BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CON HIDROCARBURO Y PRODUCCIÓN DE VOLTAJE EN DISPOSITIVO BIOELECTROQUÍMICO

Oliva Campos Andy D. [1], *Córdova-Bautista Yolanda*[1]*, *Ojeda Morales Marcia E*[1]., *Díaz Flores Laura L*[1], *López Lázaro Jose D. S.*[1]
[1]*Laboratorio de Biotecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Cunduacán-Jalpa Km 1. Colonia La Esmeralda CP 86400 Cunduacán, México.*
**yolanda.cordova@ujat.mx*

Área de participación: **Ingeniería Química**

Resumen

La celda de combustible microbiana (CCM) es un dispositivo electroquímico donde la energía química de la materia orgánica puede ser transformada en electricidad. En la cámara anódica la remoción del hidrocraburo y la simultánea generación de voltaje dependen de la concentración del inóculo. Con un inóculo inicial de 34 x 10^4 ±3 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), a los 100 días se alcanzó a generar un voltaje de ~ 400 mV con una población de 50 x 10^5 ±3 UFC/mL. El microorganismo electrógeno *B. altitudinis* en la cámara anódica toleró hasta 20000 ppm de hidrocarburos y en la CCM logró degradar hasta el 70% del petróleo inicial. Y mediante la voltamperometría cíclica se evidenció la existencia de compuestos redox generados por *B. altitudinis* durante el consumo del petróleo como unica fuente de carbono. El uso de *B. altitudinis* para la remoción de hidrocarburos en aguas y producción simultánea de energía mediante CCMs puede ser una alternativa a las tecnologías convencionales.

Palabras clave: *Electrogeno, Dispositivo electroquímico, B. altitudinis, Remoción*

Abstract

The microbial fuel cell (MFC) is an electrochemical device where the chemical energy of organic matter can be converted into electricity. In the anode chamber the removal of hydrocarbon and the simultaneous generation of voltage depend on the inoculum concentration. With an initial inoculum of 34 x 10^4 ±3 colony forming units per milliliter (CFU/mL), a voltage of ~ 400 mV was achieved after 100 days with a population of 50 x 10^5 ±3 UFC/mL. The electrogenic microorganism *B. altitudinis* used in the anode chamber tolerated up to 20,000 ppm of hydrocarbons and in the MFC it was able to degrade up to 70% of the initial oil. Cyclic voltammetry showed the existence of redox compounds generated by *B. altitudinis* during the consumption of oil as the only carbon source. The use of *B. altitudinis* for the removal of hydrocarbons in water and the simultaneous production of energy by means of MFCs can be an alternative to conventional technologies.

Key words: *Electrogen, Electrochemical device, B. altitudinis, Removal*

Introducción

Mas del 95% de la energía utilizada en México se obtiene de combustibles fósiles ya que esta es esencial para mantener la economía del país [1]. Entre los más graves desastres ambientales que atentan contra biodiversidad se encuentran los derrames de petróleo. El petróleo crudo es una mezcla compleja de varios componentes formados por carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y azufre que en conjunto se denominan hidrocarburos del petróleo. Estos incluyen alcanos lineales, ramificados y cíclicos, alquenos insaturados, alquinos, alquil aromáticos de bajo peso molecular, monoaromáticos (benceno, tolueno y xileno), poliaromáticos (hidrocarburos aromáticos policíclicos, o HAP, como el naftaleno), asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas) y resinas (piridinas, quinolinas, cardaxoles, sulfonatos y amidas), además de ceras y alquitranes. La contaminación por esta mezcla químicamente tóxica puede causar un grave deterioro medioambiental que, con el tiempo, altera profundamente las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo o el agua y la salud humana [2]. Una de las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos son los derrames o vertidos accidentales. Las cifras de derrames van en aumento, Pemex de 2018 a 2021 reportó a través del Centro de Coordinación y Apoyo a Emergencias (CCAE) 176 derrames. Siendo 34 derrames en 2018 y 57 en 2019 [3]. Por ejemplo, la explosión en 2010 de la plataforma petrolífera Deepwater Horizon en el Golfo de México que liberó más de cuatro millones de barriles de petróleo [4, 5]. Sin embargo, existen otras fuentes de contaminación de ecosistemas acuaticos como los efluentes locales e industriales, las instalaciones de almacenamiento de petróleo marítimas y costeras. En Tabasco, desde el año 2018 hasta el 2023, Petróleos Mexicanos ha reportado 1,622 accidentes entre fugas y derrames [6]. Aun así, el petróleo sigue siendo la principal fuente de energía mundial para muchas actividades humanas. Sin embargo, debído a su alta toxicicidad los hidrocarburos derramados alteran la estructura y dinámica de los ecosistemas. Los incidentes seguirán ocurriendo y es por ello que se deben buscar alternativas prometedoras sustentables para subsanar el daño al medio ambiente. Los sistemas bioelectroquímicos, en particular las celdas de combustible microbianas (CCM) son dispositivos capaces de producir energía a partir de la degradación de material orgánico o inorgánico mediante el metabolismo microbiano de bacterias electrogénicas [7, 8]. Las bacterias electrogénicas en el ambiente anaerobio descomponen la materia orgánica y los electrones resultantes se trasnfieren a la región catódica a través del circuito externo para generar corriente. Las CCM están teniendo gradualmente algunas aplicaciones en la mejora del tratamiento de aguas residuales y la producción de energía. Por ejemplo Zhiyuan y col. [9] reportan una remoción del 99% de nitrógeno total en aguas municipales con una densidad de potencia de 1.41 W/m^3 utilizando celdas de combustible microbianas. Yang y col. [10] reportan una remoción del 88.5% de demanda química de oxígeno en vinazas con una producción de voltaje de 535 mV con bacterias del genéro *Azospirullum* como electrógenos. En este trabajo se pretenden biorremediar aguas con petróleo utilizando celdas de combustible microbianas de doble cámara. En este proceso simultameamente se producirá energía apartir de la degradación de los hidrocarburos. La cepa bacteriana *B. altitudinis* aislada de recortes de perforación será el microorganismo electrógeno utilizado en la biorremediación.

Metodología

Reactivación de bacteria electrogénica

La cepa *B. altitudinis* fue aislada de recortes de perforación de pozos petroleros ubicados en el Golfo de México en abril del 2019. Esta cepa fue identificada mediante pruebas bioquímicas API 50CH y se cultivó en medio líquido LB que contiene 5 g L^{-1} de Extracto de levadura, 10 g L^{-1} de Triptona, 10 g L^{-1} y 1000 mL de agua destilada [11, 12].

Eficiencia en la utilización de hidrocarburos

En tubos estériles de 10 mL se adicionaron 5 mL de medio mineral (g/L: 10 NaCl, 1.5 NH_4NO_3, 0.5 K_2HPO_4, 0.5H_20_4, 0.02 $FeSO_4$, 0.1 $MgSO_4$, 0.1 $CaCl_2$, 0.0005 MnSO4, 0.00064 g/L de $ZnCl_2$) con hidrocarburos al 0, 5, 10, 15 y 20% más 0.5 mL de inoculo de *B. altitudinis* (OD_{600} ~0.7). Los tubos se incubaron por 30 días. Después, se determinó el hidrocarburo residual por gravimetría [13]. 5 mL de n-hexano se adicionaron a cada tubo y se agito durante 3 minutos hasta formar dos fases. La fase superior fue la que contenía al solvente y al hidrocarburo, esta se adiciono a un tubo previamente pesado. Después se llevaron a calentamiento a 60 °C en horno (ECOSHEL Modela 9023A USA). durante dos días hasta la evaporación total del solvente. Una vez fríos los tubos fueron pesados y con la diferencia de pesos (tubo vacío y con muestra) se determinó el por ciento de degradación del hidrocarburo con la ecuación 1. Aunado a la determinación de la degradación de HTP, se determinó la población de *B. altitudinis* a través del método de sembrado en placa por diluciones seriadas [12]. Los datos obtenidos se analizaron por un ANOVA con prueba de medias Tukey a un nivel de confianza al 95%. Una vez identificada la prueba donde hubo mayor crecimiento y a la vez degradación de hidrocarburo se procedio al experimento en la CCM.

$$\%\ Remoción = 1 - \frac{HTP_{Residual}}{HTP_{Inicio}} * 100 \quad \textbf{Ec. 1}$$

Donde, HTP_{Inicio} es el peso en g del tratamiento control y $HTP_{Residual}$ es el peso en g de los tratamientos con petróleo.

Construcción de la celda de combustible microbiana

De acrílico Plexiglas de 3mm de espesor se construyo una CCM de doble cámara que consistió en dos cámaras cilíndricas horizontales de 10 cm de largo por 10 cm de diámetro (Figura 1) [8]. Por cada cámara el volumen de trabajo fue de 700 mL. Las cámaras estuvieron separadas a una distancia de 0.5 cm por una membrana intercambiadora de protones Nafion 117, película de 183 µm previamente activada. Laminas de neopreno fueron usadas con el fin de evitar fugas de los electrolitos. En la parte superior de la cámara anódica se colocó una toma de muestra utilizando pipetas Pasteur adaptadas con venoclisis y jeringa de 5 mL. La cámara catódica se mantuvo aireada continuamente a través de un compresor. Y para evitar contaminación por microorganismos en la cámara catódica, el compresor fue conectado a un filtro microporo de 0.22 μ m [14]. La cámara anódica contenía medio mineral (10 g/L de NaCl, 1.5 NH_4NO_3, 0.5 K_2HPO_4, 0.5KH_2PO_4, 0.02 $FeSO_4$, 0.1 $MgSO_4$, 0.1 $CaCl_2$, 0.0005 MnSO4, 0.00064 g/L de $ZnCl_2$) con petróleo al 20% más 150 mL de una solución búfer a 52 mM (K_2HPO_4, 5.4 g/L y KH_2PO_4, 2.6 g/L; pH 7). La cámara catódica contuvo 700 mL de una solución búfer a 82 mM (K_2HPO_4, 8.8 g/L y KH_2PO_4, 4.3 g/L; pH 6) [15]. El ánodo fue un cepillo de fibra de carbono de 2 x 8 x 12 cm (Fuel cell, inc. USA) y el cátodo fue de tela de carbón de 5 x 5 cm (40% Pt, 0.3 mg/cm^2) (Fuel Cell, Inc., USA). Para eliminar las impurezas los electrodos se mantuvieron sumergidos por 24 horas en una solución 1 M de H_2SO_4 y después en una solución 1M de NaOH. Los electrodos se conectaron mediante un alambre de aleación cobre aluminio y se recubrió con resina epóxica no conductiva para evitar corrosión.

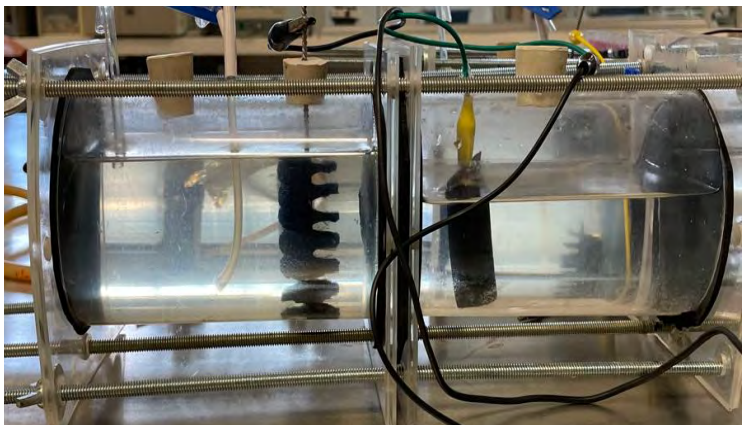


Figura 1. Configuración celda de combustible microbiana de doble camara utilizada en este trabajo

Diseño experimental con CCMs

Para el bioensayo se estableció un diseño experimental completamente al azar. Las variables dependientes fueron: la eficiencia en la degradación del hidrocarburo (Y1) y la resistencia interna (Y2). La variable independiente o factor, fue la concentración del inóculo de *B. altitudinis* (Tabla 1). Los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza y prueba de medias Tukey al 95% de límite de confianza.

Tabla 1. Diseño experimental unifactorial para evaluar la biorremediación en CCM

Factor fijo	Concentración de bacterias en inóculo (UFC/mL)	Repeticiones
B. Altitudinis	$34x10^4 \pm 3$	R1, R2, R3
	$25x10^4 \pm 3$	R1, R2, R3
	$15x10^4 \pm 2$	R1, R2, R3

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el modelo estadístico siguiente:

$$Yij = \mu + Ii + £ji \quad i = 1, 2, 3... t \; j = 1, 2, 3... r \quad \text{..... (Ec. 2)}$$

donde: Yij es la variable respuesta en tratamiento i, repetición j, μ es media general, Ii es efecto del tratamiento i, £ij es el error aleatorio; £ji ~ N (0, σ 2). Los datos obtenidos fueron analizados en el software Rstudio-2024.04.0-735.

Cálculos y mediciones analíticas

Determinación de la población de *B. Altitudinis*

El voltaje se midió continuamente mediante un multímetro (Adir 441) y con base en la curva de polarización la resistencia interna (R_i) se estimó mediante la ecuación 3 obtenida del ajuste lineal de las pérdidas óhmicas [8]. La eficiencia en la degradación de hidrocarburos se determinó por gravimetría y se calculó el porcentaje de degradación con la ecuación 1 [13]. La determinación de fracciones de hidrocarburos se realizó por análisis SARA de acuerdo con la norma ASMT D 2007-11 [17]. La fracción de hidrocarburos recuperada se calculó con las ecuaciones 4, 5 y 6. Y, la cuantificación de la población de *B. Altitudinis* se realizó por el método de siembra por extensión en placa en medio LB [14]. La voltamperometría cíclica (VC) fue utilizada para estudiar el modo de transferencia de

electrones en el ánodo. La VC se midio a una velocidad de barrido de 50 mV/s en el intervalo de -1 a 1 (vs Ag/AgCl). El contra electrodo fue un alambre de platino de 5 cm de largo, el electrodo de trabajo fue una barra de grafito de 5 cm de largo por 5 mm de diametro y el electrodo de referencia de Ag/AgCl [19].

$$V_{CCM} = V_{VCA} - IR_i \quad \text{Ec. 3}$$

Dónde, V_{VCA} es voltaje a circuito abierto e I es laintensidad de corriente obtenida bajo la resistencia externa aplicada.

$$\text{Saturados} \quad \%masa\frac{S}{c} * 100 \quad \text{Ec. 4}$$

$$\text{Aromáticos} \quad \%masa\frac{A}{c} * 100 \quad \text{Ec. 5}$$

$$\text{Resinas} \quad \%masa\frac{A}{c} * 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Dónde C son los gramos de la muestra, S son los gramos saturados obtenidos del frasco, A son los gramos de aromáticos obtenidos del frasco y R son los gramos obtenidos del frasco.

Resultados y discusión

Caracterización bioquímica y fisiológica

B. altitudinis mostró resultados positivos a tinción de Gram, actividad catalasa positiva, actividad a lipasas, reducción de nitratos, utilización de citrato, fermentación de glucosa, mannosa, sucrosa y ramnosa. Y, negativa a fermentación de fructosa, maltosa, D-xilosa y trealosa. Así como negativa a oxidasa y ureasa (tabla 1). Estos resultados se compararon con los reportados por Boone y col. [19] del Manual de bacteriología Sistematica de Bergey's. E, indicaron que las colonias de *B. altitudinis* son irregulares con bordes ondulados y planas. Además en cuanto a las reacciones bioquímicas son Gram+ y positivas a: catalasa, nitratos, citratos, fermentacion de de glucosa, mannosa, sucrosa y ramnosa.

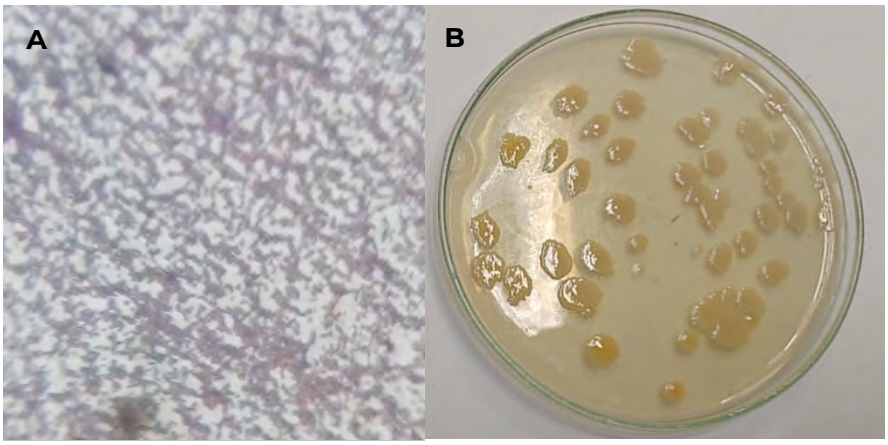


Figura 1. Tinción de Gram+ y colonias de *B. Altitudinis* en la caja petri con medio LB

Tolerancia de utilización de hidrocarburo por B. altitudinis

La tolerancia y utilización del hidrocarburo como única fuente de carbono se midió en medio mineral líquido hasta los 30 días. En la figura 2 se muestra que a la concentración de 20000 ppm *B. altitudinis* removió un 45%. Es importante mencionar que en todas las concentraciones se utilizó la misma cantidad de inóculo de *B. altitudinis*. Así que la cepa bacteriana toleró hasta las 20000 ppm que se establecieron en este estudio. Estudios reportados por Liu y col. [20] encontraron que *B. altitudinis* removió 20% de hidrocarburos en un bioreactor para tratamiento de aguas residuales de refineria y Zhao y col. [21] mencionan que las cepas de *Bacillus* como *subtilis y altitudinis* se caracterizan por usar el hidrocraburo como fuente de carbono debido a su catabolismo.

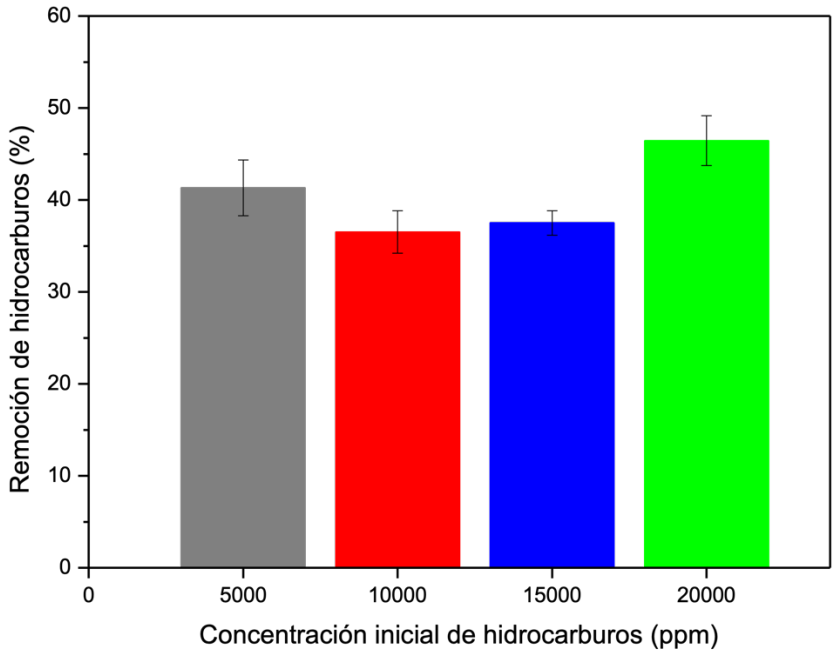


Figura 2. Prueba de tolerancia a la utilización de hidrocarburos en cinco concentraciones con 30 días de incubación

Producción de voltaje en celdas y biomasa electrógena

El crecimeinto de los microorganismos en el ánodo es uno de los parámetros cruciales para la estabilización de los compuestos orgánicos y la generación de la electricidad en las CCM. Esto se debe a que el microorganismo forma una biopelícula sobre el ánodo quien capura parte de los electrones generados en el consumo de la fuente de carbono. La figura 3 muestra que la producción de voltaje fue diferente en los tres tratamientos de CCM, alcanzando un voltaje más alto en la CCM_1 con ~ 400 mV con $50x10^5$±3 UFC/mL con una remoción de hidrocarburos totales del 70%, una remoción de saturados del 69%, 70% de aromáticos y 17% de resinas (Tabla 2). Este comportamiento se debió a la concentración incial del inóculo en los tratamientos que se relacionó directamente con la producción de voltaje. Al respecto Mohanakrishna y col. [22] reporta voltajes similares (450 a 500 mV) en CCM estimulada para aumentar la eficiencia en la generación de voltaje y por ende la remoción de la materia orgánica que depende de la afinidad del microorganismo por el sustrato.

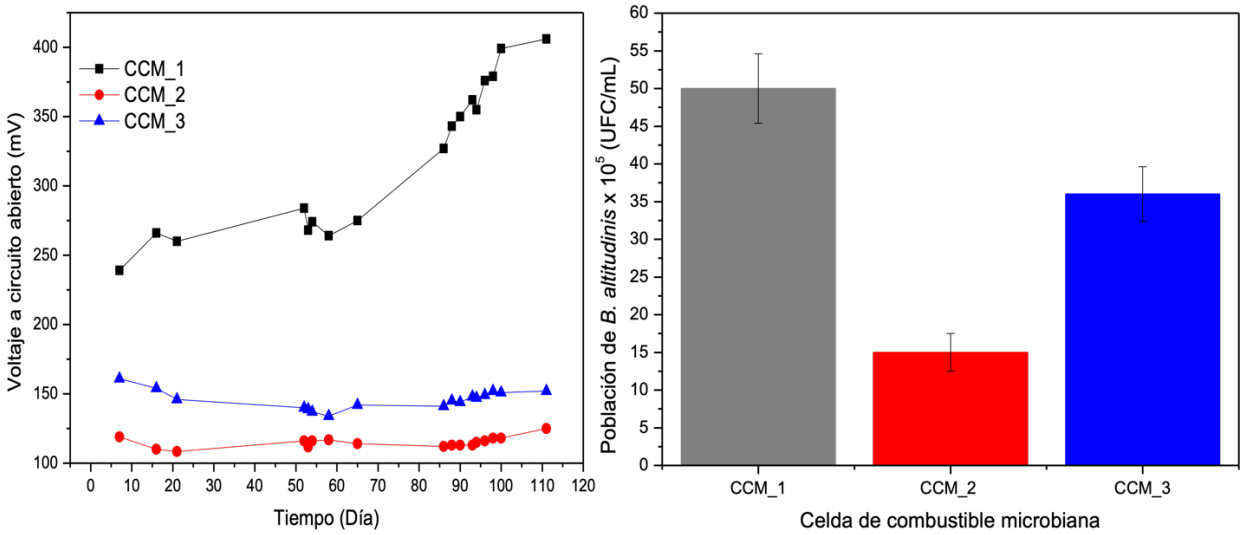


Figura 3. a) Comportamiento del voltaje en celdas de combustible através del tiempo y b) Población de *B. altitudinis* en día de máximo voltaje

Tabla 2. Concentración inicial y final de hidrocarburos en CCM_1 y porcentaje de remoción de a los 100 días

Concentración inicial	Concentración final	% remoción	Fracción SARA (%) Inicial	Final
20000	57143	70	Saturados: 55.8 Aromáticos: 14.25 Resinas: 0.575 Asfaltenos: 29.1	Saturados: 38.83 Aromáticos: 9.93 Resinas: 0.099 Asfaltenos: 51.14

Resistencia interna de la CCM

La curva de polarizición describe el voltaje en función de la corriente y permite estimar la resistencia interna de una CCM. De acuerdo con la ley de Jacobi, la importancia radica en que al combinar la resistencia interna con la resitencia externa se puede lograr la transferencia máxima de potencia de la CCM. La figura 4 muestra que la resistencia interna de la CCM_1 fue de 1511 Ω. Esto indica que es necesario hacer mejoras ya sea en la configuración de la CCM, el material utilizado e incluso el tamaño del inóculo u otras condiciones de operación [23].

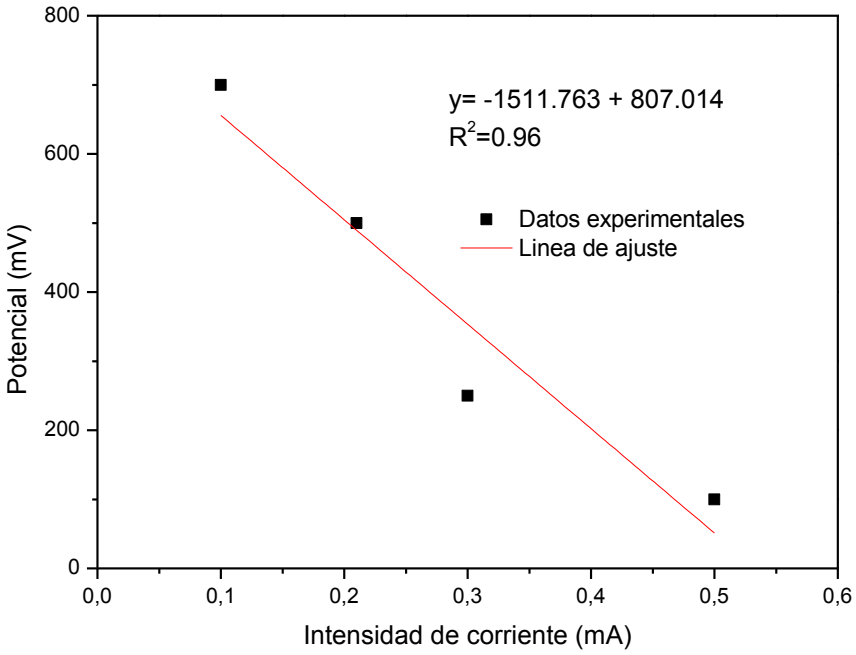


Figura 4. Comportamiento del voltaje en celdas de combustible a través del tiempo

Análisis voltampetrométrico

Un voltamperograma cíclico suele contener un barrido inverso y otro directo, que corresponden a las reacciones de reducción y oxidación, respectivamente. En la figura 5 se muestra el rango de potencial aplicado de -1 a 1 V para los tres medios. Los ánodos con biomasa y sobrenadante sin biomasa generaron mayor corriente (5.5 y $4x10^{-4}$ A, respectivamente) comparado con el voltamperograma del medio fresco esterilizado de $2.2x10^{-4}$ A. Esto indica la existencia de actividad catalítica redox y la trasnferencia de electrones hacia el ánodo a través de mediadores o transportadores de electrones. Al respecto, Shen y col. [18] mencionan que las bacterias gram positivas pueden generar metabolitos como surfactantes y enzimas que funcionan como transportadores de electrones.

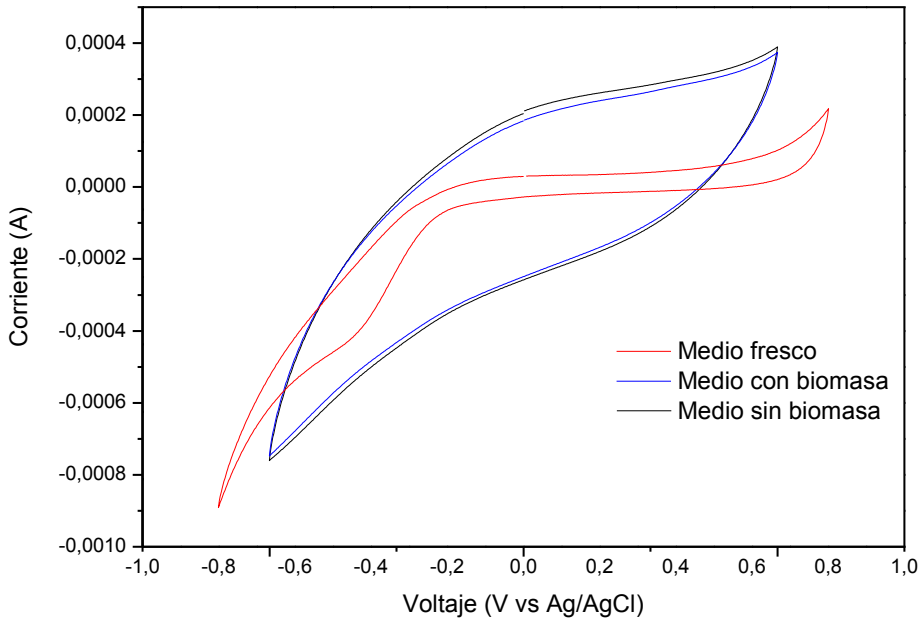


Figura 5. Voltamperograma cíclico de la celda CCM_1

Trabajo a futuro

Mejorar el rendimiento mediante la reducción la resistencia interna de la celda considerando los materiales de electrodos, así como estudiar la cinética del crecimiento de *B. altitudinis* y elucidar que compuestos redox se están produciendo.

Conclusiones

B. altitudinis tiene el potencial electrógeno para remover hidrocarburos saturados, aromáticos y resinas además de generar simultáneamente voltaje utilizando celdas de combustible microbiana de doble cámara. La producción de voltaje depende del tamaño del inóculo y se recomienda adicionar medio fresco para mantener la activa población del electrógeno. Mediante la voltamperométría cíclica se encontró que *B. altitudinis* genera compuestos redox que funcionan como mediadores de electrones.

Agradecimientos

Externo mi agradecimiento por apoyo en diferentes maneras, aunque igualmente apreciado, a mi familia, a la Dr. Yolanda Córdova y a los compañeros del laboratorio de biotecnología.

Referencias

[1] Y. Cancino-Solórzano, J. P. Paredes-Sánchez, A. J. Gutiérrez-Trashorras, y J. Xiberta-Bernat, «The development of renewable energy resources in the State of Veracruz, Mexico», Utilities Policy, vol. 39, pp. 1-4, abr. 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.snb.2024.136538.

[2] T. W. Sleight, C. N. Sexton, G. Mpourmpakis, L. M. Gilbertson, y C. A. Ng, «A Classification Model to Identify Direct-Acting Mutagenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Transformation Products», Chemical Research In Toxicology, vol. 34, n.o 11, pp. 2273-2286, oct. 2021, doi: https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00187.

[3] Ramírez, P. PemeX registra 176 derrames y fugas de alto impacto ambiental de 2018 a 2021, Causa Natura. 2021. Recuperado de: https://causanaturamedia.com/periodismo-cn/pemexregistra- 176-derrames-y-fugas-de-alto-impacto-ambiental-de-2018-a-2021 Consultado 15 de octubre de 2024.

[4] A. V. Botello, L. A. Soto, G. Ponce-Vélez, y S. V. F, «Baseline for PAHs and metals in NW Gulf of Mexico related to the Deepwater Horizon oil spill», Estuarine, Coastal And Shelf Science, vol. 156, pp. 124-133, abr. 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.11.010.

[5] Z. Liu, J. Liu, Q. Zhu, and W. Wu, "The weathering of oil after the Deepwater Horizon oil spill: insights from the chemical composition of the oil from the sea surface, salt marshes and sediments," Environmental Research Letters, vol. 7, no. 3, p. 035302, Sep. 2012, doi: https://doi.org/10.1088/1748-9326/7/3/035302.

[6] Petróleos Mexicanos (PEMEX), 2023. Unidad de Transparencia. Versión electrónica de los derrames de crudo y fuga de gas en Tabasco durante el periodp de 2013 al 2023.

[7] C. Munoz-Cupa, Y. Hu, C. Xu, y A. Bassi, «An overview of microbial fuel cell usage in wastewater treatment, resource recovery and energy production», Science Of The Total Environment, vol.
754, p. 142429, feb. 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142429.

[8] B. E. Logan et al., «Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology», Environmental Science & Technology, vol. 40, n.o 17, pp. 5181-5192, jul. 2006, doi: https://doi.org/10.1021/es0605016.

[9] K. Zhiyuan, Z. Yongheng, F. Zhimin, Z. Yuancan, Y. Rong, "Mechanism of stable power generation and nitrogen removal in the ANAMMOX-MFC treating low C/N wastewater," Chemosphere, vol. 296, p. 133937, June 2022, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133937

[10] J. Yang, X. Cao, Y. Sun, G. Yang, W. Yi, "Recovery of microbial fuel cells with high COD molasses wastewater and analysis of the microbial community," Biomass and Bioenergy, vol. 161, p. 106450, June 2022, https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106450

[11] X. Hou et al., "An insight into algicidal characteristics of Bacillus altitudinis G3 from dysfunctional photosystem and overproduction of reactive oxygen species," Chemosphere, vol. 310, p. 136767, Jan. 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136767.

[12] B. Li et al., "Bacillus altitudinis strain AMCC 101304: a novel potential biocontrol agent for potato common scab," Biocontrol Science and Technology, vol. 29, no. 10, pp. 1009–1022, Jul. 2019, doi: https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1641791.

[13] E. Farid, E. A. Kamoun, T. H. Taha, A. El-Dissouky, and T. E. Khalil, “Eco-friendly Biodegradation of Hydrocarbons Compounds from Crude Oily Wastewater Using PVA/ Alginate/Clay Composite Hydrogels,” Journal of Polymers and the Environment, vol. 32, no. 1, pp. 225–245, Jul. 2023, doi: https://doi.org/10.1007/s10924-023-02991-y.

[14] M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, y D. A. Stahl, Brock Biología de los Microorganismos, 14a ed., Madrid, España: Pearson, 2015.

[15] Y. Córdova-Bautista, E. Ramírez-Morales, B. Pérez-Hernández, M. E. Ojeda-Morales, J. S. López- Lázaro, and G. Martínez-Pereyra, “Electricity Production and Bioremediation from Synthetic Sugar Industry Wastewater by Using Microbial Isolate in Microbial Fuel Cell,” Sugar Tech, vol. 22, no. 5, pp. 820–829, May 2020, doi: https://doi.org/10.1007/s12355-020-00830-1.

[16] S. Madani, R. Gheshlaghi, M. A. Mahdavi, M. Sobhani, and A. Elkamel, “Optimization of the performance of a double-chamber microbial fuel cell through factorial design of experiments and response surface methodology,” Fuel, vol. 150, pp. 434–440, Jun. 2015, doi: https:// doi.org/10.1016/j.fuel.2015.02.039.

[17] ASTM International, “Standard Test Method for Characteristic Groups in Rubber Extender and Processing Oils and Other Petroleum-Derived Oils by the Clay-Gel Absorption Chromatographic Method,” ASTM D2007-11, 2011.

[18] W. Shen et al., “Improving the power generation performances of Gram-positive electricigens by regulating the peptidoglycan layer with lysozyme,” Environmental Research, vol. 185, p. 109463, Jun. 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109463.

[19] D. R. Boone and G. Garrity, Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer Science & Business Media, 2001.

[20] B. Liu et al., “Polyurethane nanofiber membranes immobilized with Bacillus altitudinis LS-1 for bioremediation of diesel-contaminated wastewater,” Process Safety and Environmental Protection, vol. 180, pp. 883–892, Dec. 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.10.060.

[21] F. Zhao, H. Zhu, Q. Cui, B. Wang, H. Su, and Y. Zhang, “Anaerobic production of surfactin by a new Bacillus subtilis isolate and the in situ emulsification and viscosity reduction effect towards enhanced oil recovery applications,” Journal of Petroleum Science and Engineering, vol. 201, p. 108508, Jun. 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.petrol.2021.108508.

[22] G. Mohanakrishna, I. M. Abu-Reesh, S. Kondaveeti, R. I. Al-Raoush, and Z. He, “Enhanced treatment of petroleum refinery wastewater by short-term applied voltage in single chamber microbial fuel cell,” Bioresource Technology, vol. 253, pp. 16–21, Apr. 2018, doi: https:// doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.005.

[23] K. Lawson, R. Rossi, J. M. Regan, and B. E. Logan, “Impact of cathodic electron acceptor on microbial fuel cell internal resistance,” Bioresource Technology, vol. 316, p. 123919, Nov. 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123919.