.; SU, H.; ZHOU, J.; SONG, W.; CEN, K. Hydrogen production by mixed bacteria through dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 1, p. 450–457, 2011.

CHOI, J.; AHN, Y. Enhanced bioelectricity harvesting in microbial fuel cells treating food waste leachate produced from biohydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, v. 183, p. 53–60, 2015.

CHOOKAEW, T.; PRASERTSAN, P.; REN, Z. J. Two-stage conversion of crude glycerol to energy using dark fermentation linked with microbial fuel cell or microbial electrolysis cell. **New Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 179–184, 2014.

CHOU DHURY, P.; UDAY, U. S. P.; MAHATA, N.; TIWARI, O. N.; RAY, R. N.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Performance improvement of microbial fuel cells for waste water treatment along with value addition: A review on past achievements and recent perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 372–389, 2017.

CONTE, M.; IACOB AZZI, A.; RONCHETTI, M.; VELLONE, R. Hydrogen economy for a sustainable development: state-of-the-art and technological perspectives. **Journal of Power Sources**, v. 100, p. 171–187, 2001.

DADA, O.; YUSOFF, W. M. W.; KALIL, M. S. Biohydrogen production from ricebran using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15063–15073, 2013.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26, p. 13–28, 2001.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6046–6057, 2008.

DING, L.; CHENG, J.; QIAO, D.; YUE, L.; LI, Y.; ZHOU, J.; CEN, K. Investigating hydrothermal pretreatment of food waste for two-stage fermentative hydrogen and methane co-production. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 491–499, 2017.

DING, L.; CHENG, J.; XIA, A.; JACOB, A.; VOELKLEIN, M.; MURPHY, J. D. Co-generation of biohydrogen and biomethane through two-stage batch co-fermentation of macro- and micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 224–231, 2016.

DU, Z.; LI, H.; GU, T. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 464–482, 2007.

DÜRRE, P. The Genus *Clostridium*. In: GOLDMAN, E.; GREEN, L. H. (Ed.). **Practical Handbook of Microbiology**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 339–353.

ELBESHBISHY, E.; DHAR, B. R.; NAKHLA, G.; LEE, H. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 656–668, 2017.

ELMEKAWY, A.; SRIKANTH, S.; BAJRACHARYA, S.; HEGAB, H. M.; NIGAM, P. S.; SINGH, A.; MOHAN, S. V.; PANT, D. Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): The synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment. **Food Research International**, v. 73, p. 213–225, 2015.

ELMEKAWY, A.; SRIKANTH, S.; VANBROEKHOVEN, K.; DE WEVER, H.; PANT, D. Bioelectro-catalytic valorization of dark fermentation effluents by acetate oxidizing bacteria in bioelectrochemical system (BES). **Journal of Power Sources**, v. 262, p. 183–191, 2014.

ESTEVEZ-CANALES, M.; PINTO, D.; CORADIN, T.; LABERTY-ROBERT, C.; ESTEVE-NÚÑEZ, A. Silica immobilization of *Geobacter sulfurreducens* for constructing ready-to-use artificial bioelectrodes. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 39–49, 2018.

EZEJI, T.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 1460–1469, 2007.

FONSECA, B.; GUARAZZONI, M.-E.; REGINATTO, V. Fermentative production of H₂ from different concentrations of galactose by the new isolate *Clostridium beijerinckii* Br21. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 46, p. 21109–21120, 2016.

FRANKS, A. E.; MALVANKAR, N.; NEVIN, K. P. Bacterial biofilms: the powerhouse of a microbial fuel cell. **Biofuels**, v. 1, n. 4, p. 589–604, 2010.

FUTAMATA, H.; BRETSCHGER, O.; CHEUNG, A.; KAN, J.; OWEN, R.; NEALSON, K. H. Adaptation of soil microbes during establishment of microbial fuel cell consortium fed with lactate. **Seibutsu-kogaku Kaishi**, v. 115, n. 1, p. 58–63, 2013.

GAJDA, I.; GREENMAN, J.; MELHUISE, C.; IEROPOULOS, I. Simultaneous electricity generation and microbially-assisted electrosynthesis in ceramic MFCs. **Bioelectrochemistry**, v. 104, p. 58–64, 2015.

GOMEZ-FLORES, M.; NAKHLA, G.; HAFEZ, H. Microbial kinetics of *Clostridium termitidis* on cellobiose and glucose for biohydrogen production. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1965–1971, 2015.

GOMEZ-FLORES, M.; NAKHLA, G.; HAFEZ, H. Hydrogen production and microbial kinetics of *Clostridium termitidis* in mono-culture and co-culture with *Clostridium beijerinckii* on cellulose. **AMB Express**, v. 7, n. 84, p. 1–12, 2017.

GORBY, Y. A.; YANINA, S.; MCLEAN, J. S.; ROSSO, K. M.; MOYLES, D.; DOHNALKOVA, A.; BEVERIDGE, T. J.; CHANG, I. S.; KIM, B. H.; KIM, K. S.; CULLEY, D. E.; REED, S. B.; ROMINE, M. F.; SAFFARINI, D. A.; HILL, E. A.; SHI, L.; ELIAS, D. A.; KENNEDY, D. W.; PINCHUK, G.; WATANABE, K.; ISHII, S.; LOGAN, B.; NEALSON, K. H.; FREDRICKSON, J. K. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11358–11363, 2006.

GOUD, R. K.; ARUNASRI, K.; YERUVA, D. K.; KRISHNA, K. V.; DAHIYA, S.; MOHAN, S. V. Impact of selectively enriched microbial communities on long-term fermentative biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 253–264, 2017.

GRATTIERI, M.; SHIVEL, N. D.; SIFAT, I.; BESTETTI, M.; MINTEER, S. D. Sustainable hypersaline microbial fuel cells: inexpensive recyclable polymer supports for carbon nanotube conductive paint anodes. **Chem Sus Chem**, v. 10, p. 2053–2058, 2017a.

GRATTIERI, M.; SUVIRA, M.; HASAN, K.; MINTEER, S. D. Halotolerant extremophile bacteria from the Great Salt Lake for recycling pollutants in microbial fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 356, p. 310–318, 2017b.

GUDE, V. G. Wastewater treatment in microbial fuel cells - an overview. **Journal of Cleaner Production**, v. 122, p. 287–307, 2016.

HAN, B.; UJOR, V.; LAI, L. B.; GOPALAN, V.; EZEJI, T. C. Use of proteomic analysis to elucidate the role of calcium in acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 282–293, 2013.

HAN, W.; FANG, J.; LIU, Z.; TANG, J. Techno-economic evaluation of a combined bioprocess for fermentative hydrogen production from food waste. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 107–112, 2016.

HASSAN, H.; JIN, B.; DONNER, E.; VASILEIADIS, S.; SAINT, C.; DAI, S. Microbial community and bioelectrochemical activities in MFC for degrading phenol and producing electricity: Microbial consortia could make differences. **Chemical Engineering Journal**, v. 332, p. 647–657, 2018.

HE, L.; DU, P.; CHEN, Y.; LU, H.; CHENG, X.; CHANG, B.; WANG, Z. Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 388–403, 2017.

HEIDRICH, E. S.; DOLFING, J.; WADE, M. J.; SLOAN, W. T.; QUINCE, C.; CURTIS, T. P. Temperature, inocula and substrate: Contrasting electroactive consortia, diversity and performance in microbial fuel cells. **Bioelectrochemistry**, v. 119, p. 43–50, 2018.

HOSSEINI, S. E.; WAHID, M. A.; JAMIL, M. M.; AZLI, A. A. M.; MISBAH, M. F. A review on biomass-based hydrogen production for renewable energy supply. **International Journal of Energy Research**, v. 39, p. 1597–1615, 2015.

HUANG, L.; REGAN, J. M.; QUAN, X. Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 316–323, 2011.

HUFTON, J. R.; MAYORGA, S.; SIRCAR, S. Sorption-enhanced reaction process for hydrogen production. **Ai Che Journal**, v. 45, n. 2, p. 248–256, 1999.

IEROPOULOS, I. A.; LEDEZMA, P.; STINCHCOMBE, A.; PAPA HARALABOS, G.; MELHUI SH, C.; GREENMAN, J. Waste to real energy: the first MFC powered mobile phone. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, p. 15312–15316, 2013.

International Energy Agency. . [s.l: s.n.].

JABEEN, G.; FAROOQ, R. Microbial fuel cells and their applications for cost effective water pollution remediation. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 87, n. 3, p. 625–635, 2017.

JABLONSKA, M. A.; RYBARCZYK, M. K.; LIEDER, M. Electricity generation from rapeseed straw hydrolysates using microbial fuel cells. **Bioresource Technologysource**, v. 208, p. 117–122, 2016.

JIANG, L.; SONG, P.; ZHU, L.; LI, S.; HU, Y.; FU, N.; HUANG, H. Comparison of metabolic pathway for hydrogen production in wild-type and mutant *Clostridium tyrobutyricum* strain based on metabolic flux analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 2176–2184, 2013.

JIANG, M.; CHEN, J.; HE, A.; WU, H.; KONG, X.; LIU, J.; YIN, C.; CHEN, W.; CHEN, P. Enhanced acetone/butanol/ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH control strategy. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1238–1244, 2014a.

JIANG, W.; WEN, Z.; WU, M.; LI, H.; YANG, J.; LIN, J.; LIN, Y.; YANG, L.; CEN, P. The effect of pH control on acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 with xylose and D-glucose and D-xylose mixture. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 937–942, 2014b.

JIANG, X.; SHEN, J.; LOU, S.; MU, Y.; WANG, N.; HAN, W.; SUN, X.; LI, J.; WANG, L. Comprehensive comparison of bacterial communities in a membrane-free bioelectrochemical system for removing different mononitrophenols from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 645–652, 2016.

JOHNSON, M. J.; PETERSON, W. H.; FRED, E. B. Oxidation and reduction relations between substrate and products in the acetone-butyl alcohol fermentation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 91, p. 569–91, 1931.

KADIER, A.; SIMAYI, Y.; ABDESHAHIAN, P.; AZMAN, N. F.; CHANDRASEKHAR, K.; KALIL, M. S. A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. **Alexandria Engineering Journal**, v. 55, n. 1, p. 427–443, 2016.

KALAMARAS, C. M.; EFSTATHIOU, A. M. Hydrogen production technologies: current state and future developments. **Conference Papers in Energy**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

KALINCI, Y.; HEPBASLI, A.; DINCER, I. Biomass-based hydrogen production: a review and analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 21, p. 8799–8817, 2009.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 569–582, 2006.

KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 2260–2266, 2012.

KARIMI, K.; TABATABAEI, M.; HORVÁTH, I. S.; KUMAR, R. Recent trends in acetone, butanol, and ethanol (ABE) production. **Biofuel Research Journal**, v. 8, p. 301–308, 2015.

KARLUVALI, A.; KÖROGLU, E. O.; MANAV, N.; ÇETINKAYA, A. Y.; ÖZKAYA, B. Electricity generation from organic fraction of municipal solid wastes in tubular microbial fuel cell. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 502–511, 2015.

KHAN, M. D.; KHAN, N.; SULTANA, S.; JOSHI, R.; AHMED, S.; YU, E.; SCOTT, K.; AHMAD, A.; KHAN, M. Z. Bioelectrochemical conversion of waste to energy using microbial fuel cell technology. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 141–158, 2017.

KHAN, M. Z.; NIZAMI, A. S.; REHAN, M.; OUDA, O. K. M.; SULTANA, S.; ISMAIL, I. M.; SHAHZAD, K. Microbial electrolysis cells for hydrogen production and urban wastewater treatment: A case study of Saudi Arabia. **Applied Energy**, v. 185, p. 410–420, 2016.

KHATER, D. Z.; EL-KHATIB, K. M.; HASSAN, H. M. Microbial diversity structure in acetate single chamber microbial fuel cell for electricity generation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 127–137, 2017.

KIM, D.; KIM, S.; KIM, H.; KIM, M.; SHIN, H. Sewage sludge addition to food waste synergistically enhances hydrogen fermentation performance. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8501–8506, 2011.

KIM, M.-S.; CHA, J.; KIM, D. Enhancing factors of electricity generation in a microbial fuel cell using *Geobacter sulfurreducens*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1395–1400, 2012.

KIRTAY, E. Recent advances in production of hydrogen from biomass. **Energy Conversion & Management**, v. 52, n. 4, p. 1778–1789, 2011.

KONDAVEETI, S.; MOON, J. M.; MIN, B. Optimum spacing between electrodes in an air-cathode single chamber microbial fuel cell with a low-cost polypropylene separator. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, p. 1851–1858, 2017.

KUDAHETTIGE-NILSSON, R. L.; HELMERIUS, J.; NILSSON, R. T.; SJÖBLOM, M.; HODGE, D. B.; ROVA, U. Biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum* using xylose recovered from birch Kraft black liquor. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 71–79, 2015.

KUJAWSKA, A.; KUJAWSKI, J.; BRYJAK, M.; KUJAWSKI, W. ABE fermentation products recovery methods - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 48, p. 648–661, 2015.

KUMAR, M.; SAINI, S.; GAYEN, K. Acetone-butanol-ethanol fermentation analysis using only high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 774, 2014.

KUMAR, V.; KUMAR, P.; NANDY, A.; KUNDU, P. P. Crosslinked inter penetrating network of sulfonated styrene and sulfonated PVdF-co-HFP as electrolytic membrane in single chambered Microbial Fuel Cell. **RSC Advances**, v. 5, n. 39, p. 30758–30767, 2015.

LAMAISON, C.; ANDRADE, P. A. M.; BIGATON, A. D.; ANDREOTE, F. D.; ANTONIO, R. V.; REGINATTO, V. Long-term effect of acid and heat pretreatment of sludge from a sugarcane vinasse treatment plant on the microbial community and on thermophilic biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 14124–14133, 2015.

LEDEZMA, P.; STINCHCOMBE, A.; GREENMAN, J.; IEROPOULOS, I. The first self-sustainable microbial fuel cell stack. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 7, p. 2278–2281, 2013.

LEHNEN, D. R. **Desenvolvimento de células de combustível microbianas**. 2014. 2014.

LI, H. G.; ZHANG, Q. H.; YU, X. Bin; WEI, L.; WANG, Q. Enhancement of butanol production in *Clostridium acetobutylicum* SE25 through accelerating phase shift by different phases pH regulation from cassava flour. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 148–155, 2016.

LI, T.; YAN, Y.; HE, J. Enhanced direct fermentation of cassava to butanol by *Clostridium* species strain BOH3 in cofactor-mediated medium. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 166–178, 2015.

LINKE, L.; LIJUAN, Z.; YAU LI, S. F. Evaluation of the performance of zero-electrolyte-discharge microbial fuel cell based on the type of substrate. **RSC Advances**, v. 7, p. 4070–4077, 2017.

LIU, H.; CHENG, S.; LOGAN, B. E. Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 658–662, 2005.

LIU, H.; LOGAN, B. E. Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 4040–4046, 2004.

LIU, X.; YANG, S. T. Kinetics of butyric acid fermentation of glucose and xylose by *Clostridium tyrobutyricum* wild type and mutant. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 801–808, 2006.

LOGAN, B. E. **Microbial fuel cells**. [s.l: s.n.]

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

LOGAN, B. E. Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1665–1671, 2010.

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

LOGAN, B. E.; REGAN, J. M. Microbial Fuel Cells - challenges and applications. **Environmental Science & Technology**, p. 5172–5180, 2006.

LOGAN, B. E.; WALLACK, M. J.; KIM, K.; HE, W.; FENG, Y.; SAIKALY, P. E. Assessment of microbial fuel cell configurations and power densities. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 2, p. 206–214, 2015.

LOVLEY, D. R. Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 327–332, 2006.

LOVLEY, D. R.; PHILLIPS, E. J. P. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1472–1480, 1988.

LUO, S.; GUO, W.; NEALSON, K. H.; FENG, X.; HE, Z. ¹³C pathway analysis for the role of formate in electricity generation by *Shewanella oneidensis* MR-1 using lactate in Microbial Fuel Cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. December 2015, p. 1–8, 2016.

LÜTKE-EVERSLOH, T.; BAHL, H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 634–647, 2011.

MARU, B. T.; CONSTANTIN, M.; STCHIGEL, A. M.; MEDINA, F.; SUEIRAS, J. E. Biohydrogen production by dark fermentation of glycerol using *Enterobacter* and *Citrobacter* sp. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 1, p. 31–38, 2012.

MASSET, J.; CALUSINSKA, M.; HAMILTON, C.; HILIGSMANN, S.; JORIS, B.; WILMOTTE, A.; THONART, P. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 35, p. 1–15, 2012.

MATHURIYA, A. S.; YAKHMI, J. V. Microbial fuel cells – Applications for generation of electrical power and beyond. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 127–143, 2016.

MECHMECH, F.; MARINOVA, M.; CHADJAA, H.; RAHNI, M.; AKACHA, N. B.; GARGOURI, M. Alfalfa juice as a nitrogen source or supplement for acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium acetobutylicum*. **Industrial Crops & Products**, v. 78, p. 73–81, 2015.

MIDILLI, A.; AY, M.; DINCER, I.; ROSEN, M. A. On hydrogen and hydrogen energy strategies I: current status and needs. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 9, p. 255–271, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIRAN, W.; JANG, J.; NAWAZ, M.; SHAHZAD, A.; JEONG, S. E.; JEON, C. O.; LEE, D. S. Mixed sulfate-reducing bacteria-enriched microbial fuel cells for the treatment of wastewater containing copper. **Chemosphere**, v. 189, p. 134–142, 2017.

MIRAN, W.; NAWAZ, M.; JANG, J.; LEE, D. S. Conversion of orange peel waste biomass to bioelectricity using a mediator-less microbial fuel cell. **Science of the Total Environment**, v. 547, p. 197–205, 2016a.

MIRAN, W.; NAWAZ, M.; JANG, J.; LEE, D. S. Sustainable electricity generation by biodegradation of low-cost lemon peel biomass in a dual chamber microbial fuel cell. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 106, p. 75–79, 2016b.

MOHANAKRISHNA, G.; VENKATA MOHAN, S.; SARMA, P. N. Utilizing acid-rich effluents of fermentative hydrogen production process as substrate for harnessing bioelectricity: an integrative approach. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 3440–3449, 2010.

MOLINER, R.; LÁZARO, M. J.; SUELVE, I. Analysis of the strategies for bridging the gap towards the Hydrogen Economy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 19500–19508, 2016.

MOON, Y. H.; HAN, K. J.; KIM, D.; DAY, D. F. Enhanced production of butanol and isopropanol from sugarcane molasses using *Clostridium beijerinckii* optinoii. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, p. 871–877, 2015.

MOSONI, P.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; BÉRA-MAILLET, C.; FORANO, E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2676–2685, 2007.

MUYZER, G.; WAAL, E. C. D. E.; UTIERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.

NASR, N. E. **Investigation of bio-hydrogen production optimization from synthetic and real wastes using pure and mixed cultures**. 2017. 2017.

NASR, N.; GUPTA, M.; HAFEZ, H.; NAGGAR, M. H. El; NAKHLA, G. Mono- and co-substrate utilization kinetics using mono- and co-culture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 152–160, 2017.

NAVARRO, R. M.; PEÑA, M. A.; FIERRO, J. L. G. Hydrogen production reactions from carbon feedstocks: fossil fuels and biomass. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 3952–3991, 2007.

NIKOLAIDIS, P.; POULLIKKAS, A. A comparative overview of hydrogen production processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 67, p. 597–611, 2017.

NOPARAT, P.; PRASERTSAN, P.; O-THONG, S. Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 14086–14092, 2011.

ÖZKAN, E.; UYAR, B.; ÖZGÜR, E.; YÜCEL, M.; EROGLU, I.; GÜNDÜZ, U. Photofermentative hydrogen production using dark fermentation effluent of sugar beet thick juice in outdoor conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 2, p. 2044–2049, 2012.

PANG, S.; GAO, Y.; CHOI, S. Flexible and stretchable microbial fuel cells with modified conductive and hydrophilic textile. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 504–511, 2018.

PAPAHARALABOS, G.; GREENMAN, J.; MELHUISE, C.; SANTORO, C.; CRISTIANI, P.; LI, B.; IEROPOULOS, I. Increased power output from micro porous

layer (MPL) cathode microbial fuel cells (MFC). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 11552–11558, 2013.

PASSOS, V. F.; NETO, S. A.; ANDRADE, A. R. De; REGINATTO, V. Energy generation in a Microbial Fuel Cell using anaerobic sludge from a wastewater treatment plant. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 5, p. 424–428, 2016.

PASUPULETI, S. B.; SRIKANTH, S.; VENKATA MOHAN, S.; PANT, D. Continuous mode operation of microbial fuel cell (MFC) stack with dual gas diffusion cathode design for the treatment of dark fermentation effluent. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 36, p. 12424–12435, 2015.

PENTEADO, E. D.; FERNANDEZ-MARCHANTE, C. M.; ZAIAT, M.; CAÑIZARES, P.; GONZALEZ, E. R.; RODRIGO, M. A. Energy recovery from winery wastewater using a dual chamber microbial fuel cell. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1802–1808, 2016.

PERERA, K. R. J.; KETHEESAN, B.; ARUDCHELVAM, Y.; NIRMALAKHANDAN, N. Fermentative biohydrogen production II: net energy gain from organic wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 167–178, 2012.

PIERA, M.; MARTÍNEZ-VAL, J. M.; MONTES, J. M. Safety issues of nuclear production of hydrogen. **Energy Conversion & Management**, v. 47, p. 2732–2739, 2006.

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

PIRBADIAN, S.; BARCHINGER, S. E.; LEUNG, K. M.; BYUN, H. S.; JANGIR, Y.; BOUHENNI, R. A.; REED, S. B.; ROMINE, M. F.; SAFFARINI, D. A.; SHI, L.; GORBY, Y. A.; GOLBECK, J. H.; EL-NAGGAR, M. Y. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 35, p. 12883–12888, 2014.

POTTER, M. C. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 84, n. 571, p. 260–276, 1911.

PRAMANIK, S. K.; RANA, M. Bioelectricity generation using carbon felt electrode in microbial fuel cell (MFC) inoculated with mixed cultures. **Trends in Renewable Energy**, v. 3, n. 2, p. 129–140, 2017.

QI, G.; XIONG, L.; LIN, X.; HUANG, C.; LI, H.; CHEN, X.; CHEN, X. CaCO₃ supplementation alleviates the inhibition of formic acid on acetone/butanol/ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology Letters**, v. 39, p. 97–104, 2017.

QUÉMÉNEUR, M.; HAMELIN, J.; BARAKAT, A.; STEYER, J.; CARRÈRE, H.; TRABLY, E. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 3150–3159, 2011.

RACHINSKI, S.; CARUBELLI, A.; MANGONI, A. P.; MANGRICH, A. S. Pilhas de combustíveis microbianas utilizadas na produção de eletricidade a partir de rejeitos orgânicos: uma perspectiva de futuro. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1773–1778, 2010.

RAGANATI, F. **Butanol production by fermentation of renewable feedstocks**. 2014. 2014.

RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; GÖTZ, P.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P. Butanol production from hexoses and pentoses by fermentation of *Clostridium acetobutylicum*. **Anaerobe**, v. 34, p. 146–155, 2015a.

RAGANATI, F.; PROCENTESE, A.; MONTAGNARO, F.; OLIVIERI, G.; MARZOCHELLA, A. Butanol production from leftover beverages and sport drinks. **Bioenergy Research**, v. 8, n. 1, p. 369–379, 2015b.

RAGANATI, F.; PROCENTESE, A.; OLIVIERI, G.; GÖTZ, P.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA, A. Kinetic study of butanol production from various sugars by *Clostridium acetobutylicum* using a dynamic model. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 156–166, 2015c.

RAJESWARI, S.; VIDHYA, S.; KRISHNARAJ, R. N.; SARAVANAN, P.; SUNDARAPANDIYAN, S.; MARUTHAMUTHU, S.; PONMARIAPPAN, S.; VIJAYAN, M. Utilization of soak liquor in microbial fuel cell. **Fuel**, v. 181, p. 148–156, 2016.

READ, S. T.; DUTTA, P.; BOND, P. L.; KELLER, J.; RABAEY, K. Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 98, p. 1–10, 2010.

REGINATTO, V.; ANTÔNIO, R. V. Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 323–335, 2015.

RINALDI, A.; MECHERI, B.; GARAVAGLIA, V.; LICOCCIA, S.; DINARDO, P.; TRAVERSA, E. Engineering materials and biology to boost performance of microbial fuel cells: a critical review. **Energy and Environmental Science**, v. 4, p. 419–429, 2008.

RODIONOVA, M. V.; POUDYAL, R. S.; TIWARI, I.; VOLOSHIN, R. A.; ZHARMUKHAMEDOV, S. K.; NAM, H. G.; ZAYADAN, B. K.; BRUCE, B. D.; HOU, H. J. M.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Biofuel production: challenges and opportunities. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 1–12, 2016.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857–867, 2014.

SÁ, V. De; CAMMAROTA, M. C.; OLIVEIRA, T. C. De; OLIVEIRA, EDNA MARIA MORAIS MATOS, A.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: an approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 2986–2997, 2013.

SALEM, A. H.; MIETZEL, T.; BRUNSTERMANN, R.; WIDMANN, R. Effect of cell immobilization, hematite nanoparticles and formation of hydrogen-producing granules on biohydrogen production from sucrose wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 25225–25233, 2017.

SANTORO, C.; ARBIZZANI, C.; ERABLE, B.; IEROPOULOS, I. Microbial fuel cells: from fundamentals to applications. A review. **Journal of Power Sources**, v. 356, p. 225–244, 2017.

SANTOS, D. M. F.; SEQUEIRA, C. A. C. Hydrogen production by alkaline water electrolysis. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1176–1193, 2013.

SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; SHAHID, M. K.; ZHEN, G.; KUMAR, G.; SHIN, H.; CHOI, Y.; KIM, S. A comprehensive overview on electro-active biofilms, role of exo- electrogens and their microbial niches in microbial fuel cells (MFCs). **Chemosphere**, v. 178, p. 534–547, 2017.

SARMA, S.; ANAND, A.; DUBEY, V. K.; MOHOLKAR, V. S. Metabolic flux network analysis of hydrogen production from crude glycerol by *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 169–177, 2017.

SCHAMPHELAIRE, L.; RABAEY, K.; BOECKX, P.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Outlook for benefits of sediment microbial fuel cells with two bio-electrodes. **Microbial Biotechnology**, v. 1, n. 6, p. 446–462, 2008.

SCHIEVANO, A.; SCIARRIA, T. P.; VANBROEKHOVEN, K.; WEVER, H. De; PUIG, S.; ANDERSEN, S. J.; RABAEY, K.; PANT, D. Electro-fermentation - Merging electrochemistry with fermentation in industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 866–878, 2016.

SHUKLA, A. K.; SURESH, P.; BERCHMANS, S.; RAJENDRAN, A. Biological fuel cells and their applications. **Current Science**, v. 87, n. 4, p. 455–468, 2004.

SILVA, F. T. M.; MOREIRA, L. R.; DE SOUZA FERREIRA, J.; BATISTA, F. R. X.; CARDOSO, V. L. Replacement of sugars to hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* using dark fermentation effluent as substrate. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 72–80, 2016.

SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 13, p. 7460–7478, 2011.

SINHA, P.; ROY, S.; DAS, D. Genomic and proteomic approaches for dark fermentative biohydrogen production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 56, p. 1308–1321, 2016.

SIQUEIRA, M. R.; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H₂ production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy**, v. 80, p. 109–116, 2015.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; LIN, C.-Y. Hydrogen and ethanol fermentation of various carbon sources by immobilized *Escherichia coli* (XL1-Blue). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 13, p. 6881–6888, 2014.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; PARK, J.-H.; PARK, H.-D.; YOON, J.-J.; KIM, S. Feasibility of enriched mixed cultures obtained by repeated batch transfer in continuous hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 4393–4403, 2015.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUPPAM, C.; MUDHOO, A.; SARATALE, G. D.; KADIER, A.; ZHEN, G.; CHATELLARD, L.; TRABLY, E.; KUMAR, G. A comprehensive review on two-stage integrative schemes for the valorization of dark fermentative effluents. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1–15, 2017.

SOTRES, A.; CERRILLO, M.; VIÑAS, M.; BONMATÍ, A. Nitrogen removal in a two-chambered microbial fuel cell: establishment of a nitrifying-denitrifying microbial community on an intermittent aerated cathode. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 905–916, 2016.

STAGER, J. L.; ZHANG, X.; LOGAN, B. E. Addition of acetate improves stability of power generation using microbial fuel cells treating domestic wastewater. **Bioelectrochemistry**, v. 118, p. 154–160, 2017.

SUN, G.; THYGESEN, A.; MEYER, A. S. Acetate is a superior substrate for microbial fuel cell initiation preceding bioethanol effluent utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11, p. 4905–4915, 2015.

VERAS, S.; MOZER, T. S.; SANTOS, D. da C. R. M. dos; CÉSAR, A. S. Hydrogen: Trends, production and characterization of the main process worldwide. **International Journal of Energy Research**, v. 42, p. 2018–2033, 2017.

VICARI, F.; MATEO, S.; FERNANDEZ-MORALES, F. J.; CAÑIZARES, P.; GALIA, A.; SCIALDONE, O.; RODRIGO, M. A. Influence of the methodology of inoculation in the performance of air-breathing microbial fuel cells. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 803, p. 81–88, 2017.

VILAJELIU-PONS, A.; BAÑERAS, L.; PUIG, S.; MOLOGNONI, D.; VILÀ-ROVIRA, A.; AMO, E. H. Del; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J. External resistances applied to MFC affect core microbiome and swine manure treatment efficiencies. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. 1–19, 2016.

WALTER, X. A.; STINCHCOMBE, A.; GREENMAN, J.; IEROPOULOS, I. Urine transduction to usable energy: A modular MFC approach for smartphone and remote system charging. **Applied Energy**, v. 192, p. 575–581, 2017.

WIESENBERN, D. P.; RUDOLPH, F. B.; PAPOUTSAKIS, E. T.; ENGINEERING, C. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2717–2722, 1988.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 471–482, 2014.

WRIGHTON, K. C.; THRASH, J. C.; MELNYK, R. A.; BIGI, J. P.; BYRNE-BAILEY, K. G.; REMIS, J. P.; SCHICHNES, D.; AUER, M.; CHANG, C. J.; COATES, J. D. Evidence for direct electron transfer by a gram-positive bacterium isolated from a microbial fuel cell. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7633–7639, 2011.

WU, D.; XING, D.; LU, L.; WEI, M.; LIU, B.; REN, N. Ferric iron enhances electricity generation by *Shewanella oneidensis* MR-1 in MFCs. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 630–634, 2013.

WU, S.; LI, H.; ZHOU, X.; LIANG, P.; ZHANG, X.; JIANG, Y.; HUANG, X. A novel pilot-scale stacked microbial fuel cell for efficient electricity generation and wastewater treatment. **Water Research**, v. 98, p. 396–403, 2016.

WUNSCHERS, R.; LINDBLAD, P. Hydrogen in education - a biological approach. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1131–1140, 2002.

XING, Y.; LI, Z.; FAN, Y.; HOU, H. Biohydrogen production from dairy manures with acidification pretreatment by anaerobic fermentation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 392–399, 2010.

XU, B.; GE, Z.; HE, Z. Sediment microbial fuel cells for wastewater treatment: challenges and opportunities. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 1, p. 279–284, 2015.

XU, S.; LIU, H. New exoelectrogen *Citrobacter* sp. SX-1 isolated from a microbial fuel cell. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1108–1115, 2011.

YANG, Q.; LIANG, S.; LIU, J.; LV, J.; FENG, Y. Analysis of anodes of microbial fuel cells when carbon brushes are preheated at different temperatures. **Catalysts**, v. 7, n. 312, p. 1–9, 2017.

YAO, P.; XIAO, Z.; CHEN, C.; LI, W.; DENG, Q. Cell growth behaviors of *Clostridium acetobutylicum* in a pervaporation membrane bioreactor for butanol fermentation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 101–105, 2016.

YU, J.; PARK, Y.; CHO, H.; CHUN, J.; SEON, J.; CHO, S.; LEE, T. Variations of electron flux and microbial community in air-cathode microbial fuel cells fed with different substrates. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 4, p. 748–753, 2012.

YUAN, H.; ABU-REESH, I. M.; CHEN, J.; HE, Z. Oxygen reduction reaction catalysts used in microbial fuel cells for energy-efficient wastewater treatment: a review. **Materials Horizons**, v. 3, n. 5, p. 382–401, 2016.

YUN, Y. M.; LEE, M. K.; IM, S. W.; MARONE, A.; TRABLY, E.; SHIN, S. R.; KIM, M. G.; CHO, S. K.; KIM, D. H. Biohydrogen production from food waste: Current status, limitations, and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 79–87, 2018.

ZHANG, F.; ZHANG, Y.; DING, J.; DAI, K.; LOOSDRECHT, M. C. M. Van; ZENG, R. J. Stable acetate production in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation by selective enrichment of hydrogenotrophic methanogens. **Scientific Reports**, v. 4, n. 5268, p. 1–9, 2014.

ZHANG, G.; ZHAO, Q.; JIAO, Y.; WANG, K.; LEE, D. J.; REN, N. Biocathode microbial fuel cell for efficient electricity recovery from dairy manure. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 537–543, 2012.

ZHANG, P.; LIU, J.; QU, Y.; FENG, Y. Enhanced *Shewanella oneidensis* MR-1 anode performance by adding fumarate in microbial fuel cell. **Chemical Engineering Journal**, v. 328, p. 697–702, 2017a.

ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D. Microbial fuel cells as pollutant treatment units: Research updates. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 121–128, 2016.

ZHANG, Y.; LI, Q.; WANG, X.; YANG, H.; GUO, L. Enhanced biohydrogen production from cornstalk through a two-step fermentation: Dark fermentation and photofermentation. **International Journal of Energy Research**, v. 41, n. 15, p. 2491–2501, 2017b.

ZHAO, X.; XING, D.; FU, N.; LIU, B.; REN, N. Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8432–8436, 2011.

ZHOU, M.; YAN, B.; WONG, J. W. C.; ZHANG, Y. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 68–78, 2018.

ZINATIZADEH, A. A.; MIRGHORAYSHI, M.; BIRGANI, M. P.; MOHAMMADI, P.; IBRAHIM, S. Influence of thermal and chemical pretreatment on structural stability of granular sludge for high-rate hydrogen production in an UASB bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 20512–20519, 2017.

8. ANEXOS

8.1. Curvas analíticas de CG

Na figura abaixo, estão apresentadas as curvas analíticas dos solventes oriundos da fermentação ABE do *C. beijerinckii*, as quais foram usadas para quantificação desses produtos durante os ensaios de fermentação.

As curvas analíticas dos produtos oriundos da fase acidogênica do crescimento do *Clostridium* (ácidos acético e butírico) estão apresentadas abaixo.

8.2. Curvas analíticas de CLAE

As curvas analíticas de glicose e produtos oriundos da fermentação estão apresentadas abaixo.

8.3. Correlação entre métodos de quantificação de concentração celular

A correlação entre a concentração de massa celular seca e a absorbância a 600 nm, utilizada para converter os dados de DO_{600} está representada abaixo. A partir da equação de reta foi possível estimar a concentração de massa celular seca através da densidade ótica a 600 nm do cultivo.