



**Universidad de Concepción**

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Ambientales, Centro EULA-Chile

Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales mención Sistemas Acuáticos Continentales

**GENERACION DE ENERGIA A PARTIR DEL TRATAMIENTO DE AGUAS  
SERVIDAS MEDIANTE LA INTEGRACION DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE  
MICROBIANA EN UN HUMEDAL CONSTRUIDO**

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales con Mención en Sistemas  
Acuáticos Continentales**

**THAIS ANDREA GONZALEZ PEREZ**

CONCEPCION – CHILE

2019

Profesor Guía: **Dra. Gladys Vidal Sáez**  
Facultad de Ciencias Ambientales-Centro EULA-Chile,  
Universidad de Concepción, Chile

Esta Tesis ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental (GIBA) de la Facultad de Ciencias Ambientales- Centro EULA-Chile, de la Universidad de Concepción.

Profesores Integrantes Comisión Evaluadora:

---

**Dra. Gladys Vidal**

Profesor guía  
Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile  
Universidad de Concepción, Chile



---

**Dra. Carolina Baeza**

Evaluador Interno  
Facultad de Ciencias Ambientales EULA-Chile  
Universidad de Concepción, Chile

---

**Dra. Katherine Sossa**

Evaluador Externo  
Facultad de Ciencias Forestales  
Universidad de Concepción, Chile

---

**Dra. Maria Soledad Ureta Zañartu**

Evaluador externo  
Departamento de Ciencias del Ambiente  
Facultad de Química y Biología  
Universidad de Santiago de Chile, Chile

Para Luis...



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer al Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental (GIBA). A todos mis queridos compañeritos Gibanos que compartieron conmigo durante estos 5 años, gracias por su motivación, consejos y animo. La diversidad nos hace fuertes y eso no lo había experimentado antes de llegar a conocerlos.

A mis compañeras de doctorado, la generación mas genial y power de todas...mis princesas preciosas: Maria, Pancha y Paty. Sin ustedes este doctorado no hubiese sido lo mismo.

Finalmente, quiero agradecer de todo corazón a mi familia que son fundamentales en mi vida. A mis padres, Albina y Winston. Mis hermanos, Javier y Mauricio, por su comprensión y apoyo durante todos estos años. A mis sobrinas bellas, Maite y Ema. Dos grandes razones para ingresar a este fantástico doctorado en Ciencias Ambientales.





**2019**

**GRUPO DE INGENIERIA Y BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL (GIBA)**

**FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES EULA-CHILE**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**

**Esta Tesis fue realizada con financiamiento otorgado por:**

Programa de Formación de Capital Humano Avanzado

PDCA-CONICYT

Becas para Estudios de Postgrado en Chile

Beca de Doctorado Nacional

Folio n°21160606



Programa Apoyo Asistencia a Eventos

Dirección de Postgrado

Universidad de Concepción



Red Doctoral en Ciencias, Tecnología y Ambiente (REDOC)

Dirección de Postgrado

Universidad de Concepción



PROYECTO CONICYT/FONDAP/15130015

Centro de Recursos Hídricos para la Agricultura y la Minería  
(CRHIAM)

Universidad de Concepción



**Agradecimientos especiales a:**

Laboratorio de Electrocatálisis  
Facultad de Química y Biología  
Universidad de Santiago de Chile

**Laboratorio de Electrocatálisis**



FACULTAD DE  
**QUÍMICA Y BIOLOGÍA**  
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

**25**  
años





## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
RESUMEN	17
ABSTRACT	20
<b>CAPITULO I : INTRODUCCION</b>	<b>23</b>
1. AGUAS SERVIDAS	24
1.1 Generación de las aguas servidas	24
1.2 Caracterización de las aguas servidas	25
1.3 Problemática ambiental de las aguas servidas sobre el ecosistema acuático	27
2. SISTEMAS CONVENCIONALES PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS	31
2.1. Situación nacional de cobertura y saneamiento de las aguas servidas	31
3. TECNOLOGIAS NO CONVENCIONALES PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS	33
3.1 Humedales construidos	34
3.1.1 Humedales de flujo subsuperficial	36
3.1.1.1 Humedales de flujo vertical subsuperficial (HFVSS)	37
3.1.2 Mecanismos de eliminación de contaminantes en Humedales construidos de Flujo Vertical Subsuperficial	41
3.2 Celdas de combustible	43
3.2.1 Termodinámica y parámetros electroquímicos	44
3.3 Celda de combustible microbiana	45
3.3.1 Principio de funcionamiento	46
3.3.2 Producción de energía	47
3.3.3 Aspectos microbiológicos	49



3.3.3.1	Microorganismos involucrados en la generación de electricidad	49
3.3.3.2	Mecanismos de transferencia electrónica	53
4.	AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS Y LA PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN	55
4.1	Celdas de combustible microbianas integradas en humedales construidos	55
4.1.1	Configuración y operación de HC-CCM	57
4.1.2	HC-CCM como sistema de tratamiento de aguas servidas	59
4.1.3	HC-CCM para la generación de electricidad	60
	<b>CAPITULO II: HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>62</b>
1.	HIPOTESIS	63
2.	OBJETIVOS	63
2.1	Objetivo general	63
2.2	Objetivos específicos	63
	<b>CAPITULO III: EFFECT OF ZEOLITE-Fe ON GRAPHITE ANODE IN ELECTROACTIVE BIOFILM DEVELOPMENT FOR APPLICATION IN MICROBIAL FUEL CELLS</b>	<b>64</b>
1.	INTRODUCCION	67
2.	MATERIAL AND METHODS	69
2.1.	Zeolite-Y modification and characterization	69
2.2.	Electrode preparation and physicochemical characterization of the anode	70
2.3.	MFC construction, inoculation and operation	71
2.4.	Electrochemical measurements	72
2.5.	Preparation and characterization of the biofilms	73
3.	RESULTS AND DISCUSSION	74



3.1. Characterization of zeolite modified with iron	74
3.2. Formation and growth of the biofilm	78
3.3. Biofilm characterization	82
3.3.1. Morphological characterization of biofilms	82
3.3.2. Electrochemical behavior of anodes coated with a biofilm	83
3.3.3. Catalytic activity of the biofilms	91
4. CONCLUSIONS	93
<b>CAPITULO IV: ORGANIC MATTER, NITROGEN TRANSFORMATION AND BIOELECTRICITY GENERATION BY A MICROBIAL FUEL CELL INTEGRATED INTO CONSTRUCTED WETLAND UNDER FED-BATCH OPERATION</b>	<b>101</b>
1. INTRODUCTION	103
2. MATERIALS AND METHODS	105
2.1. Experimental systems construction, configuration and operation	105
2.2. Synthetic wastewater	108
2.3. Inoculation	109
2.4. Analytical methods	109
2.5. Calculation and electrochemical measurements	110
2.6. Statistical analyses	111
3. RESULTS AND DISCUSSIONS	111
3.1. Behavior of in situ parameters	111
3.2. Wastewater treatment performance	117
3.3. Bioelectricity generation	132
4. CONCLUSIONS	140



<b>CAPITULO V: DISCUSION</b>	<b>153</b>
1. SOSTENIBILIDAD EN EL TRATAMIENTO DE LAS AGUAS SERVIDAS MEDIANTE LA INTEGRACION DE SISTEMAS BIOELECTROQUIMICOS A HUMEDALES CONTRUIDOS	<b>154</b>
2. COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA INTEGRADO HUMEDAL CONSTRUIDO-CELDA COMBUSTIBLE MICROBIANA EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS	<b>164</b>
2.1 Procesos de degradación de materia orgánica en el sistema humedal construido-celda de combustible microbiana	<b>164</b>
3. FACTORES QUE LIMITAN EL DESEMPEÑO ELECTRICO DE LOS SISTEMAS INTEGRADOS HC-CCM	<b>170</b>
3.1 Efecto de la carga orgánica: Aplicación del sistema HC-CCM como sensor de DQO	<b>170</b>
3.2 Efecto de la planta y su rol en los sistemas integrados	<b>173</b>
4. RELACION ENTRE INOCULO, MATERIAL ELECTRODICO Y LA GENERACION DE ELECTRICIDAD EN SISTEMAS INTEGRADOS	<b>178</b>
<b>CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES</b>	<b>183</b>
1. CONCLUSIONES	<b>174</b>
2. RECOMENDACIONES FINALES	<b>186</b>
<b>CAPITULO VII: REFERENCIAS (INTRODUCCION-DISCUSION)</b>	<b>188</b>
<b>ANEXO I: HITOS Y PRODUCTOS DE LA TESIS</b>	<b>211</b>
<b>ANEXO II: PORTADA DE LOS ARTICULOS PUBLICADOS</b>	<b>213</b>

## INDICE DE FIGURAS

Página

### CAPITULO I

**Figura 1.** Clasificación de los humedales construidos de acuerdo a su hidrología, vegetación y dirección de flujo. 32

**Figura 2.** Corte transversal de los distintos tipos de humedales construidos. (a) Humedal construido de flujo horizontal superficial (HS); (b) Humedal construido de flujo horizontal subsuperficial (HSS); (c) Humedal construido de flujo vertical (HV). [1] Tubería influente, [2] Impermeabilización, [3] Medio filtrante, [4] Vegetación emergente, [4a] Vegetación flotante, [4b] Vegetación sumergida, [5] Nivel de agua, [6] Tubería de recolección, [7] Estructura de drenaje para mantenimiento de nivel de agua y [8] salida del efluente. 35

**Figura 3.** Esquema de una Celda de Combustible de Membrana Polimérica 41

**Figura 4.** Representación esquemática de una celda combustible microbiana y sus principales procesos. 43

**Figura 5.** Esquema de los mecanismos de transferencia electrónica microbiana. a) transferencia directa (citocromos o pilis) y b) transferencia electrónica indirecta (mediador redox). 50

**Figura 6.** Representación esquemática del sistema integrado HC-CCM. 52

### CAPITULO III

**Figure 1.** SEM micrographs for unexchanged Y zeolite (A) and Fe-exchanged Y zeolite (B) 69

**Figure 2.** XPS general spectra: wide-scan spectrum recorded from the original Y zeolite (curve a) and wide-scan spectrum recorded from the Fe-exchanged Y zeolite. XPS spectra of Fe 2p corresponding to the Fe-exchanged Y zeolite showing the various contributions (inset). 71

**Figure 3.** Fourier-transform infrared with Attenuated Total Reflection (FTIR\_ATR) spectra for unexchanged Y zeolite (curve a) and Fe-exchanged Y zeolite (curve b). 73

**Figure 4.** Voltage output generation during fed-batch MFC operation (biofilm growth) with 74

different electrodes: GC/gr ( $\Delta$ ), GC/gr-ZY ( $\circ$ ) and GC/gr-ZYFe ( $\square$ ).

**Figure 5.** Current as a function of time (+0.20 V vs. Ag/AgCl applied potential) of the GC/gr (curve a), GC/gr-ZY (curve b) and GC/gr-ZYFe (curve c) electrodes after 7 days of biofilm growth in the presence of 10mM acetate and electrodes without a biofilm (curve d). The inset is current generation of GC/gr-ZYFe electrode with biofilm after 2 days. 76

**Figure 6.** SEM micrographs of electrodes before microbial colonization: (A) GC/gr, (B) GC/gr-ZY, (C) GC/gr-ZYFe. After 7 days of MFC operation: (D) GC/gr, (E) GC/gr-ZY and (F) GC/gr-ZYFe. 78

**Figure 7.** Cyclic voltammetry at 5 mV s<sup>-1</sup> in 10mM PBS at pH 7.4 using different electrodes with a biofilm (thick line) and without a biofilm (thin line). (A) GC/gr, (B) GC/gr-ZY, and (C) GC/gr-ZYFe. 80

**Figure 8.** Effect of the biofilm growth time on the EIS behavior of ■ GC/gr, GC/gr-ZY and GC/gr-ZYFe anodes in 50mM PBS electrolyte: (A) before microbial colonization and at (B) 4 days and (C) 7 days. Applied potential=-0.082 V. 83

**Figure 9.** Randles equivalent circuit. 84

**Figure 10.** Cyclic voltammograms at 5 mVs<sup>-1</sup> in a 10mM acetate solution using different electrodes without (inset) and with a biofilm: (1) GC/gr, (2) GC/gr-ZY and (3) GC/gr-ZYFe. 87

## CAPITULO IV

**Figure 1.** Schematic representation of the lab-scale: (a) CW, (b) P-CWMFC and (c) NP-CWMFC. 101

**Figure 2.** Effluent COD variation for CW ( $\square$ ), P-CWMFC ( $\blacksquare$ ) and NP-CWMFC ( $\blacksquare$ ) with time. 114

**Figure 3.** a) COD effluent concentrations (box plot) and b) COD removal efficiencies (bar chart) during different operation stages in CW ( $\square$ ), P-CWMFC ( $\blacksquare$ ) and NP-CWMFC ( $\blacksquare$ ). 117

**Figure 4.** Effluent NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N concentration for CW ( $\square$ ), P-CWMFC ( $\blacksquare$ ) and NP-CWMFC ( $\blacksquare$ ) during different stages. 121

**Figure 5.** a) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N effluent concentrations (bar chart) and b) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N removal efficiencies 124

(box plot) during different operation stages in CW (□), P-CWMFC (■) and NP-CWMFC (■).

**Figure 6.**  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  and  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentration for cathodic (□) and anodic (■) compartment in the systems: (a) CW, (b) P-CWMFC and (c) NP-CWMFC during operation stage III. 126

**Figure 7.** Voltage fluctuation recording across a  $1000 \Omega$  external resistor for P-CWMFC (●) and NP-CWMFC (▲) during different stages. 130

## CAPITULO V

**Figura 1.** Tecnología en función de la interacción con su entorno y los indicadores usados en la evaluación de la sustentabilidad de un tratamiento de aguas residuales. 151

**Figure 2.** Beneficios de la tecnología emergente de humedales construidos-celdas combustibles microbianas para la sostenibilidad en el tratamiento de aguas servidas. 158

**Figure 3.** Representación esquemática del proceso de degradación de materia orgánica en el sistema integrado humedal construido- celda combustible microbiana. 164

**Figure 4.** Densidad de potencia obtenida por NP/HC-CCM (●) y P/HC-CCM (■) bajo diferentes cargas orgánicas aplicadas. 167

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>CAPITULO I</b>	
<b>Tabla 1.</b> Caracterización de las aguas servidas	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Efectos ambientales causados por las aguas servidas en el medio ambiente acuático	<b>27</b>
<b>Tabla 3.</b> Clasificación y características de los microorganismos electroquímicamente activos encontrados en celdas combustibles microbianas.	<b>49</b>
<b>CAPITULO III</b>	
<b>Table 1.</b> BET surface area and porosity of the unexchanged (ZY) and exchanged (ZYFe) zeolites.	<b>75</b>
<b>Table 2.</b> Influence of biofilm growth on different anodes. EIS parameters (average values) from equivalent electrical circuit fitting in 10mM PBS electrolyte at pH 7.4.	<b>88</b>
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>Table 1.</b> Characteristics of construction for experimental set-up.	<b>105</b>
<b>Table 2.</b> Operational parameters during different stages in the experimental units.	<b>106</b>
<b>Table 3.</b> In situ parameters in the experimental systems during the different operational stages.	<b>111</b>
<b>Table 4.</b> COD effluent concentration for CW, P-CWMFC and NP-CWMFC under different hydraulic retention time (2, 5 and 7 days) during the operational stages I, II and III.	<b>122</b>
<b>Table 5.</b> Bioelectricity generation performance of P-CWMFC and NP-CWMFC during operational stage III.	<b>138</b>



## CAPITULO V

**Tabla 1.** Especies de plantas usadas en HC-CCM y desempeño eléctrico obtenido. **171**

**Tabla 2.** Diferente material electródico e inóculo utilizados y la densidad de potencia obtenida en sistemas HC-CCM. **176**



## RESUMEN

Actualmente el objetivo de los tratamientos de aguas servidas es cumplir con las exigencias de las normas de descarga de efluentes, principalmente mediante la disminución del contenido de contaminantes orgánicos y nutrientes. Sin embargo, debido al nuevo escenario de cambio climático, al crecimiento de la población y agotamiento de los combustibles fósiles, el enfoque demanda una nueva visión donde el uso y la recuperación de los recursos hídricos sean sostenible. La tendencia mundial reciente persigue nuevos tratamientos que logren, junto a la eliminación de contaminantes, la recuperación de los recursos del agua servida como nutrientes, agua, energía y/o componentes valiosos.

En la búsqueda de nuevas tecnologías sostenibles para la producción de energía, las celdas de combustibles microbianas (CCM) surgen como una opción prometedora y novedosa ya que permiten la obtención de energía eléctrica a partir del tratamiento de aguas servidas. Una CCM se define como un sistema bioelectroquímico que convierte la energía química contenida en los enlaces químicos de sustancias orgánicas a energía eléctrica, mediante reacciones químicas catalizadas por microorganismos electroquímicamente activos (MEAs) que liberan sus electrones en el ánodo. En condiciones anaeróbicas los microorganismos oxidan la materia orgánica del agua servida hasta convertirla en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y electrones. Los MEAs como las del género *Geobacter* y *Shewanella* tienen la capacidad de transferir los electrones producidos en su actividad metabólica hasta un electrodo generando una corriente eléctrica. A pesar de demostrar altos porcentajes de eliminación de sustancias carbonáceas (90%), su relación costo/beneficio en aplicaciones a sistemas convencionales de tratamiento es todavía elevada. Por otro lado, los requerimientos que exigen las CCMs para su funcionamiento se encuentran de forma natural en los humedales construidos (HCs) donde los gradientes de potencial de oxidación-reducción se encuentran bien definidos pudiendo generar una diferencia de potencial eléctrico. Esto permite combinar ambas tecnologías para producir bioelectricidad durante el tratamiento del agua servida.

El objetivo de esta tesis fue evaluar la generación de energía en forma de electricidad a partir del tratamiento de aguas servidas mediante la integración de una celda de combustible microbiana en un humedal construido. Para este estudio se implementaron tres unidades experimentales de flujo vertical subsuperficial a escala de laboratorio: a) HC sistema de humedal

construido sin celda de combustible microbiana, b) P/HC-CCM es la celda de combustible microbiana integrada en el humedal construido con plantas y c) NP/HC-CCM es la celda combustible microbiana integrada en el humedal construido sin plantas. Se construyeron columnas idénticas de acrílico con una sección cuadrada interna de 0.15 m x 0.15 m y 0.7 m de altura. Como medio de soporte se utilizó grava y zeolita natural. Dos de los tres sistemas fueron plantados con *Schoenoplectus californicus* macrofitas usadas en el tratamiento de aguas servidas con humedales construidos típicos donde se llevó a cabo el estudio. La integración de la celda combustible de microbiana estuvo conformada por dos electrodos de carbono activado granular conectados a través de una resistencia externa de 1000 ohm cerrando el circuito eléctrico. La operación fue controlada por el tiempo de retención hidráulica (7-10 d) y tasas de carga orgánica (4,8–7,9 gDQO/m<sup>2</sup>·d). La eliminación de materia orgánica (Demanda Química de oxígeno-DQO) y nutrientes (Nitrógeno Total (NT), amonio (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) fueron evaluados en cada humedal, durante 180 días de operación. El modo de alimentación fue fed-batch con una solución sintética que simulaba un agua servida pretratada físicamente. La diferencia de potencial de celda (V) de los sistemas integrados HC-CCM fue registrada en los bornes de la resistencia eléctrica externa (R) cada 20 min, mediante un multímetro con sistema de adquisición de datos (Keithley 2700).

Los resultados mostraron que los sistemas integrados plantados y no plantados presentaron eficiencias de eliminación promedio entre 74-87% y 69-81%, mientras que para el sistema sin celda de combustible microbiana los valores fueron entre 62-72%, a partir de tasas de carga orgánica de 4,8 y 7,9 g DQO/m<sup>2</sup> d. A su vez, la eficiencia de eliminación de amonio fue superior al 98 % para P/HC-CCM, 90 % para NP/HC-CCM y 83 % para HC durante todo el tiempo de operación. En términos del efecto de la CCM en el rendimiento del tratamiento de aguas servidas después de la aclimatación de los sistemas, se observaron diferencias significativas entre los sistemas integrados y el control ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, los sistemas integrados dieron como resultado una diferencia de potencial entre cátodo y ánodo termodinámicamente favorable a partir de la oxidación de distintas cargas de materia orgánica, bajo la configuración del sistema plantado (P/HC-CCM) y no plantado (NP/HC-CCM), existiendo una relación entre la materia orgánica y la cantidad de energía generada. Cuando la carga orgánica superficial aumentó de 4,8 a 7,9 g DQO/m<sup>2</sup> d, la densidad

de potencia máxima también aumentó desde 5,3 hasta 8,6 mW/m<sup>2</sup> para P/HC-CCM y desde 1,4 hasta 2,5 mW/m<sup>2</sup> para NP/HC-CCM. Por su parte, el sistema integrado plantado generó 30 % más electricidad que el sistema integrado no plantado debido a que se ve mejorada la actividad eléctrica disminuyendo la resistencia interna del sistema en 1,4 veces.

Los beneficios de la integración para la sostenibilidad en el tratamiento de aguas servidas son variados abarcando indicadores de tipo sociocultural, económico y ambiental. Con los sistemas integrados HC-CCM se logra una mejora significativa en la capacidad de tratamiento, la disminución de problemas de colmatación y es efectivo para combatir el cambio climático, haciendo más sostenible la tecnología de humedales construidos. La implementación de MFC en humedales construidos da finalmente como resultado la optimización del proceso de tratamiento y la reducción de su impacto ambiental.

Respecto a la especie *Schoenoplectus californicus* se observaron diferencias en el desempeño eléctrico entre el sistema plantado y no plantado en la última etapa de operación (28gDQO/m<sup>2</sup>d). La densidad de potencia generada por P/HC-CCM fue 10,32 mW/m<sup>2</sup>, mientras que para NP/HC-CCM el valor obtenido fue 2,16 veces mayor (22,28 mW/m<sup>2</sup>). Este comportamiento coincide con el aumento del crecimiento excesivo del sistema radicular de *Schoenoplectus californicus* que invadió la zona anódica penetrando completamente el ánodo y la malla de acero. A partir de los anteriores, los resultados mostraron una mayor resistencia interna para el sistema P/HC-CCM (200,77 ohm) comparado con el sistema NP/HC-CCM (133,48 ohm).

Finalmente fue posible comprobar que efectivamente está ocurriendo una conversión de materia orgánica en electricidad, catalizada por microorganismos, la cual se ve afectada por variables de tipo operacional y también de configuración del sistema. Adicionalmente, se identifica el desempeño y funcionamiento del sistema integrado humedal construido-celda de combustible microbiana. De esta manera se logra avanzar en el conocimiento de esta tecnología emergente tanto como dispositivo generador de energía eléctrica así como sistema de tratamiento para aguas servidas.

## ABSTRACT

Currently, the objective of wastewater treatments is to comply with the requirements of effluent discharge standards, mainly by reducing the content of organic pollutants and nutrients. However, due to the new climate change scenario, population growth and depletion of fossil fuels, the approach demands a new sustainable vision in the use and recovery of water resources. The recent global trend pursues new treatments that record along with the extraction of contaminants the recovery of the resources of the water, served as nutrients, water, energy and / or valuable components. In the search for new sustainable technologies for energy production, microbial fuel cells (MFC) arise as a promising and novel option since it allows the obtaining of electrical energy from wastewater treatment. An MFC is defined as a bioelectrochemical system that converts the chemical energy contained in the chemical bonds of organic substances to electrical energy by chemical reactions catalyzed by electrochemically active microorganisms (EAMs). Under anaerobic conditions, the microorganisms oxidize the organic matter of the water served until it becomes CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O and electrons. EAMs such as those of *Geobacter* and *Shewanella* genus can transfer the electrons produced in their metabolic activity to an electrode generating an electric current. Despite demonstrating high percentages of elimination of carbonaceous substances (90%), its cost/benefit ratio in applications to conventional treatment systems is still high. On the other hand, the requirements demanded by the MFCs for their operation are found naturally in constructed wetlands (CWs) where redox gradients are well defined and can generate a redox potential difference. This allows both technologies to be combined to produce bioelectricity during the treatment of wastewater.

The objective of this thesis was to evaluate the recovery of energy in the form of electricity from wastewater treatment by integrating a microbial fuel cell into a constructed wetland. For this study, three experimental subsurface vertical flow units were implemented on a laboratory scale: a) CW wetland system built without microbial fuel cell, b) P/ CW-MFC is the microbial fuel cell integrated in the wetland built with plant and c) NP/CW-MFC is the microbial fuel cell integrated in the wetland built without a plant. They were constructed of identical acrylic columns with an internal square section of 0.15 m x 0.15 m and 0.7 m high. As a support medium, gravel and zeolite were used. Two of the three systems were planted with typical *Schoenoplectus*

*californicus* macrophyte used in the treatment of sewage with constructed and common wetlands where the study was carried out.

The integration of the microbial fuel cell was made up of two granular activated carbon electrodes connected through an external resistance of 1000 ohms closing the electrical circuit. The operation was controlled by hydraulic retention time (7-10 d) and organic load rates (4.8–7.9 gCOD/m<sup>2</sup> d). The removal efficiencies of organic matter (Chemical Demand for Oxygen-COD) and nutrients (Total Nitrogen (NT), Ammonia (N – NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) were evaluated in each wetland for 180 days of operation. The feeding mode was fed-batch with a synthetic solution that simulated physically pretreated wastewater. The cell voltage (V) of the integrated CW-MFC systems was recorded through the external electrical resistance (R) every 20 min using a multimeter with a data acquisition system (Keithley 2700).

The results show that the planted and unplanted integrated systems presented average elimination efficiencies between 74-87% and 69-81%, while for the system without microbial fuel cell the values were between 62-72%, based on rates of an organic load of 4.8 and 7.9 g COD/m<sup>2</sup> d. In turn, the ammonium removal efficiency was greater than 98% for P/CW-MFC, 90% for NP/CW-MFC and 83% for CW during the entire operation time. In terms of the effect of the MFC on the performance of wastewater treatment after acclimatization of the systems, significant differences were observed between the integrated systems and the control ( $p < 0.05$ ).

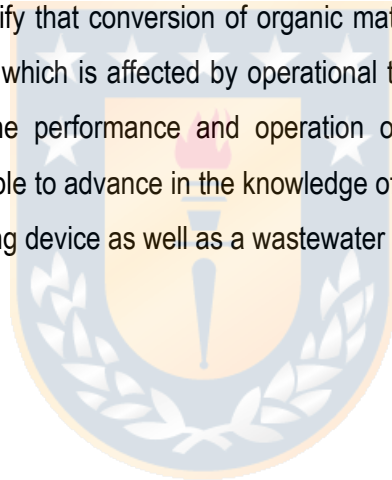
On the other hand, the integrated systems resulted in a potential difference between the cathode and thermodynamically favorable anode from the oxidation of different loads of organic matter under the configuration of the planted (P / HC-CCM) and unplanted (NP / HC-CCM) There is a relationship between organic matter and the amount of energy generated. When the organic surface load increased from 4.8 to 7.9 g COD/m<sup>2</sup> d, the maximum power density also increased from 5.3 to 8.6 mW / m<sup>2</sup> for P / HC-CCM and 1.4 to 2.5 mW / m<sup>2</sup> for NP / HC-CCM. For its part, the planted integrated system generated 30% more electricity than the unplanted integrated system because the electrode activity is improved by decreasing the internal resistance of the system by 1.4 times.

The benefits of integration for sustainability in wastewater treatment are varied, including socio-cultural, economic and environmental indicators. With HC-CCM integrated systems, a significant improvement in treatment capacity, reduction of clogging problems is achieved and is effective against climate change, making constructed wetlands technology more sustainable. The

implementation of MF into constructed wetlands ultimately results in the optimization of the treatment process and the reduction of its environmental impact.

Regarding the *Schoenoplectus californicus* species, differences in electrical performance were observed between the planted and unplanted system in the last operation stage (28gDQO/m<sup>2</sup>d). The power density generated by P/HC-CCM was 10,32 mW/m<sup>2</sup>. La densidad de potencia generada por P/HC-CCM fue 10,32 mW/m<sup>2</sup>, while for NP/HC-CCM the value obtained was 2.16 times higher (22,28 mW/m<sup>2</sup>). This behavior coincides with the increase in the overgrowth of the root system of *Schoenoplectus californicus* that invaded the anodic zone by completely penetrating the anode and steel mesh. From the above, the results showed a greater internal resistance for the P/HC-CCM system (200.77 ohm) compared to the NP/HC-CCM system (133, 48 ohm).

Finally, it was possible to verify that conversion of organic matter into electricity catalyzed by microorganisms is occurring, which is affected by operational type variables and also system configuration. Additionally, the performance and operation of the integrated system were identified. Thereby, it is possible to advance in the knowledge of this emerging technology both as an electric power generating device as well as a wastewater treatment system.





## CAPITULO I



## 1. AGUAS SERVIDAS

Las actividades realizadas por las comunidades humanas inevitablemente generan residuos líquidos, sólidos y gaseosos. Los residuos líquidos o aguas servidas (AS) corresponden al suministro de agua una vez utilizado por la comunidad, la que contiene todos los materiales añadidos al agua durante su uso, la que luego es descargada al alcantarillado (Tchobanoglous et al. 2003). Estas aguas están constituidas por una mezcla de residuos líquidos domésticos (residencias, instituciones y comercio), industriales, de infiltración y precipitación (Mara, 2004). Dentro de esta clasificación se encuentran las aguas servidas urbanas y rurales, donde el primer grupo posee características diversas debido a los distintos orígenes de los que puede provenir, ya sea de núcleos con una mayor densidad poblacional o de sitios con presencia de actividades industriales que generen una mayor cantidad de residuos (Henze, 2002).

### 1.1. Generación de las aguas servidas

La cantidad de aguas servidas generadas en los hogares y su composición varía de acuerdo al tipo de instalación, implicancias familiares de los habitantes (número de individuos, edad, tipo de vivienda y movilidad), nivel socioeconómico, entre otros. Por otra parte, las características también varían con respecto a la ubicación geográfica y la movilidad estacional o anual de los habitantes (USEPA, 1992).

En el caso de las aguas servidas de tipo rural, corresponde a los residuos líquidos originados en poblaciones que producen menos de 3800 m<sup>3</sup>/día de aguas servidas (USEPA, 2000) y/o los residuos líquidos que son generados por poblaciones inferiores o iguales a 2000 Habitantes-Equivalente (Hab-Eq) (Unión Europea en la directiva EU 91/271). Un Hab-Eq es homologado a una contaminación orgánica de 60 gDBO<sub>5</sub>/d (Henze et al., 2002). Bajo los 2000 Hab-Eq, se consideran como pequeños asentamientos de tipo rural (Vera, 2012; Araya et al., 2014). Por su parte, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) considera como rurales los territorios por debajo de 150 habitantes/km<sup>2</sup> (OCDE, 2006; Berdegú et al., 2010). Para el caso de Chile, se considera que las aguas servidas de tipo rural se originan en asentamientos rurales, ó en asentamientos humanos concentrados ó dispersos que poseen 1000 o menos habitantes, ó entre 1001 y 2000 habitantes con menos del 50% de su población económicamente activa dedicada a actividades secundarias y/o terciarias (INE, 2002).

Berdegú et al. (2010) en un análisis de la clasificación de ruralidad determinó que la población rural corresponde a una población con una densidad menor a 70 Hab/km<sup>2</sup>.

Los volúmenes de producción de aguas servidas varían a su vez entre la población urbana y rural dependiendo de la disposición de agua potable y su uso. En núcleos urbanos, a nivel internacional se estima que produce alrededor de 200 L/(hab·d) de aguas servidas (Henze *et al.*, 2002). Además, se estima que las poblaciones urbanas presentan un consumo 20% superior respecto a las poblaciones rurales, presentando por tanto una mayor producción de aguas servidas (Von Sperling, 2007; Vera, 2012). En este sentido, a nivel internacional, para las poblaciones rurales se ha estimado una producción de aguas servidas de alrededor de 150 L/(hab·d) (Barrera, 1999). A nivel país, el consumo de agua potable en zonas urbanas fue de 1109 millones de m<sup>3</sup> en el año 2014, que se traduce en una dotación promedio por habitante de 138 litros por habitante al día, oscilando entre 73 y 491 L/(hab·d) (SISS, 2014). En el caso de las poblaciones rurales, de acuerdo a Villarroel (2012), la dotación promedio alcanza los 124 L/(hab·d), oscilando entre 15 y 210 L/(hab·d). En la práctica, el coeficiente de retorno (0,8-0,9), definido como la proporción de agua utilizada que es eliminada como agua servida, indica que cada persona en el sector urbano y rural estarían produciendo un volumen de aguas servidas de alrededor de 117 L/(hab·d) y 105 L/(hab·d) (SISS, 2014; Araya *et al.*, 2014). También para Chile, se estimaron producciones de aguas servidas de tipo urbano entre 150-170 L/(hab·d), y para las aguas servidas de tipo rural un valor de 130-160 L/(hab·d) (SUBDERE, 2009 y Vera, 2012).

## **1.2. Caracterización de las aguas servidas**

Las aguas servidas se componen de 99% de agua y 1% sólidos suspendidos, coloidales y disueltos (Hanjra *et al.*, 2012). La Tabla 1 muestra la caracterización de algunos de los constituyentes más importantes de las aguas servidas. La composición típica del agua servida sin tratamiento depende de las características socioeconómicas de las comunidades y número y tipo de unidades industriales y comerciales (Hanjra *et al.*, 2012). Los componentes de las aguas servidas son normalmente una mezcla compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos. A su vez, los constituyentes encontrados en las aguas servidas se pueden clasificar en las categorías de contaminantes físicos, químicos o biológicos (Ramalho, 1996).

Dentro de las características físicas se encuentran: a) sólidos sedimentables, suspendidos y disueltos; b) temperatura, la que puede determinar la solubilidad de diversos gases como el oxígeno y también ejercer efecto en las reacciones químicas y biológicas que pueden ocurrir (Metcalf y Eddy, 2003); c) turbiedad y el color, debido a la materia en suspensión, organismos microscópicos y partículas que afectan el traspaso de la luz a través del agua, perturbando el desarrollo de organismos fotosintéticos (Ramalho, 1996); y d) el olor causado por los gases liberados (aminas, amoníaco, mercaptanos, diaminas, sulfuro de hidrogeno) durante el proceso de descomposición de la materia orgánica.

**Tabla 1.** Caracterización de las aguas servidas

Parámetros	Unidad	Tipo de agua servida		
		Concentrado	Media	Diluida
<b>Fisicoquímicos</b>				
pH		7-8	7-8	7-8
Alcalinidad	Eqv/m <sup>3</sup>	3-7	3-7	1-7
Conductividad	mS/m	120	100	70
Cloruros	mg Cl/L	500	360	280
Sulfuros	mg S/L	0	0,100	0,100
Sólidos suspendidos (SST)	mg SST/L	450	300	190
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	mg SSV/L	320	210	140
DBO <sub>5</sub> total	mg O <sub>2</sub> /L	350	250	150
DQO total	mg O <sub>2</sub> /L	740	530	320
DQO soluble	mg O <sub>2</sub> /L	300	210	130
Carbono Orgánico Total (COT)	mg C/L	250	180	110
-Hidratos de carbono	mg C/L	40	25	15
-Proteínas	mg C/L	25	18	11
-Grasas	mg C/L	25	18	11
Nitrógeno Total (NT)	mg N/L	80	50	30
Amonio (N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	mg N/L	50	30	18
Nitrito (N-NO <sub>2</sub> )	mg N/L	0,1	0,1	0,1
Nitrato (N-NO <sub>3</sub> )	mg N/L	0,5	0,5	0,5
Fósforo total (PT)	mg P/L	14	10	6
<b>Metales</b>				
Plomo (Pb)	ug Pb/L	80	65	30
Arsénico (As)	ug As/L	5	3	2
Cadmio (Cd)	ug Cd/L	4	2	2
Cromo (Cr)	ug Cr/L	40	25	15
Plata (Ag)	ug Ag/L	10	7	4
Mercurio (Hg)	ug Hg/L	3	2	1
<b>Microbiológicos</b>				
Coliformes Totales	No/100 ml	10 <sup>13</sup>		10 <sup>11</sup>
Coliformes Fecales ( <i>Escherichia coli</i> )	No/100 ml	5x10 <sup>8</sup>		10 <sup>6</sup>
Estreptococos fecales	No/100 ml	10 <sup>8</sup>		10 <sup>6</sup>
Colifagos	No/100 ml	5x10 <sup>5</sup>		5x10 <sup>4</sup>

DBO<sub>5</sub>: Demanda Biológica de Oxígeno-5 días. Fuente: Tchobanoglous et al., 2003; Henze et al., 2002.

Las características químicas se agrupan en constituyentes orgánicos e inorgánicos. Dentro de los constituyentes inorgánicos se encuentra principalmente: a) el pH, que expresa una tendencia de acidez del agua; b) nutrientes, compuestos principalmente por nitrógeno y fósforo en sus diferentes formas, los cuales tienen un rol fundamental en la eutrofización de las aguas (Araya *et al.*, 2014). El nitrógeno orgánico puede estar presente en los aminoácidos, urea, ácido úrico y purinas y pirimidinas (Kadlec y Knight, 1996). En un agua servida sin tratamiento se ha determinado que se generan 12 gN/ (hab·d) y entre 3-7 kgN/ (hab·año). Las formas inorgánicas del nitrógeno son amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ , óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y nitrógeno elemental disuelto o nitrógeno gas ( $\text{N}_2$ ); y el fósforo es representado por Fósforo Total (PT) y Fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y se ha determinado que se generan 2 gP/(hab·d) y 0,4-1,2 kgP/(hab·año) (Wallace y Knight, 2006; Henze *et al.*, 2002); y c) metales pesados como arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), plomo (Pb), mercurio (Hg) y plata (Ag), los que pueden ser encontrados en las aguas servidas debido a que son vertidos de las viviendas residenciales, la infiltración de las aguas subterráneas y los vertidos industriales (Metcalf y Eddy, 2003).

En cuanto a sus características biológicas, las aguas servidas contienen una gran cantidad de microorganismos potencialmente patógenos que, dependiendo de la concentración de las especies, plantean un riesgo potencial para la salud humana (Ashbolt *et al.*, 2001). En la Tabla 1 se encuentran algunos de microorganismos indicadores utilizados para la caracterización microbiológica de las aguas servidas. Estos organismos van desde virus sub-microscópicos a parásitos visibles que representan componentes importantes de la calidad del agua. Entre ellos se encuentran las bacterias, protozoos, virus, helmintos, rotíferos, algas, entre otros (Gerardi, 2006). Sin embargo, la identificación y cuantificación de los organismos patógenos para los humanos en las aguas servidas tratadas es costosa y técnicamente difícil. En consecuencia, se ha implementado la utilización de una batería de especies clave en la caracterización y aseguramiento de la calidad microbiológica de las aguas, que son fáciles de controlar y correlacionar con las poblaciones de organismos patógenos (Ashbolt *et al.*, 2001; Kadlec y Wallace, 2009; Bitton, 2011).

### **1.3. Problemática ambiental de las aguas servidas sobre el ecosistema acuático**

El crecimiento demográfico ha impuesto cada vez mayores demandas sobre los sistemas acuáticos y terrestres. El ser humano ha transformado entre un 30 y 50% de la superficie del mundo por la agricultura, la ganadería, la industrialización y la urbanización, lo que ha

intervenido y alterado el ciclo hidrológico natural (Holeton et al., 2011). Por este motivo, el mundo se enfrenta a problemas relacionados con la gestión de las aguas residuales. Específicamente, las aguas generadas por las actividades domésticas constituyen las principales fuentes de la carga contaminante a los ecosistemas acuáticos. Los posibles efectos nocivos de las aguas servidas en la calidad de los cuerpos de agua receptores son múltiples y dependen del volumen de la descarga, composición de los efluentes y de las características de las aguas receptoras (Akpor y Muchie, 2011).

Los parámetros evaluados para determinar efectos ambientales por descarga de aguas servidas pueden ser clasificados en tres grupos: a) físicos, b) químicos, y, c) microbiológicos. La Tabla 2 resume impactos ambientales asociados a la descarga de aguas servidas. Entre los parámetros físicos, se encuentran la temperatura y los sólidos. La temperatura en el agua servida genera oscilaciones térmicas en los sistemas acuáticos, afectando a grupos de invertebrados y peces cuando la oscilación supera los 5°C (Barceló, 2008). Los sólidos a su vez, pueden generar una serie de efectos directos e indirectos, incluidos reducción de la penetración de luz solar (reducción de la fotosíntesis), daño físico a los peces, y los efectos tóxicos de los contaminantes unidos a partículas en suspensión (Akpor y Muchie, 2011). Además, su sedimentación genera demanda de oxígeno disuelto de la columna de agua (Barceló, 2008).

Los parámetros químicos a su vez, pueden ser divididos en compuestos orgánicos e inorgánicos (Ramalho, 1996). El impacto ambiental de los compuestos orgánicos, está relacionado con las fluctuaciones de Oxígeno Disuelto (OD), como consecuencia de la oxidación bacteriana, y la variación del aporte por fotosíntesis y respiración (Holeton *et al.*, 2011). Los impactos de los bajos niveles de OD (5 mg/L) incluyen un efecto en la supervivencia de los peces mediante el aumento de la susceptibilidad a las enfermedades, retraso en el crecimiento, disminución de la capacidad de natación, alteración en la alimentación y la migración, y, en su extremo, muerte rápida (Dyer *et al.*, 2003; Habit *et al.*, 2005). Además, reducciones de OD a largo plazo pueden dar lugar a cambios en la composición de especies (Akpor y Muchie, 2011). Hace un tiempo, el estudio de Compuestos Orgánicos Emergentes (COE) ha centrado el interés de la comunidad científica. Los COE engloban los productos farmacéuticos, de cuidado personal, y los compuestos disruptores endocrinos. Pese a las evidencias, el impacto de los COE en el ambiente acuático es aún difícil de valorar (Pal et al., 2010). Sin embargo, estudios preliminares

muestran que algunos peces presentan elevadas concentraciones de COE en sus tejidos con potenciales alteraciones a nivel endocrino (Bertin et al., 2009).

Por otra parte, los compuestos inorgánicos aumentan el suministro de nutrientes (nitrógeno y fósforo). Aunque el nitrógeno y el fósforo son beneficiosas para la vida acuática en pequeñas cantidades, cuando hay un exceso estos contribuyen a la eutrofización (Buck, 2000). Se ha propuesto la categorización de eutrófico en sistemas acuáticos superficiales, como una función de las concentraciones de N y P, respectivamente, siendo: a) para lagos, N entre 0,70 y 1,20 mg/L, y P entre 0,03 y 0,10 mg/L; y b) para ríos, N superior a 1,50 mg/L, y P superior a 0,08 mg/L. En este sentido, el 41% de los lagos en América del Sur presentan problemas por eutrofización (Valsami-Jones, 2004). La eutrofización de los cuerpos de agua receptores puede tener consecuencias negativas: (i) muerte de macrófitas y fitoplancton, que se depositan en el fondo de un cuerpo de agua, estimulando procesos de descomposición microbiana que requieren oxígeno, lo que provoca el agotamiento del oxígeno; (ii) anaerobiosis y por ende, muerte de la vida acuática; (iii) la proliferación de algas puede generar sombra y la vegetación acuática sumergida reducirá o eliminará la capacidad de fotosíntesis y productividad; (iv) aglomeraciones de algas y olores, interferirá con el uso recreativo y estético del agua. El efecto neto de la eutrofización en un ecosistema es generalmente un aumento de unos pocos tipos de plantas y una disminución en el número y variedad de otras especies de plantas y animales en el sistema (Akpor y Muchie, 2011).

Por otro lado, los nutrientes pueden generar efectos agudos, por ejemplo: concentración de amoníaco mayor a 2,4 mg/L es tóxica para la vegetación acuática, inhibiendo la fotosíntesis (Chambers *et al.*, 1997; Akpor y Muchie, 2011), aunque esto varía entre las especies y fases de la vida. A su vez, la presencia de nitrato en los cuerpos de aguas acarrea riesgos para la salud, entre ellos el “síndrome del niño azul”, un defecto respiratorio que se produce en lactantes cuando el nivel de nitratos en su dieta es elevado, generando que la hemoglobina sea incapaz de liberar el oxígeno de manera efectiva a los tejidos corporales (Rivett *et al.*, 2008).

Los parámetros microbiológicos se relacionan con microorganismos provenientes de las heces, siendo responsables de la transmisión de enfermedades (Ramalho, 1996). Las principales enfermedades derivadas de la contaminación microbiológica son cólera, gastroenteritis, fiebre tifoidea, disentería, diarreas agudas y gastroenteritis (Ver Tabla 2) (Ashbolt, 2001).



**Tabla 2.** Efectos ambientales causados por las aguas servidas en el medio ambiente acuático

Contaminantes	Parámetro de caracterización	Tipo de efluentes	Efectos ambientales
<b>Sólidos suspendidos</b>	Sólidos suspendidos totales	Domésticos industriales	Problemas estéticos.
			Los sólidos pueden dar a lugar al desarrollo de depósitos de fangos o lodos y de condiciones anaerobias cuando se descargan en un entorno acuático. Absorción de contaminantes. Protección de patógenos.
<b>Sólidos Flotantes</b>	Aceites y grasas	Domésticos industriales	Problemas estéticos. Problemas para ser usados en procesos Industriales.
<b>Materia orgánica biodegradable</b>	DBO <sub>5</sub> (proteínas, carbohidratos y lípidos)	Domésticos industriales	Al ser descargadas sin tratamiento su estabilización biológica puede llevar al consumo de oxígeno y por ende generar mortalidad de organismos acuáticos por condiciones anóxicas-anaeróbicas.
<b>Patógenos</b>	Coliformes	Domésticos	Enfermedades entéricas transmitidas por el agua servida. Crecimiento excesivo de algas (eutrofización del cuerpo receptor).
<b>Nutrientes</b>	Nitrógeno y Fosforo	Domésticos industriales	Toxicidad para los peces (amonio). Enfermedad asociada a lactantes (metahemoglobinemia). Contaminación del agua subterránea. Toxicidad (varios). Espumas (detergentes).
			Reducción de la transferencia de oxígeno (detergentes). No biodegradabilidad. Malos olores (fenoles). Toxicidad.
<b>Compuestos no biodegradables</b>	Pesticidas, detergentes y otros	Industriales Agrícolas	Inhibición al tratamiento biológico de las aguas servidas. Problemas con la disposición del lodo para agricultura. Contaminación del agua subterránea.
<b>Metales pesados</b>	Elementos específicos (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn)	Industriales	

Von Sperling, 1996; Metcalf y Eddy, 2003.

## **2. SISTEMAS CONVENCIONALES PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS**

El tratamiento de aguas servidas constituye un elemento clave para preservar la calidad del agua y la integridad ecológica de los ecosistemas acuáticos receptores, además de evitar la propagación de enfermedades infecciosas y facilitar la potabilización del agua en cuencas antropizadas. La implementación de los sistemas de tratamiento modernos dio comienzo a mediados del siglo XIX en Europa, como una reacción a la creciente industrialización y urbanización que llevó a la contaminación de las fuentes de agua y la propagación de enfermedades infecciosas, generando situaciones tales como los brotes de cólera ocurridos en Londres en 1832, 1849 y 1855 (Angelakis y Snyder 2015).

Los sistemas de tratamiento convencionales, son aquellos en los cuales los procesos transcurren de forma secuencial en tanques y/o reactores a velocidades aceleradas gracias al aporte externo de energía (Metcalf y Eddy, 2003); en este tipo de tratamiento, se pueden llevar a cabo los siguientes procesos: pre-tratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario, tratamiento terciario.

El objetivo del tratamiento primario es la eliminación de materia sedimentable y flotante mediante procesos físicos y químicos. Por su parte, el tratamiento secundario tiene como finalidad la eliminación de compuestos solubles presentes en las AS, siendo principalmente aplicada para la eliminación de MO; en esta etapa la depuración del AS ocurre a través de procesos biológicos. Finalmente, el tratamiento terciario tiene como objetivo, la eliminación de SS, MO residual, nutrientes (N y P) y microorganismos patógenos, a través de procesos físicos, químicos y biológicos (USEPA, 2004).

La principal ventaja que posee este tipo de sistema de tratamiento es que presenta una eliminación eficiente de contaminantes, del orden de un 90 a 99% para SS y 80 a 90 para DBO<sub>5</sub> (Lee et al., 2009); sin embargo, conllevan un elevado consumo energético y aporte de oxígeno, lo que se traduce en un alto costo de operación (Moreno et al., 2003).

### **2.1 Cobertura de saneamiento en Chile**

Actualmente, el tratamiento de aguas servidas forma parte integral de las políticas ambientales de la mayor parte de los países desarrollados y en vías de desarrollo. En Chile, entre 1989 y 2015, la cobertura de saneamiento de las aguas servidas urbanas se incrementó desde un 8

hasta un 99,9% (SISS 2016). Eso se debió principalmente a consideraciones de salud pública y a la necesidad que tuvo nuestro país de alcanzar requisitos impuestos por acuerdos comerciales internacionales (Celedón y Alegría 2004). La cobertura de saneamiento tuvo su mayor crecimiento durante la primera mitad de la década del 2000, impulsado en gran medida por la entrada en vigencia del DS 90/01 del Ministerio Secretaría General de la Presidencia, que regula la concentración máxima permisible para la emisión de residuos líquidos a cuerpos de agua superficiales (MINSEGPRES 2001).

El principal sistema adoptado en las Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas (PTAS) de Chile es el de lodos activados convencionales, sistema aerobio de biomasa suspendida, cuyo objetivo principal es la oxidación de la materia orgánica y bajo algunas configuraciones la eliminación de nutrientes, principalmente nitrógeno. Si bien al año 1998 no existía ningún sistema de estas características operando en Chile, de las 290 PTAS operando en el país al año 2015, 173 corresponden a tecnologías de lodos activados. En particular, la Región del Biobío es la región del país con el mayor número de PTAS y con el mayor número de instalaciones de lodos activos, cuya cantidad asciende a 49 y 36, respectivamente (SISS 2016).

Los índices de cobertura en el sector urbano son bastante elevados en agua potable (99,9%), alcantarillado (96,65%) y tratamiento de aguas servidas (TAS) (99,93%) (SISS, 2014), al igual que en el sector rural concentrado, el cual presenta un índice de cobertura de agua potable actual cercano a un 99%, indicando que en materia de agua potable los esfuerzos han sido los necesarios para asegurar una de las necesidades más básicas de la población. Sin embargo, en materia de saneamiento los esfuerzos han sido deficientes. De un universo de 2,0 millones de personas que conforman la población rural (13% del total del país), el 80% cuenta con servicio domiciliario de agua potable, y sólo un 18% cuenta con servicios de alcantarillado tradicional y un 8% en los sistemas de tratamiento (INE, 2002; DOH, 2014). Por su parte, localidades rurales semi-concentradas la realidad es más crítica, existiendo 540 comunidades (195000 habitantes), que se encuentran desprovistas de servicios básicos en agua potable y saneamiento (DGA, 2012). Si a esto se agrega la inexistencia de una entidad pública responsable a cargo del tema de las aguas servidas rurales, se tiene como consecuencias problemas en la administración y asistencia técnica a estos servicios (Frêne et al., 2014).

Debido a la baja cobertura en los sistemas de tratamiento a nivel rural. Desde el año 2000 se inició un programa de saneamiento rural a nivel nacional el cual, si bien en aspectos de obras de pavimentación y redes de alcantarillado ha cumplido sin mayores contratiempos, en el caso de las plantas de tratamientos de aguas servidas no ha estado exento de dificultades. Estas dificultades se derivaron de la carencia de estudios previos respecto a las tecnologías apropiadas de tratamientos a implementar, falta de regulación respecto a las empresas proveedoras, y falta de capacidad técnica del personal involucrado en la selección, aprobación e inspección de los contratos de dotación de TAS, traduciéndose en ineficiencias en los tratamientos, e inclusive plantas que definitivamente nunca funcionaron (Dünner, 2004). Entre el año 2006-2012 se realizaron catastros de las PTAS en zonas rurales y se determinó la existencia de 550 plantas de tratamiento en el sector rural, que en su gran mayoría atienden comunidades (SUBDERE, 2014). La tecnología de lodos activados con aireación extendida representa el 72% de los tratamientos. Actualmente, la mayoría de las plantas se encuentran en mal estado provocando un aumento en los costos en la mantención y operación del tratamiento, lo cual se aleja de la tendencia mundial de incentivar el uso de sistemas sustentables que sean aceptados socialmente. De estas 550 plantas, un 27% (148 plantas) no cumplen la norma de emisión (DS-90) y 13 % (72 plantas) se encuentran en condición crítica y deben ser reemplazadas. Estos hechos son preocupantes desde el punto de vista social y sanitario, ya que estas aguas sin tratamiento son descargadas en cursos de agua receptores, que posteriormente son usados para el riego de verduras o para el consumo de localidades aguas abajo, lo que constituye un problema sanitario importante (Reynolds, 2002).

### **3. SISTEMAS NO CONVENCIONALES PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS**

En los sistemas de tratamientos no convencionales, la eliminación de los contaminantes presentes en las AS se logra a través de mecanismos y procesos naturales los cuales no requieren de energía externa ni de aditivos químicos; en estos sistemas gran parte de los procesos de descontaminación son ejecutados por la sinergia de diferentes comunidades de microorganismos (García y Corzo, 2008). Los sistemas no convencionales se caracterizan por tener un bajo consumo energético, ser simples de operar y presentar una buena integración con

el entorno; sus principales desventajas son la necesidad de una mayor superficie de terreno, menores eficiencias de eliminación de contaminantes y una larga puesta en marcha (García et al., 2004).

Los tratamientos no convencionales se dividen en: a) tratamientos en el terreno y b) tratamientos en la masa líquida. Por un lado, las tecnologías basadas en tratamientos en el terreno, tratan las aguas servidas por aplicación en el terreno, mediante la interrelación de procesos físicos, químicos y biológicos, que suceden en la capa superficial del suelo, siendo utilizado en algunos casos vegetación. Ejemplos de este tipo son los filtros verdes y escorrentia superficial (Crites et al., 2006). Por otra parte, las tecnologías basadas en tratamientos en la masa líquida, depuran las aguas servidas por embalsamiento, participando en el proceso microorganismos aeróbicos y anaeróbicos, y en algunos casos plantas acuáticas. La tecnología mas común consiste en el lagunaje de tipo anaeróbico y el lagunaje facultativo aireado mecánicamente (Von Sperling, 2007).

Otra de las tecnologías basadas en la masa líquida son los humedales construidos. La observación de la mejora en la calidad del agua por parte de los humedales naturales, llevó a concebir el uso de estos sistemas naturales para tratar aguas servidas (Vymazal, 2011a). Sin embargo, la protección de espacios naturales motivó la creación de nuevos espacios, dando como resultado la tecnología de humedales construidos (Kadlec y Wallace, 2009). A partir de la década de 1990 las aplicaciones de humedales construidos han aumentado significativamente en el campo de las tecnologías no convencionales. En el mundo se encuentran más de 50.000 sistemas en operación (Vymazal, 2011a; Wallace y Knight, 2006).

### **3.1 Humedales Construidos**

Los humedales construidos, son sistemas de ingeniería que han sido diseñados y construidos para embalsar el agua, bajo diferentes condiciones operativas. Se utilizan los procesos naturales relacionados con la vegetación, los suelos y ensambles microbianos asociados a los humedales, permitiendo el tratamiento de aguas servidas. Estos sistemas de tratamiento están constituidos por lagunas o canales poco profundos (de menos de 1 m), plantados con vegetación propia de las zonas húmedas (Vymazal, 2007; Kadlec y Wallace, 2009).

Los humedales construidos pueden clasificarse de acuerdo a varios criterios tal como se muestra en la Figura 1. De acuerdo a su comportamiento hidráulico se distinguen 2 tipos de humedales: Humedal de flujo superficial (FS) y Humedal de flujo subsuperficial (FSS). Según la dirección del flujo se pueden encontrar los de flujo horizontal (HFSS) y vertical (VFSS).

La clasificación que se basa en el tipo de planta empleado, y es adaptado al tipo de residuo líquido a tratar, los divide en: a) sistema de macrófitas flotantes, con especies de plantas que no presentan enraizamiento en el fondo, tales como: lenteja de agua (*Lemna spp.*) y Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*); b) sistema de macrófitas sumergidas, con especies de plantas que tienen su sistema foliar sumergido en la columna de agua (*Soetes lacustris*, *Lobelia dortmanna*, *Egeria densa*, y *Elodea canadensis*); y c) sistema de macrófitas emergentes, compuesto por especies de plantas enraizadas en el fondo con sus hojas y tallos sobre la superficie del agua, siendo comúnmente empleadas *Phragmites spp.*, *Typha spp.*, *Schoenoplectus spp.* y *Carex spp.* (Sundaravadivel y Vigneswaran, 2001; Plaza de los Reyes *et al.*, 2011). Además, se pueden combinar los distintos tipos de humedales mencionados formando sistemas híbridos que utilizan las ventajas de cada sistema en el tratamiento de las AS (Vymazal, 2005).

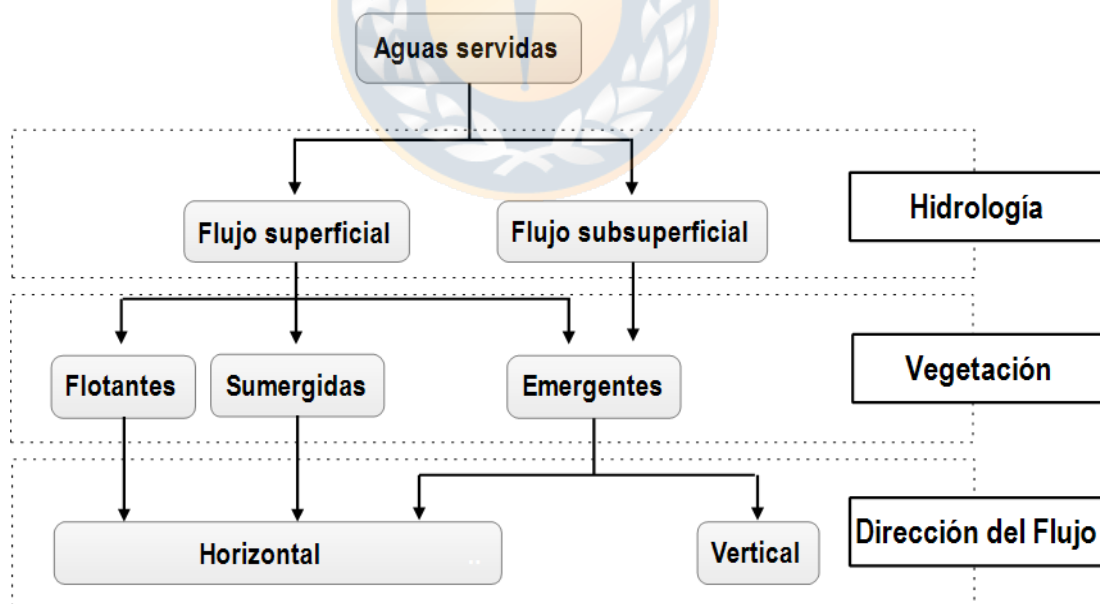


Figura 1. Clasificación de los humedales construidos de acuerdo a su hidrología, vegetación y dirección de flujo.

### 3.1.1 Humedales construidos de Flujo Subsuperficial

En los Humedales construidos de Flujo Subsuperficial (HFSS), la circulación del agua ocurre de manera subterránea (con una profundidad de la lámina de agua de alrededor de 0,6 m), a través de un medio de soporte, en contacto con las raíces y rizomas de las macrófitas (García y Corzo, 2008; Vera et al., 2011). La eliminación de los contaminantes, ocurre principalmente por acción de una biopelícula que se desarrolla en la superficie del medio y las raíces de las plantas (Kadlec y Wallace, 2009). Los HFSS son los sistemas más utilizados en Europa (Piugagut et al., 2007), ya que presentan una serie de ventajas frente a los humedales construidos de flujo superficial (HFS) como son la disminución de malos olores y la presencia de vectores, protección térmica y una mayor área superficial disponible para el tratamiento y crecimiento de biopelículas sobre el medio poroso y las raíces de las macrófitas (García et al., 2004; García y Rodríguez, 2005).

En general los HFSS tienen tres componentes principales: a) un componente de agua, que incluye el flujo del influente, el agua dentro del lecho de soporte, el efluente y sus componentes asociados; b) un componente de fijación, que incluye el medio de soporte, la rizósfera de las plantas y la biomasa microbiana; c) un componente atmosférico, que regula el movimiento de los gases dentro y fuera de la columna de agua (Wallace y Knight, 2006).

En la columna de agua (flujo), el influente ingresa al humedal en forma permanente y es tratado a medida que fluye a través de un medio poroso. El diseño de este tipo de sistemas cumple el objetivo de que el flujo del influente pueda ser distribuido de manera uniforme a través de la sección transversal del humedal (Kadlec y Wallace, 2009). Las velocidades de los flujos son mucho más bajos por unidad de área de sección transversal, principalmente debido a las pérdidas por fricción con el material de soporte (Wallace y Knight, 2006).

Respecto al medio de soporte, que corresponden a sustratos de diversos tamaños y composición. Sobre los cuales crecen plantas, microorganismos y se realizan los principales procesos de depuración (Lin et al., 2002). Los medios de soporte en los humedales construidos presentan diversas funciones: 1) son material de enraizamiento para la vegetación, 2) ayudar a distribuir/recoger de manera uniforme el flujo en la entrada/salida, 3) proporcionar un área superficial para el crecimiento microbiano, y 4) filtro y trampa de partículas (USEPA, 2000;



Vymazal y Kröpfelová, 2008). La mayoría de los HC está ocupada por el medio de soporte entre un 58% a 65% del volumen total (USEPA, 2000). El flujo es forzado a través de los espacios intersticiales en los medios del HFSS. Los principales soportes que se utilizan son: arena, grava, rocas, zeolitas, entre otros (Vohla et al., 2009; Vera et al., 2014). Cuando el lecho granular está formado por arenas y gravas gruesas, disminuye la capacidad de adsorción y el poder filtrador del medio, pero aumenta la conductividad hidráulica. El tamaño de los medios es muy variable y de acuerdo a USEPA se recomienda usar medios de soporte con tamaños entre 40-80 mm de diámetro en la zona de entrada (2 m largo) y salida (1 m largo) para proporcionar una buena distribución del agua a lo largo de la zona de entrada y buena colección de agua a lo largo de la zona de salida, además para evitar la colmatación u obstrucción por sólidos. En la zona intermedia del humedal el tamaño del medio de soporte debe ser entre 20 y 30 mm (conductividad hidráulica de 100.000 m/d; porosidad 36-40%) y profundidad mínima de 100 mm (Vymazal y Kröpfelová, 2008).

#### **3.1.1.1 Humedal construido de Flujo Vertical Subsuperficial**

Los Humedales construidos de Flujo Vertical Subsuperficial (HFVSS) han sido bien estudiados durante décadas. Esta tipología de humedales fue desarrollada en Europa y ha alcanzado gran interés debido a la obtención de efluentes totalmente nitrificados gracias a la mayor tasa de transferencia de oxígeno que proporciona al medio. Se presentan como alternativa a los humedales horizontales para producir efluentes nitrificados. En general los sistemas verticales aplican el agua de manera uniforme en la parte superior en forma de riego, percolando de manera vertical a través de la misma y tiene lugar a modo de pulsos, de manera que el medio granular no está permanentemente inundado (Weedon, 2003). El agua es alimentada de manera intermitente sobre la superficie del lecho, inundando por completo la superficie y luego, por gravedad percola y drena de manera vertical a través del medio poroso (Stefanakis et al., 2014). Esta característica permite que el aire llene los poros vacíos del sustrato dentro del lecho, mejorando así la transferencia de oxígeno desde la atmósfera al sistema, logrando una tasa de 10 a 24 mg O<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>·d (Cooper, 2005). Esta forma de alimentación es importante para la depuración, ya que promueve condiciones aeróbicas para la oxidación de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y la descomposición de materia orgánica. Sin embargo, estas condiciones no favorecen la



desnitrificación (Plaza de los Reyes et al., 2011). En la Figura 2, se presenta el esquema de un HFVSS y sus componentes principales.

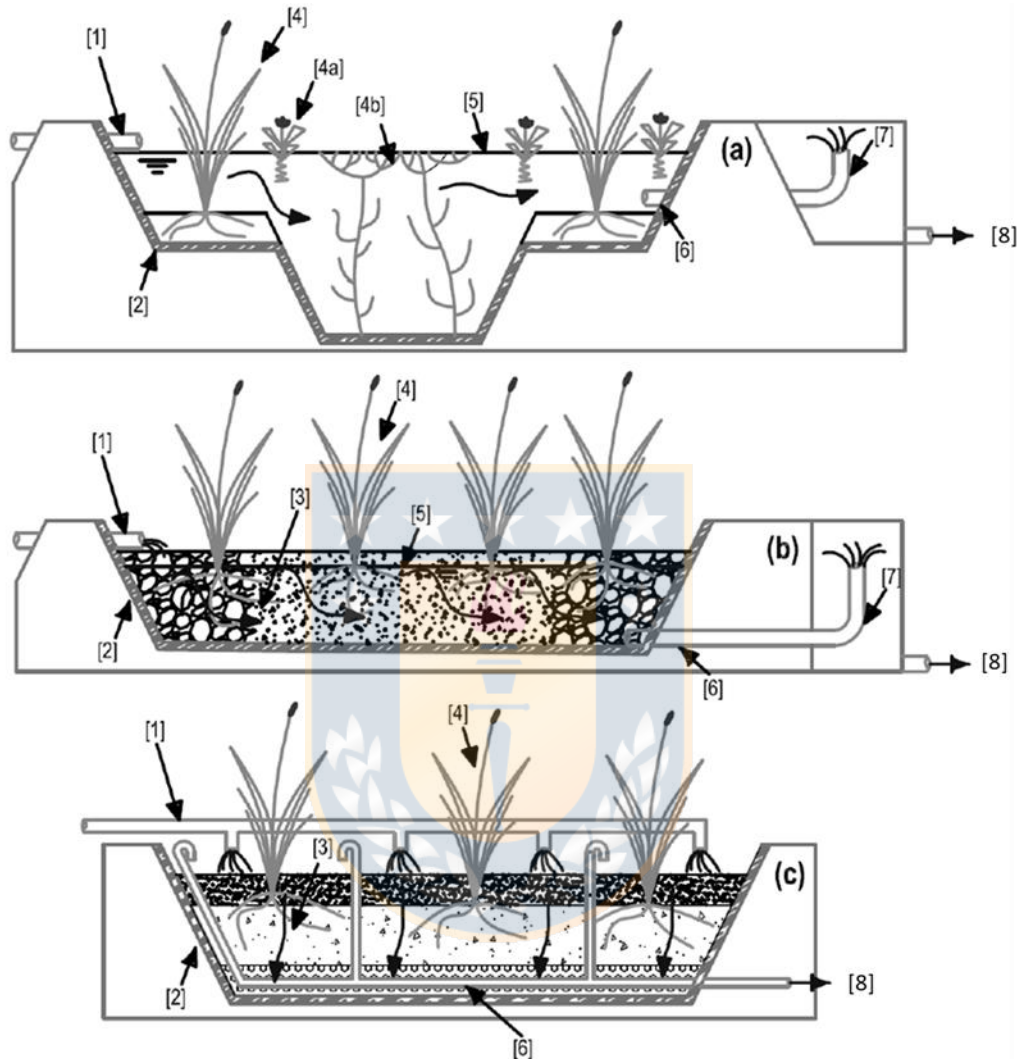


Figura 2. Corte transversal de los distintos tipos de humedales construidos. (a) Humedal construido de flujo horizontal superficial (HS); (b) Humedal construido de flujo horizontal subsuperficial (HSS); (c) Humedal construido de flujo vertical (HV). [1] Tubería influente, [2] Impermeabilización, [3] Medio filtrante, [4] Vegetación emergente, [4a] Vegetación flotante, [4b] Vegetación sumergida, [5] Nivel de agua, [6] Tubería de recolección, [7] Estructura de drenaje para mantenimiento de nivel de agua y [8] salida del efluente.

Las aguas servidas son recolectadas mediante tuberías perforadas, puestas de forma paralela al eje longitudinal e instaladas en el fondo del humedal (Crites *et al.*, 2006). La profundidad media de los HVFSS suele variar entre 0,5 y 1,4 m. Por otro lado, el medio granular utilizado, es de tipo heterogéneo ya que se disponen en capas horizontales con distinta granulometría. La profundidad del medio granular es entre 0,5 y 0,8 m. Los VFSS están constituidos específicamente por los siguientes elementos: 1) estructuras de entrada del afluente, 2) impermeabilización, 3) medio granular, 4) vegetación y 5) estructuras de salida. Adicionalmente suelen incluir tuberías de aireación (1 tubería /4 m<sup>2</sup>). La impermeabilización y la vegetación son idénticos a los sistemas horizontales (García y Corzo, 2008). La Figura 4c y Tabla 3 muestran un esquema de la configuración y características tipo de un VFSS. Estos sistemas, operan con cargas de alrededor de 10-25 g DBO/m<sup>2</sup>·d, y TRH entre 1-2 días (García y Corzo, 2008; Vymazal, 2008; Stefanakis y Tsihrintzis, 2009). Los sistemas verticales han presentado altos rendimientos ( $\geq 75\%$ ) en el tratamiento de aguas servidas de comunidades pequeñas (<5000 PE). Además, han presentado efectividad al implementarlos para aguas domésticas, municipales, industriales, lácteas, refinerías de petróleo, como también lodos (Vymazal, 2008).

Según la dirección del flujo de agua a lo largo del eje vertical, el nivel y la duración de la saturación, en los sistemas de HFVSS se pueden distinguir las siguientes variantes:

- Con carga intermitente (flujo descendente), este modo de operación es probablemente el más utilizado en Europa. Las aguas servidas se aplican en grandes volúmenes sobre la superficie del lecho por períodos de tiempo muy cortos, inundando así toda la superficie del humedal, es decir, se produce una saturación temporal del medio de soporte. Luego, el agua es drenada de forma vertical por gravedad a través del medio poroso, generando la entrada de aire desde la atmósfera al sistema y llenando así los espacios vacíos del medio (Stefanakis y Tsihrintzis, 2009). Al operar de este modo se mejora la aireación, lo que favorece la actividad de las bacterias nitrificantes que promueven los mecanismos de oxidación del amonio. Una de las principales desventajas de los HFVSS con carga intermitente es el corto tiempo de contacto entre las AS y el medio de soporte (Stefanakis *et al.*, 2014).

- Con recirculación, su aplicación consigue un mayor tiempo de contacto entre las aguas servidas y la biopelícula formada tanto en la rizosfera como en el medio de soporte, lo que conlleva un aumento en la concentración de  $O_2$  disponible y, por lo tanto, de una mayor actividad aeróbica de las bacterias (Sun et al., 2003). Varios estudios han demostrado que la recirculación de efluentes tratados y nitrificados provenientes de HFVSS, aumenta la eliminación de nitrógeno total (N-NT) mediante la desnitrificación (Arias et al., 2005; Wu et al., 2014), por lo que este tipo de sistema es una solución real para el tratamiento de AS de origen doméstico para pequeñas comunidades (García-Pérez et al., 2011).

- Con flujo Tidal, es un nuevo método que proporciona la transferencia de oxígeno al lecho del humedal (Wu et al., 2011). Se opera alternando períodos de inundación y drenaje del medio de soporte. Cuando ocurre el proceso de llenado, el aire es repelido desde la matriz a medida que aumenta el nivel de las AS que entran al sistema, generando un ambiente saturado. Asimismo, cuando el sistema es drenado, el AS tratada actúa como una bomba pasiva que conduce el aire desde la atmósfera hacia el lecho del humedal, produciéndose ciclos de “llenado y vaciado” en el humedal. De esta forma, se obtiene una mejora en la eliminación de  $DBO_5$  a través de mecanismos de descomposición aeróbica, así como en la eliminación de nitrógeno a través del proceso de nitrificación. Esto se debe principalmente al máximo tiempo de contacto entre los contaminantes y la biopelícula, y a un aumento de la tasa de transferencia de oxígeno durante la operación (Sun et al., 2005; Austin, 2006).

- Con Flujo vertical Ascendente Saturado (HFVA), aquí el agua es introducida por la parte posterior del lecho, donde fluye gradualmente de manera ascendente a través de las capas del medio poroso, llegando a la superficie del humedal y luego, ser recolectado como efluente (Ghosh y Gopal, 2010). Esta dirección genera un aumento de la concentración de oxígeno disponible con respecto a la altura del humedal, produciéndose zonas aeróbicas en la parte superior y anaeróbicas en la posterior, las cuales presentarán distintos tipos de microorganismos que lleven a cabo la degradación de los contaminantes (Stefanakis et al., 2014). La ventaja más importante de este modo de operación es la aplicación de un mayor tiempo de residencia, lo cual permite un mayor contacto entre el agua servida y los diferentes componentes del sistema (Moreno et al., 2003).

- Con Flujo vertical Descendente Saturado (HFVD), se diferencia del modo anterior solamente en que el influente es alimentado por la parte superior del humedal, con una distribución uniforme. Al igual que en el flujo ascendente, el oxígeno disponible varía con la altura del lecho. En este caso, el agua servida se encuentra inicialmente bajo un ambiente aeróbico y a medida que desciende, las condiciones se vuelven cada vez más anaeróbicas (Zhao et al., 2011). Debido a las características aeróbicas del medio que proporcionan predominantemente los HFVD y anaeróbicas, los HFVA, es que se han combinado de forma paralela ambos sistemas, lo que se conoce como sistemas integrados. En relación a los procesos de eliminación de nitrógeno, estos proporcionan, en una primera etapa, las condiciones de oxígeno ideales para llevar a cabo la nitrificación mientras que, en una segunda etapa, ocurriría la de desnitrificación (Zhao et al., 2011; Chang et al., 2012). Estas características han sido útiles en la restauración ecológica de cuerpos de agua eutrofizados (Wu et al., 2009).

### **3.1.2 Mecanismos de eliminación de contaminantes en Humedales construidos de Flujo Vertical Subsuperficial**

Los humedales construidos son sistemas altamente complejos que separan y transforman los contaminantes mediante mecanismos físicos, químicos y biológicos que pueden ocurrir simultánea o secuencialmente a medida que el agua residual fluye a través del sistema (Vymazal, 2011). Los mecanismos predominantes y su secuencia de reacción dependen de los parámetros externos de entrada al sistema, las interacciones internas, y las características del humedal (EPA, 2000). Los dos principales mecanismos de eliminación, en la mayoría de los sistemas de tratamiento, son las separaciones líquido/sólido y transformaciones de los constituyentes. En el caso de las separaciones, típicamente incluyen la separación por gravedad, filtración, absorción, adsorción, intercambio iónico, extracción, y lixiviación. Por su parte, las transformaciones pueden ser químicas, incluyendo la reacción oxidación/reducción, floculación, reacciones ácido/base, precipitación, o una serie de reacciones bioquímicas que ocurren bajo condiciones aeróbicas, anóxicas o anaerobias (EPA, 2000; Kadlec y Wallace, 2009).

La eliminación de sólidos suspendidos ocurre por procesos físicos donde la sedimentación y filtración son los que contribuyen mayormente. Estos procesos tienen lugar en la entrada del

humedal (primeros centímetros). Por otra parte, los sólidos no sedimentables o coloidales son removidos por degradación microbiana o por colisiones con otras superficies sólidas como plantas, SS y bordes del lecho (Vymazal y col., 1998). Se ha reportado que estos sistemas de humedales alcanzan eficiencias de eliminación cercanas a un 90% (Gikas et al., 2011). Sin embargo, este rendimiento puede verse disminuido por la acumulación de materia orgánica en el medio de soporte, proceso que es conocido como colmatación.

Por otra parte, la materia orgánica juega un papel importante en los procesos biogeoquímicos, llevados a cabo en los HC, ya que afecta las interacciones químicas y la disponibilidad biológica de oligoelementos y compuestos orgánicos sintéticos, que ocurren dentro de estos sistemas (Barber et al., 2001). Los mecanismos de eliminación son complejos, ya que ocurren a través de un conjunto de procesos bióticos y abióticos. Además, debido a los distintos microambientes (aeróbico y anaeróbico) existentes en los HFVSS, existe una gran diversidad de microorganismos que crecen e interaccionan entre sí. Los microorganismos contribuyen en gran medida a la eliminación de la materia orgánica (Bitton, 2002). En los HC se encuentra como Materia Orgánica Particulada (MOP), la cual es eliminada principalmente por procesos físicos como sedimentación y floculación y Materia Orgánica Disuelta (MOD) la cual es eliminada por procesos mediados por microorganismos (Imfeld y col., 2009).

Respecto al nitrógeno, este se puede encontrar tanto en su forma orgánica como inorgánica. El nitrógeno orgánico está presente como aminoácidos, urea, ácido úrico, pirimidinas y purines. Mientras que el inorgánico se encuentra como amonio ( $N-NH_4^+$ ), nitrito ( $N-NO_2^-$ ), nitrato ( $N-NO_3^-$ ), amoníaco ( $N-NH_3$ ), nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) y óxido nitroso ( $N_2O$ ) (Saeed y Sun, 2012). Se han reportado eficiencias de eliminación de las diversas formas de N, entre 50-90% para  $N-NH_4^+$  (Gikas y Tsihrantzis, 2012; Stefanakis y Tsihrantzis, 2012) y cerca de un 50% para el N-NT (Weedon, 2003).

### 3.2 Celdas de Combustible

Una celda de combustible es un dispositivo que genera energía eléctrica directamente a partir de una reacción electroquímica mediante el suministro de un combustible ( $H_2$  o  $CH_3OH$ ) y un oxidante ( $O_2$ ). Las baterías también convierten la energía química en energía eléctrica. La diferencia es que una vez consumidos los reactivos, la electricidad deja de generarse. Por lo tanto, la batería debe desecharse o recargarse utilizando una fuente externa de electricidad para impulsar la reacción electroquímica en la dirección inversa. Por el contrario, una celda de combustible puede funcionar indefinidamente, siempre que se le suministre de forma continua por ejemplo una fuente de  $H_2$  y de  $O_2$  (generalmente aire). La Figura 3 muestra un esquema de la celda de combustible de tipo Membrana Polimérica. Este tipo de celda combustible consiste en un electrolito conductor de iones en forma de sólido intercalado entre un cátodo y un ánodo. Utiliza  $H_2$  como combustible, el cual ingresa por el lado del ánodo y un oxidante, normalmente  $O_2$ , en el cátodo. El electrolito evita la reacción directa entre el combustible y el oxidante, permitiendo que los iones viajen a través de él. En consecuencia, en el ánodo, el hidrógeno se oxida para formar protones ( $H^+$ ) que pasan a través del electrolito (Ec.1). En el cátodo, el oxígeno se reduce junto a los  $H^+$  formando agua que luego son transportados a través de la membrana conductora de protones (Ec.2).

Las semireacciones y la reacción global que tienen lugar en este tipo de celda de combustible se pueden expresar mediante las siguientes ecuaciones químicas:

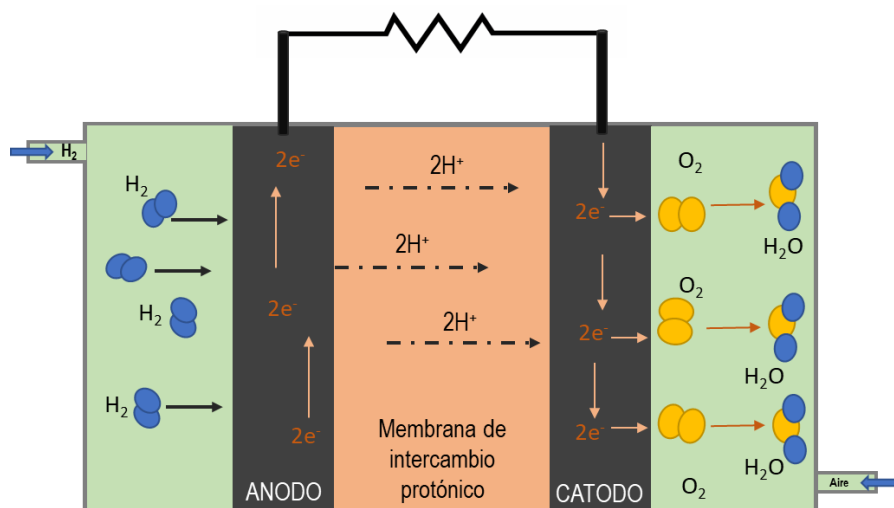
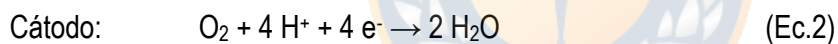
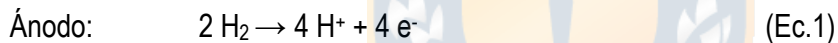


Figura 3. Esquema de una Celda de Combustible de Membrana Polimérica

### 3.2.1 Termodinámica y parámetros electroquímicos

Las celdas de combustible convierten directamente el cambio de energía libre de una reacción electroquímica ( $\Delta G$ ) en energía eléctrica. Se puede relacionar la energía química con la energía eléctrica mediante la siguiente ecuación termodinámica:

$$\Delta G = -nFE^0 \quad (\text{Ec.4})$$

Donde  $n$  es el número de electrones intercambiados,  $F$  es la constante de Faraday (96480 C/mol) y  $E^0$  es el potencial de la celda en equilibrio termodinámico, también denominado fuerza electromotriz ( $E_{fem}$ ).

El potencial de equilibrio ( $E_{fem}$ ) se define como la diferencia de los potenciales de equilibrio de las reacciones electroquímicas que ocurren en el cátodo ( $E_c^0$ ) y en el ánodo ( $E_a^0$ ) (ver ec. 5). Sin embargo, el potencial de celda experimental ( $E$ ) es inferior al valor termodinámico ( $E_{fem}$ ). La caída de potencial respecto al valor de potencial en equilibrio se le denomina sobrepotencial ( $\eta$ ) y se determina mediante la ecuación 6.

$$E_{fem} = E_{cat}^0 - E_{an}^0 \quad (\text{Ec.5})$$

$$\eta = E - E_{fem} \quad (\text{Ec.6})$$

El sobrepotencial ocurre debido a diferentes fuentes: i) Cinética electroquímica (sobrepotencial de activación), ii) Resistencia eléctrica (sobrepotencial óhmico) y iii) Transferencia de masa (sobrepotencial de concentración).

i) Sobrepotencial de Activación ( $\eta_{act}$ ): Termodinamicamente para que una reacción electroquímica se lleve a cabo solo se requiere un potencial aplicado superior al potencial de equilibrio. Sin embargo, desde el punto de vista cinético la velocidad de reacción electroquímica es proporcional a la diferencia entre el potencial aplicado y el termodinámico (equilibrio). Además, la dependencia que existe entre este sobrepotencial y la intensidad de corriente resultante dependerá de la superficie electródica y de la temperatura. El  $\eta_{act}$  se describe mediante la ecuación de Butler-Volmer (Ec.7)

$$j_{neta} = j_0 \left[ \exp \left( \alpha_a \left( \frac{nF}{RT} \right) \eta_{act} \right) - \exp \left( \alpha_c \left( \frac{nF}{RT} \right) \eta_{act} \right) \right] \quad (\text{Ec.7})$$

Donde  $j_0$  es la densidad de corriente de intercambio,  $\alpha_a$  y  $\alpha_c$  son los coeficientes de transferencia de carga para la reacción anódica y catódica, respectivamente,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  la constante universal de los gases y  $T$  la temperatura.



ii) Sobrepotencial Ohmico ( $\eta_{ohm}$ ): en una celda electroquímica hay pérdidas energéticas que se relacionan con resistencias al flujo de iones generadas por el electrolito, cables, conexiones y colectores de corriente. Al existir este tipo de pérdidas se produce una caída del potencial, cuyo valor será proporcional a la intensidad de corriente que se genere o se consuma en la celda electroquímica. Su comportamiento obedece a la ley de Ohm (Ecuación 8)

$$\eta_{ohm} = j * R \quad (\text{Ec.8})$$

Donde R es la resistencia total. Esta R debe tener en cuenta a todos los elementos de la celda y se puede determinar a partir de la siguiente ecuación:

$$R = R_e + R_i + R_c \quad (\text{Ec.9})$$

Donde  $R_e$  es la resistencia al flujo electrónico,  $R_i$  es la resistencia al flujo iónico y  $R_c$  representa las resistencias derivadas del contacto entre los diferentes componentes de la celda.

iii) Sobrepotencial de Concentración ( $\eta_{conc}$ ): este sobrepotencial surge debido a la falta de reactivos que llegan a los centros activos del electrodo donde se produce la reacción electroquímica. El  $\eta_{conc}$  tiene una dependencia con la densidad de corriente, la concentración de los reactivos y de la temperatura. Su comportamiento se asocia con la ecuación de Nerst (Ec. 10)

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln(\Pi) \quad (\text{Ec.10})$$

Donde  $\Pi$  es la concentración en el equilibrio de la especie reducida dividido la concentración de la especie oxidada  $\left(\frac{C_{red}}{C_{ox}}\right)$ .

Finalmente, en una celda de combustible la relación entre sobrepotencial e intensidad de corriente se puede expresar mediante las siguientes ecuaciones:

$$E = E^0 - (\sum \eta_a + |\sum \eta_c| + IR_\Omega) \quad (\text{Ec.11})$$

Donde  $\sum \eta_a$  y  $\sum \eta_c$  es la suma de los sobrepotenciales ( $\eta_{act} + \eta_{conc}$ ) para el ánodo y cátodo, respectivamente.  $IR_\Omega$  representa los sobrepotenciales ohmicos existentes en la celda.

### 3.3 Celda de combustible microbiana

La celda de combustible microbiana (CCM) representa un nuevo enfoque biotecnológico y se define como un dispositivo o reactor bioelectroquímico que convierte la energía química contenida en los enlaces químicos de sustancias orgánicas e inorgánicas a energía eléctrica mediante reacciones catalizadas por microorganismos principalmente bacterias bajo condiciones anaeróbicas (Logan et al., 2006; Schröder, 2007).



### 3.3.1 Principio de funcionamiento

La Figura 4 muestra el esquema CCM típica, la cual consiste de una cámara anódica (condiciones anaeróbicas) y otra catódica (condiciones aeróbicas) separadas por una membrana semipermeable de intercambio protónico (MIP). En el ánodo los microorganismos, a través de su metabolismo, oxidan la materia biodegradable, generando electrones que son transferidos a través de un circuito externo al cátodo. También se produce la liberación de protones, los cuales migran desde el electrolito hacia la membrana de intercambio protónico (MIP). En el cátodo, los protones y electrones se combinan en presencia de  $O_2$ , llevándose a cabo la reacción de reducción de oxígeno formando idealmente agua (4 electrones transferidos) o peróxido de hidrógeno si hay 2 electrones transferidos (Wang y Ren, 2013).

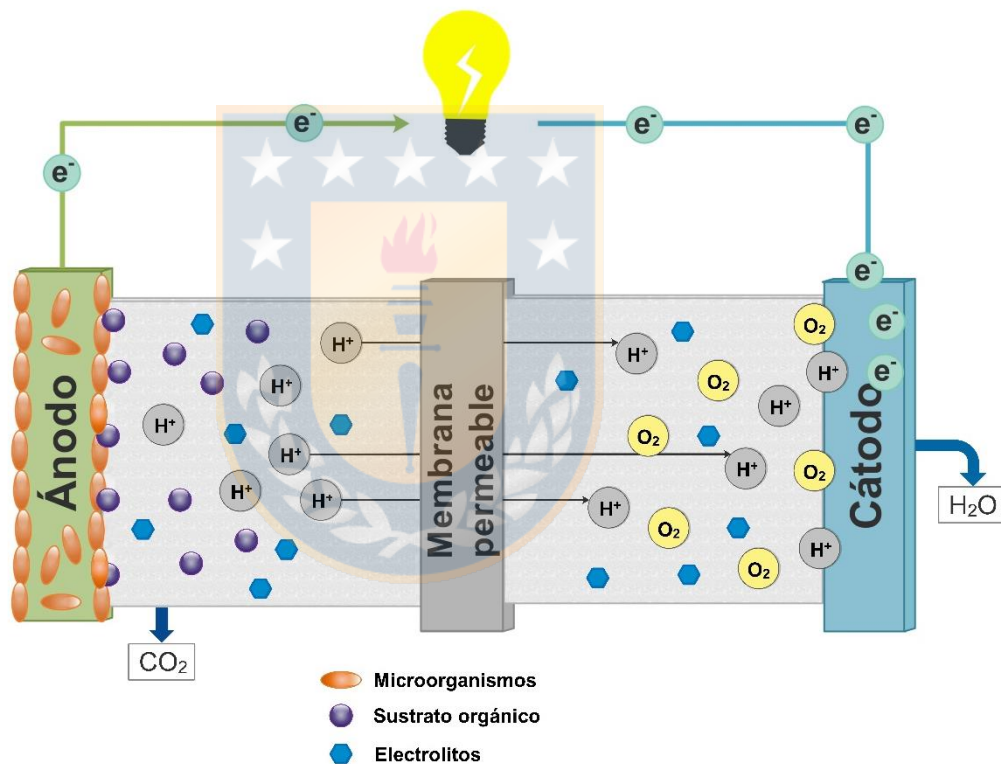
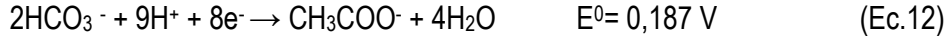


Figura 4. Representación esquemática de una celda combustible microbiana y sus principales procesos.

La celda de combustible microbiana funciona de forma similar a una celda de combustible convencional como la de tipo membrana polimérica. La diferencia radica en que las bacterias son los catalizadores anódicos que llevan a cabo la oxidación del donador de electrones (por ejemplo, glucosa o acetato). Por este motivo las reacciones electroquímicas que ocurren en una CCM pueden ser analizadas en términos

de las reacciones de semi celda de ánodo y cátodo. Por ejemplo, si el sustrato es acetato pueden estar ocurriendo las siguientes reacciones al interior de una CCM:

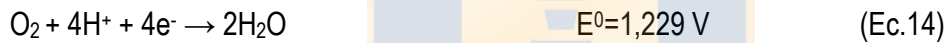


La ecuación 12 representa la oxidación del acetato por la bacteria en el ánodo, pero es escrita como su semi reacción de reducción con un potencial de reducción estándar igual a 0,187 V medido a 298 K y 1 atm de acuerdo al convenio IUPAC. Los potenciales estándar de reducción son informados en función al electrodo normal de hidrógeno (ENH), el cual posee un potencial igual a cero en condiciones estándar (298 K,  $p_{\text{H}_2}=1 \text{ atm}$ ,  $[\text{H}^+]=1\text{M}$ ). Para poder obtener el potencial anódico teórico ( $E_{\text{an}}$ ) en condiciones específicas se utiliza la ecuación de Nerst (Ec.10). De esta forma, por ejemplo, si se tiene que  $[\text{CH}_3\text{COO}^-]=[\text{HCO}_3^-]=5 \text{ mM}$ ,  $\text{pH}=7$ , temperatura=298,15 K,  $\text{pH}=7$  y  $p_{\text{O}_2}=0,2 \text{ atm}$ . El  $E_{\text{an}}$  para la oxidación del acetato (Ec.12) es:

$$E_{\text{an}} = E_{\text{an}}^0 - \frac{RT}{8F} \ln \left( \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{HCO}_3^-]^2[\text{H}^+]^9} \right) \quad (\text{Ec.13})$$

$$E_{\text{an}} = -0,296 \text{ V}$$

Por otra parte, suponiendo que el oxígeno es el aceptor de electrones. En el catodo estaría ocurriendo la reducción del  $\text{O}_2$ :



Por lo tanto, el potencial catódico teórico para la reacción anterior se escribe:

$$E_{\text{cat}} = E_{\text{cat}}^0 - \frac{RT}{4F} \ln \left( \frac{1}{p_{\text{O}_2} [\text{H}^+]^4} \right) \quad (\text{Ec.15})$$

$$E_{\text{cat}} = 0,805 \text{ V}$$

Teniendo ambos potenciales de celda,  $E_{\text{an}}$  y  $E_{\text{cat}}$ , se puede determinar mediante la ecuación 5 el potencial en equilibrio termodinámico de la celda de combustible:

$$E^0 = E_{\text{cat}}^0 - E_{\text{an}}^0$$

$$E^0 = 1.101 \text{ V}$$

### 3.3.2 Producción de energía

El potencial de estos dispositivos es enorme, y ha quedado demostrado en diversos trabajos que reportan su efectividad como sistema bioelectroquímico para el tratamiento de aguas servidas (Rabaey et al., 2007; Du et al., 2007; Pant et al., 2010), creando grandes expectativas en la comunidad científica ya que es posible producir energía limpia mediante la reducción y/o degradación de la materia orgánica que existe tanto en las aguas servidas como otro tipo de aguas residuales. En cuanto a la generación de electricidad, esta puede ser obtenida a partir de compuestos como glucosa o ácidos orgánicos. Respecto a lo anterior,

Liu y Logan, (2004) utilizando las bacterias presentes en el agua servida y glucosa como sustrato, lograron obtener densidades de potencia 146 mW/m<sup>2</sup>. Con estos dispositivos se han observado densidades de potencia de 483 mW/m<sup>2</sup> al ser alimentados con aguas residuales provenientes de la industria cervecera (Wang et al., 2008). Con otro tipo de sustratos más complejos, se ha evidenciado una disminución del color en una muestra contaminada con colorante azo hasta 90,4% en un corto período de tiempo (360 min) acompañado por una generación de bioelectricidad de 700 mV (Zhang et al., 2015). Las CCMs son capaces de recuperar la energía química presente en las aguas servidas y convertirla en energía eléctrica, mientras que la depura eliminando los contaminantes presentes. Por otra parte, el consumo de energía es un 87% más bajo comparado con la tecnología tradicional de lodos activados (Gude, 2016). Este consumo energético mucho menor por parte de las CCMs se debe a que los microorganismos encargados de la degradación de materia orgánica son anaeróbicos o facultativos por lo cual no requieren de un sistema de aireación constante como en un sistema de lodos activados (Gude, 2016). Por último, la generación de lodo luego del tratamiento es aproximadamente entre un 65-71 % menos que el producido en un reactor de lodos activados (Brown et al., 2015). Su aplicación en el tratamiento de aguas residuales es indudable debido a la gran variedad y carga de contaminantes orgánicos presentes en ellas que sirven de combustible (sustrato) a los microorganismos electroquímicamente activos (Pandey et al., 2016). Con respecto a eliminación de nutrientes se ha demostrado la disminución de nitrato en aguas servidas con valores entre 68 y 81% (Viridis et al., 2008), así como la eliminación en un 99% de ácidos orgánicos volátiles (acetato, butirato y propionato) (Kim et al., 2008). Sciarria et al. (2013) trataron la materia orgánica de aguas servidas domésticas obteniendo eficiencias de eliminación de 60% para DQO y 69 % para DBO<sub>5</sub> a partir de una carga de 4000 mg/L con recuperación del 29% de eficiencia coulombica. A su vez, con una carga inicial menor de 671 mg DQO/L se han obtenido eliminaciones del 71,7% de DQO, pero con una eficiencia coulombica de 0,64 % lo que indica una baja transformación de materia orgánica en energía eléctrica (Nimje et al., 2012). Otra investigación muestra su aplicación en el tratamiento de aguas servidas para la degradación de contaminantes recalcitrantes como fenol, logrando un 95% de eliminación en aproximadamente 60 h (Luo et al., 2009). Para mejorar el desempeño de las CCMs, se deben considerar varios aspectos que influyen en su desempeño como los parámetros operacionales y configuración de la celda. Relacionado con lo anterior, la eficiencia en las CCMs ha sido reportada en términos de la velocidad de conversión del sustrato que depende de la biopelícula establecida sobre los electrodos, crecimiento de la biopelícula, transferencia de masa y velocidad de carga orgánica. También la superficie de los electrodos y sus características electroquímicas son parámetros importantes que

influyen en el comportamiento de las CCMs (Hernandez-Fernandez et al., 2015). Las velocidades de carga orgánica pueden tener un efecto significativamente negativo sobre la actividad electrogénica asociada con la capacidad de los microorganismos involucrados para transformar la materia orgánica en energía eléctrica y la pérdida de potencial en las CCMs. Un estudio evaluó 4 cargas orgánicas diferentes 1,98, 3,96, 5,93 y 7.98 kg DQO/m<sup>3</sup> dando como resultado 256 mV, 72.60 mW/m<sup>2</sup>; 290 mV, 112.87 mW/m<sup>2</sup>; 320 mV, 158.58 mW/m<sup>2</sup> y 346 mV, 205,61 mW/m<sup>2</sup>, respectivamente. Se puede observar que a mayor carga se obtiene mayor diferencia de potencial y densidad de potencia, aproximadamente un 10 y 29% respectivamente, (Velvizhi y Mohan, 2011).

### **3.3.3 Aspectos microbiológicos**

La capacidad de los microorganismos para generar electricidad en una celda de combustible fue reportada por primera vez en el año 1910 por Potter quien utilizó *E. coli* y electrodos de platino. La pequeña cantidad de electricidad generada por parte de estos microorganismos hizo pasar desapercibido el estudio al interior de la comunidad científica (Schröder, 2007). Cohen en 1931 como continuación al trabajo de Potter desarrolló celdas de combustibles microbianas conectadas en serie, las cuales demostraron generación de energía a partir de hidratos de carbono degradados por microorganismos, obteniendo voltaje de 35 V y 0.2 mA de corriente (Lovley 2006). En 1991 Habermann y Pommer fueron los pioneros en utilizar una celda combustible biológica para el tratamiento de aguas servidas. Se operó durante 5 años mostrando buen funcionamiento respecto a la depuración del agua servida. Sin embargo, la energía eléctrica producida no fue estable ni dominante durante el experimento. Con respecto a la generación de electricidad, las celdas de combustible microbianas han incrementado su desempeño entre 5 a 6 órdenes de magnitud en la última década debido a la optimización que han tenido estos sistemas (Logan, 2009). Uno de los factores que ha influido en la mejora de las CCMs es conocer cuáles son los microorganismos que tienen la capacidad de generar electrones a través de su metabolismo y poder intercambiarlos desde el interior de sus células hacia un aceptor electrónico sólido, como óxidos metálicos en ambientes naturales o electrodos a nivel de laboratorio. A estos organismos se les ha denominado microorganismos electroquímicamente activos (MEAs). Aunque también son conocidos como electricígenos, exoelectrígenos o bacterias que respiran electrones.

#### **3.2.4.1 Microorganismos involucrados en la generación de electricidad**

Existe gran abundancia y diversidad de microorganismos electroquímicamente activos en ambientes naturales de tipo subsuperficiales anaeróbicos como sedimentos marinos, suelos terrestres o arrozales

(Doyle y Marsili, 2015; Lovley, 2006). En estos ambientes los potenciales redox son bajos y hay una concentración limitada de nutrientes lo que facilita la aparición de vías metabólicas reductoras de metales. Además, pueden ser encontrados en aguas residuales de la industria cervecera, porcina y láctea. Así como aguas servidas, lodos activados y lodo anaeróbico también han servido como fuente de inóculo (Pandey et al. 2016). Se ha demostrado que las comunidades microbianas electroquímicamente activas poseen características diferentes en cuanto a especies, composición y generación de electricidad dependiendo del origen de la fuente o inóculo utilizado (Pant et al. 2010).

Las comunidades microbianas asociadas a los ánodos de las celdas de combustible microbianas han evidenciado una gran diversidad de géneros bacterianos dependiendo de la naturaleza del inóculo, del tipo de sustrato (combustible) y del material electrodico utilizado (Kiely et al., 2011). Mediante análisis filogenéticos se sabe que estos microorganismos pertenecen al filo Proteobacteria donde se han encontrado MEAs en las 5 clases:  $\alpha$ -Proteobacteria (*Rhodospseudomonas palustris*),  $\beta$ -Proteobacteria (*Rhodoferrax ferrireducens*),  $\gamma$ -Proteobacteria (*Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*),  $\delta$ -Proteobacteria (*Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens*) y  $\epsilon$ -Proteobacteria (*Arcobacter butzleri*). Así como también en el filo Acidobacteria (*Geothrixfer beijenrinckii*), Bacteroidete y Firmicus (*Clostridium butyricum*) (Zhang et al. 2015). Dentro de esta gran gama de microorganismos también se han reportado algunas especies que pertenecen al reino Fungi como *Saccharomyces cerevisiae* o *Hansenula anomala* (Prasad et al. 2007). En la Tabla 3 se muestra una clasificación y las características de los principales MEAs encontrados en literatura.

**Tabla 3.** clasificación y características de los microorganismos electroquímicamente activos encontrados en celdas combustibles microbianas

Clasificación			Características			Ref.
Phylum	Clase	Especie	Requerimiento O <sub>2</sub>	Mecanismo de transferencia electrónica	Sustrato oxidable	
Proteo-bacteria	α proteo-bacteria	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Acidiphilium cryptum</i>	Anaeróbico facultativo	<b>Directo:</b> citocromos tipo-C	Acetona, formiato, butirato, propionato, lactato, acetato, fumarato, etanol	Xing et al. 2008
	β proteo-bacteria	<i>Rhodofex ferrireducens</i> <i>Comamonas denitrificans</i>	Anaeróbico facultativo	<b>Directo:</b> citocromos tipo-C	Ácidos fumárico, láctico, pirúvico, malónico y acético	Li et al. 2018
	γ proteo-bacteria	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Shewanella oneidensis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	Anaeróbico facultativo	<b>Directo:</b> citocromos tipo-C y nanoalambres. <b>Indirecto:</b> mediador exógeno (fenazina)	Glucosa, lactato, colorantes	Liu et al. 2012 Kim et al. 2004
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeróbico estricto	<b>Indirecto:</b> secreción endógena de mediador (flavinas, quinonas, hidroquinonas)		Pham et al. 2003
	δ proteo-bacteria	<i>Geobacter metallireducens</i> <i>Geobacter sulfurreducens</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Desulfobulbus propionicus</i> <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Anaeróbico estricto	<b>Directo:</b> citocromos tipo-C y nanoalambres <b>Directo:</b> nanoalambres <b>Indirecto:</b> secreción endógena de mediador (flavinas)	Ácido acético, hidrógeno molecular, etanol, benceno, ácidos grasos volátiles, ácido cítrico, fumárico, ácido málico.	Ishii et al. 2008 Kang et al. 2014 Bond et al. 2002
Firmicutes	Clostridia	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium beijerinckii</i>	Anaeróbico estricto	<b>Indirecto:</b> secreción endógena de mediador (rivo flavinas)	Glucosa, lactato, compuestos complejos como almidón, melazas	Park et al. 2001 Niessen et al. 2004
Acidobacteria	Holophagae	<i>Geothrix fermentans</i>	Anaeróbico estricto	<b>Indirecto:</b> secreción endógena de mediador (flavinas)	Ácidos acético, succínico, málico, láctico, propiónico	Luo et al. 2015

Por otro lado, se han identificado algunas bacterias que resaltan en su facilidad para transferir electrones de forma directa hacia el electrodo en una celda de combustible microbiana. Estas bacterias pertenecen al género *Geobacter* y *Shewanella*, y han sido caracterizadas en cuanto a sus mecanismos de transferencia electrónica, siendo tomadas como modelos en los sistemas bioelectroquímicos utilizando con éxito sus cultivos puros para degradar materia orgánica y generar electricidad (Yang et al., 2012). Ejemplo de lo anterior es la especie *Geobacter sulfurreducens* usada para estudiar la formación de biopelículas electroquímicamente activas sobre un ánodo de grafito en una CCM tradicional. Esta bacteria mostró buena capacidad de generación de electricidad con valores de  $180 \text{ A/m}^3$  (Call y Logan, 2011). Por otro lado, la utilización de cultivos mixtos o consorcios microbianos ofrecerían una mayor capacidad metabólica en comparación a los cultivos puros debido a la gran diversidad de microorganismos que presentan (Kiely et al., 2011). De esta forma serían más útiles para degradar sustratos complejos como los contenidos en las aguas servidas. El lodo anaeróbico utilizado como inóculo ha mostrado ser útil en la degradación de hidratos de carbono, lo cual fue observado por Breecroft et al. (2012) al estudiar la generación de electricidad degradando sacarosa en una celda de combustible microbiana de cámara simple inoculando un ánodo de felpa de carbono obteniendo una densidad máxima de potencia de  $1,79 \text{ W/m}^3$ .

Entre los cultivos mixtos reportados se tiene lodo anaeróbico (Ryu et al, 2013), aguas servidas (Thygesen et al., 2011), lodo activado (Jiang et al., 2013), varios tipos de sedimentos marinos (Holmes et al., 2004) y consorcios microbianos metanogénicos y sulfatoreductores (Poggi-Varaldo et al., 2009). Los consorcios microbianos también se han usado para degradar mezclas de sustratos complejos (aguas servidas), evaluando su desempeño en la generación de energía eléctrica. Jiang et al. (2013) estudiaron el comportamiento de una CCM de flujo ascendente frente a la depuración de agua servida y la generación simultánea de electricidad. Utilizaron electrodos de carbono inoculados con una mezcla de lodo activado y efluente de clarificador primario, obteniendo 78% de eliminación de DQO y una densidad de potencia igual a  $481 \text{ mW/m}^3$ . A pesar de ello, en la mayoría de los casos no se ha podido identificar de forma específica el microorganismo predominante que muestra una participación activa en el proceso electrogénico ya que parte de esa población probablemente recurra a metabolitos alternativos como fermentaciones del sustrato utilizado. Por esta razón, se requiere una mejor comprensión de los microorganismos



electroquímicamente activos y de la comunidad microbiana en una CCM. El conocimiento sobre la estructuración y como están funcionando las diferentes comunidades microbianas dentro de una CCM son uno de los factores clave para maximizar la producción de energía en aplicaciones prácticas. A través de diversas técnicas para estudios microbiológicos en las CCM se pretende comprender las funciones y el potencial de los microorganismos involucrados en la mejora de la potencia eléctrica. Se han hecho avances significativos con una variedad de técnicas microbiológicas y electroquímicas para entender su morfología, potencial genético y su capacidad metabólica, las que están relacionadas con la generación de electricidad en un CCM. Por ejemplo, con técnicas pre-genómicas y genómicas como la filogenia y metagenómica basada en 16S rRNA han proporcionado información importante sobre la estructura y potencial genético de las comunidades microbianas que colonizan los electrodos (Kimura y Okabe, 2013; Sciarria et al., 2013). Técnicas post-genómicas como metatranscriptómica permite caracterizaciones funcionales de las comunidades presentes en la biopelícula de los electrodos mediante la cuantificación de los niveles de expresión genética (Ishii et al., 2013). También mediante diferentes análisis electroquímicos como la voltametría cíclica es posible describir la cinética de transferencia electrónica, los mecanismos de reacciones en el electrodo, determinar potenciales de especies químicas o biológicas y para evaluar el rendimiento de los materiales electródicos. Otra técnica bastante utilizada es la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) que entrega información detallada sobre la resistencia óhmica, transferencia de carga y de masa a partir de los análisis de Nyquist y Bode (Zhao et al., 2009; Liu y Bond, 2012). Por último, la combinación de las técnicas electroquímicas, filogenéticas, metagenómicas y post-metagenómica ofrece oportunidades para una mejor comprensión del proceso de transferencia extracelular de electrones, que podría conducir a la optimización de la producción de energía.

#### **3.2.4.2 Mecanismos de transferencia electrónica extracelular microbiana**

El factor más importante para que una CCM genere una corriente de electrones por un circuito externo, que pueda ser utilizada como electricidad, son los microorganismos que degradan la materia orgánica a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O junto con la liberación de protones al sistema y de e<sup>-</sup> a un circuito externo. Para que los electrones generados en la cadena respiratoria lleguen desde el interior del microorganismo hasta la superficie electródica se necesitan condiciones anaeróbicas, ya que en presencia de oxígeno el proceso de reducción sería más eficiente que cualquier otro proceso



reductivo, y por tanto no se podrían aprovechar los electrones (Chang et al., 2006; Rabaey et al., 2007). Se han planteado diferentes mecanismos para explicar cómo los microorganismos electroquímicamente activos liberan los electrones desde el interior de sus células al electrodo, estos son dos: (a) transferencia directa y (b) transferencia indirecta o mediada (Kosch et al., 2016). Los mecanismos de transferencia electrónica directa (ver Figura. 5a) implica un contacto físico entre la membrana de la célula bacteriana y el aceptor sólido (ánodo). Son los más eficientes ya que se transfieren los electrones al ánodo con la ayuda de proteínas localizadas en la membrana celular denominadas citocromos tipo C. Otra forma directa que permite al microorganismo alcanzar y utilizar aceptadores de electrones sólidos más distantes sin un contacto físico completo de la célula ocurre a través de conductos proteicos llamados pilis que funcionan como nanocables (ver Figura. 5a) (Kosch et al. 2016).

Por otro lado, los mecanismos de transferencia indirecta o mediada (ver Figura 5.b) ocurren debido a la naturaleza no conductiva de la membrana celular de ciertos microorganismos electroactivos. Para realizar esta transferencia electrónica se utilizan mediadores redox. Estos son compuestos que pueden interactuar con la célula y aceptar electrones de los conductores intracelulares convirtiéndose a su estado reducido pudiendo donar los electrones al ánodo. Existen dos tipos: (a) endógenos que son sintetizados por el mismo organismo como flavinas, pirocianinas o quinonas, entre otras (Goud et al., 2013) y (b) exógenos que son sustancias adicionadas externamente como ferricianida, tionina, azul de metileno o EDTA (Du et al., 2007). Es importante mencionar que los mecanismos de transferencia electrónica recién nombrados no son exclusivos de un organismo en particular y además pueden ocurrir en paralelo.

Mediante técnicas electroquímicas como voltametría cíclica e impedancia electroquímica (Babauta y Beyenal, 2014; Yuan et al., 2011) y de microscopia como la de efecto túnel o de barrido electrónico (Zhi et al., 2014), se han podido identificar cuáles son los mecanismos de transferencia electrónica ocupada por los diferentes microorganismos tanto en cepas puras como cultivos mixtos utilizados en CCMs. Por ejemplo, bacterias del género *Geobacter* o *Rhodospirillum rubrum* transfieren únicamente de forma directa los electrones hacia el electrodo mediante pilis y citocromos tipo c localizados en la membrana celular externa (Kumar et al., 2016). En cambio, *Shewanella* puede transferir sus electrones directamente a través de proteínas tipo CymA unidas a la membrana interna, MtrA proteína plasmática o citocromos tipo c unidas a la membrana externa. Además de

forma indirecta *Shewanella* genera diferentes tipos de apéndices filamentosos que incluyen pili-Msh, pili tipo IV y flagelos (Yang et al., 2012).

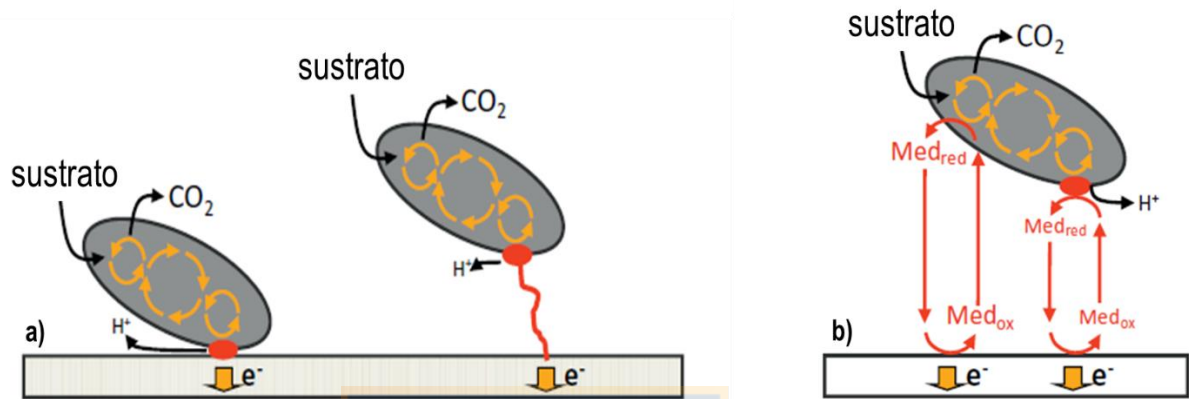


Figura 5. Esquema de los mecanismos de transferencia electrónica microbiana. a) transferencia directa (citocromos o pili) y b) transferencia electrónica indirecta (mediador redox).

#### 4. AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS Y LA PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACION

El planeta está sufriendo los desafíos que conlleva la escasez de energía no renovable y la contaminación ambiental. Para hacer frente a esta situación es que urge explorar algunas tecnologías sostenibles. Las tecnologías integradas para la depuración de aguas, reducción de desechos y la producción de productos de valor son actualmente el foco de muchos temas de investigación sostenible. Además, existe un gran interés por explorar recursos energéticos alternativos que puedan permitir un aumento sostenible equilibrando la demanda y el suministro de energía.

##### 4.1. Celdas de combustible microbianas integradas en humedales construidos

A partir de la búsqueda de tecnologías más sostenibles surge una innovación que ha ganado atención gracias a su potencial uso como sistema recuperador de energía en forma de electricidad durante el tratamiento de aguas servidas (Doherty et al., 2015). Dicha tecnología consiste en la integración de una celda de combustible microbiana (CCM) en humedales construidos (HC) dando

origen a los sistemas de tipo HC-CCM (ver Figura 6). La factibilidad de integrar humedales construidos y celdas de combustible microbianas se debe a la compatibilidad que presentan dichas tecnologías. Primero, ambas requieren la acción de microorganismos para degradar contaminantes de las aguas servidas. En segundo lugar, la CCM requiere que el ánodo permanezca en un ambiente libre de oxígeno y el cátodo por otra parte necesita estar bien oxigenado, condiciones que se desarrollan de forma natural y se encuentran bien definidas en los HCs. Por lo tanto, se han encontrado similares condiciones de potencial de oxido-reducción en los HCs y en las CCMs (Corbella et al., 2014). Es así como, las investigaciones existentes al respecto ocupan por lo general sistemas de HCs de flujo vertical, donde puede desarrollarse un gradiente de potencial significativo a lo largo de su altura. De esta forma se logra un ambiente estratificado en una zona aeróbica en la parte superior (300 a 700 mV) y una zona anaeróbica en la parte inferior (-300 a 100 mV) del humedal. Lo anterior fue confirmado por Fang et al. (2016) al medir el potencial de oxido-reducción (POR) a distintas alturas del sistema compuesto por un humedal construido de flujo vertical y electrodos de carbono activado granular, obteniendo valores entre -400 a -100 mV para el compartimento anódico (zona anaeróbica) y entre 5 a 150 mV para el compartimento catódico (zona aeróbica). Con la integración de CCMs en HCs también se pretende eliminar la necesidad y costos asociados a la construcción de una celda ya que se aprovechan las condiciones redox que existen en los humedales construidos y mientras se depura el agua servida se genera simultáneamente energía eléctrica ocupando el mismo espacio físico. En otras palabras, el mismo humedal construido puede, comportarse como una celda de combustible microbiana lo que permite trabajar a una escala mayor que la tecnología de CCM sola, con grandes volúmenes de líquido para ser tratados.

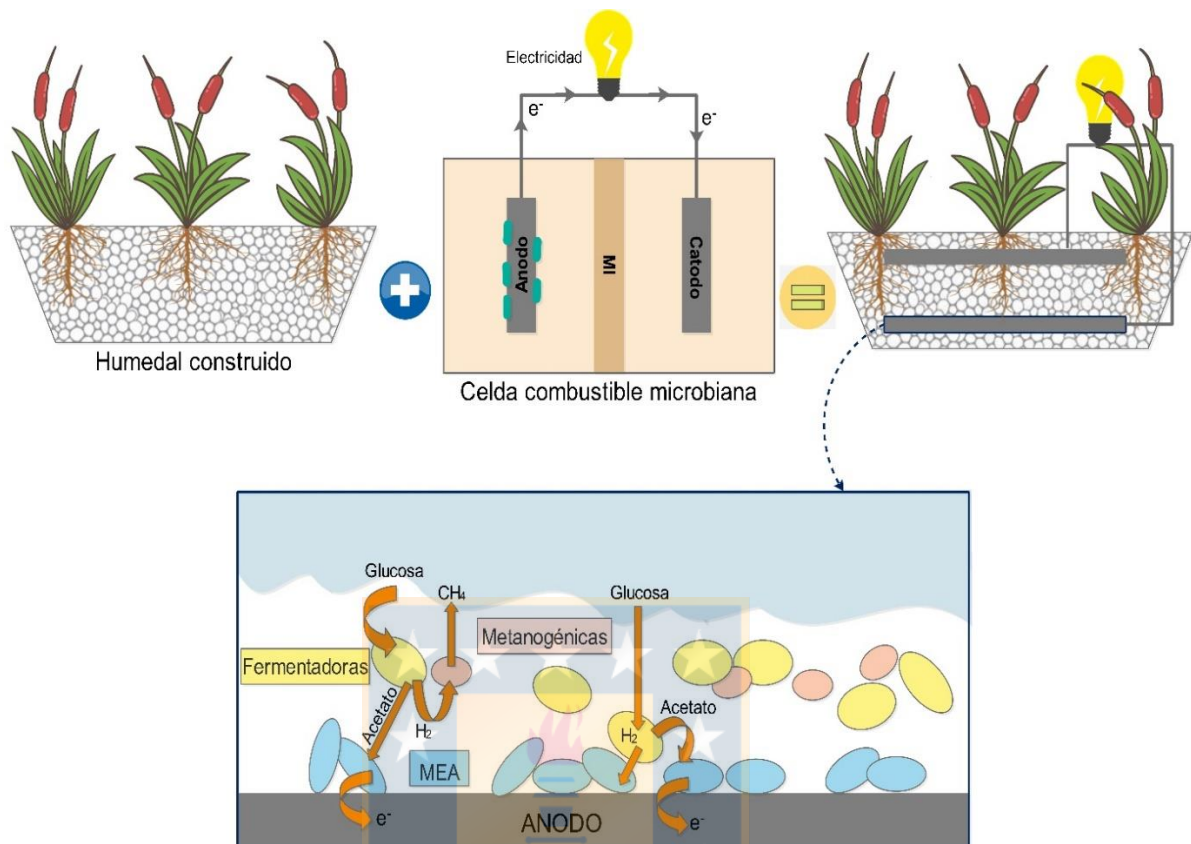


Figura 6. Representación esquemática del sistema integrado HC-CCM.

#### 4.1.1. Configuración y operación de HC-CCM

La integración de HC y CCM se ha estudiado durante los últimos 7 años, pero aún se encuentra en la etapa de desarrollo para el tratamiento de aguas servidas y generación de bioelectricidad. La mayoría de los trabajos con HC-CCM se ha enfocado en estudiar la mejor configuración con la cual obtener la máxima electricidad al optimizar el gradiente redox dentro del sistema integrado. Para esto, en todos los estudios, la posición de los electrodos es siempre la misma. El ánodo está enterrado en la parte inferior (anaeróbica) y el cátodo se coloca en la superficie aeróbica o parte superior para crear un máximo gradiente de potencial al interior del sistema. La variedad se da en el tipo de humedal construido que puede emplearse, ya sea vertical u horizontal. De esta forma se puede manejar la dirección de alimentación del flujo, lo que influye en mejorar las condiciones de estratificación del sistema integrado. En el caso de alimentación en modo ascendente en CW-MFC,

no se usó ningún separador, ya que las aguas residuales primero entran en contacto con la zona anaeróbica y luego en la zona aeróbica donde se colocan el ánodo y el cátodo, respectivamente. Por otra parte, una gran cantidad de los experimentos reportados no utilizaron aguas servidas reales y la mayoría de ellos se basó en la aplicación de sistemas a escala de laboratorio de humedales cosntruidos. Solo Villaseñor et al. (2013) integraron una CCM en un humedal construido a escala piloto obteniendo elimianciones de DQO cercanas al 65% y una generación de voltaje igual a 250 mV. Tanto el uso de aguas sintéticas como trabajar a escala de laboratorio garantizan condiciones constantes y controlables a lo largo del período experimental, pero difieren de la realidad de una planta de tratamiento de humedales construida a escala real.

Otro parámetro operacional evaluado fue el uso de lana de vidrio como separador. En los estudios donde no se usó separador, las aguas servidas con un régimen de flujo ascendente primero entran en contacto con la zona anaeróbica y luego en la zona aeróbica donde se colocan el ánodo y el cátodo, respectivamente (Fang et al., 2013; Liu et al., 2013). La distancia entre ambos electrodos no fue suficiente, lo que resultó en una mayor resistencia óhmica y una menor generación de energía eléctrica. Xu et al. (2018) determinaron el impacto del separador en el rendimiento eléctrico del sistema HC-CCM. Se instalaron en paralelo dos sistemas HC-CCM de flujo ascendente, con y sin lana de vidrio y se monitoreó durante más de 4 meses. Los resultados mostraron que el voltaje más alto se logró en el sistema sin separador (NS) ( $465,7 \pm 4,2$  mV con un espacio entre electrodos de 5 cm), que fue 49% más alto que el valor más alto generado en el sistema con separador (CS) ( $312 \pm 7,0$  mV con espacio entre electrodos de 2 cm). La mayor densidad de potencia se generó en el sistema NS ( $66,22$  mW/m<sup>2</sup>), que fue 4 veces mayor que el valor en el sistema CS ( $17,14$  mW/m<sup>2</sup>). Al parecer la difusión de oxígeno desde el aire libre fue obstaculizada en gran medida por la biopelícula formada por la cara inferior del cátodo.

La presencia de plantas en los sistemas integrados puede tener diferentes efectos en el rendimiento de los sistemas. La influencia de las plantas en el rendimiento de HC-CCM se ha abordado bastante (Oon et al., 2017). En un HC las plantas influyen en su rendimiento debido a la capacidad que poseen para liberar oxígeno o sustratos fácilmente biodegradables a través del sistema radicular. Por lo tanto, la configuración de un HC-CCM puede diseñarse para colocar la rizosfera en el área catódica para fomentar la presencia de oxígeno, pero también dentro del área anódica, suponiendo que los exudados se oxiden para producir energía (Xu et al., 2016). En

consecuencia, se ha informado que los depósitos de rizho son un único donante de electrones viable que produce electricidad sin ninguna otra adición de nutrientes (Lu et al., 2015). También se ha informado que la presencia de plantas estimula la diversidad microbiana (Lu et al., 2015) y produce corrientes más altas (Fang et al., 2013) en comparación con los sistemas no plantados.

#### **4.1.2 HC-CCM como sistema de tratamiento de aguas servidas**

De acuerdo a lo informado en la literatura los sistemas integrados HC-CCM presentan altas eficiencias de eliminación de materia orgánica, los valores expresados como DQO oscilan entre 44,5 (Wang et al., 2016) y 100% (Oon et al., 2015).

La primera experiencia fue reportada por Yadav et al. (2012) con un HC-CCM a escala de laboratorio usado para la eliminación de colorante azul de metileno, DQO y generación simultánea de energía a partir de aguas residuales sintéticas a diferentes concentraciones de colorante. El sistema integrado funcionó en modo discontinuo durante 96 h y logró una eliminación máxima de DQO del 75% a 1500 mg/L de concentración inicial de colorante. Hasta ahora las aplicaciones se han expandido desde contaminantes convencionales como materia orgánica y los nutrientes a compuestos más complejos de degradar como productos farmacéuticos. Por ejemplo, en el ámbito de los contaminantes convencionales, se probó un sistema integrado a base de lodo de alumbre para la eliminación de materia orgánica y nutrientes, junto con la producción de electricidad a partir de un agua residual porcina. La prueba incluyó una configuración a escala de laboratorio alimentado de forma simultánea con flujo ascendente/descendente, logrando eficiencias de eliminación de 64% de DQO, 75% de amonio y 86% para fósforo total (Doherty et al., 2015). Otra investigación bajo una configuración de flujo ascendente fue evaluada para la eliminación de DQO y nitrógeno a partir de aguas servidas sintéticas, experimentando con diferentes cargas orgánicas y configuraciones. Después de 1 día de tiempo de retención hidráulica (TRH), las eficiencias de eliminación promedio fueron 99%, 46% y 96% para DQO,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente (ref).

En general, la CCM fomenta la degradación de materia orgánica logrando una mejor calidad de las aguas residuales en los efluentes de los sistemas convencionales conectados (circuito cerrado) en comparación con los no conectados (circuito abierto). En HCs la degradación de materia orgánica en zonas anaeróbicas es más lenta y menos eficiente que la oxidación aeróbica debido a la escasez de aceptores de electrones. En este contexto, el ánodo constituye un aceptor de electrones no consumibles en un entorno tan competitivo. Por lo tanto, puede contribuir a mejorar el tratamiento



de la materia orgánica (Huang et al., 2011). Además, la presencia de un circuito eléctrico externo estimula el establecimiento de comunidades electroactivas en biopelículas anódicas (Larrosa-Guerrero et al., 2010). Similar comportamiento ha sido reportado en los sistemas integrados, Srivastava et al. (2015) encontraron que la integración de una CCM contribuye a mejorar la eliminación de DQO entre un 12 a 20% (0,5-0,75 g/L de glucosa). Mientras que en otro trabajo realizado por Fang et al. (2013) se observó una mejora del 12,6% utilizando un colorante azo bio recalcitrante (ABRX3) como sustrato con una DQO de 180 mg/L.

Respecto a la degradación de compuestos complejos se ha investigado la eliminación de antibióticos como tetraciclina y sulfametoxazol en un sistema HC-CCM de flujo ascendente. En dicho experimento, se operó a un TRH de 2,5 días y las aguas residuales de tipo sintéticas enriquecidas con diferentes concentraciones de tetraciclina y sulfametoxazol (200, 500 y 800 g/L) fueron tratadas obteniendo tasas de eliminación superiores al 99,5% para ambos antibióticos (Zhang et al., 2016). Un estudio reciente evaluó la degradación de nitrobenceno de un agua residual sintética con un sistema HC-CCM sin membrana y se comparó con el rendimiento de una CCM convencional. Las concentraciones de nitrobenceno variaron desde 5 a 80 mg/L con glucosa como fuente de carbono (100 a 600 mg/L), operado continuamente en flujo ascendente y 24 h de TRH las eficiencias de eliminación tanto de nitrobenceno como de DQO fueron cercanas al 92 y 78 %, respectivamente (Xie et al., 2018).

#### **4.1.3 HC-CCM para la generación de electricidad**

Uno de los principales beneficios que se obtienen de la sinergia entre CCMs y HCs es la generación de electricidad al momento de tratar las aguas servidas. Como ya se sabe, una CCM convierte la energía química contenida en los sustratos orgánicos de aguas servidas en energía eléctrica que luego podría ser recolectada, almacenada y utilizada dentro de la misma planta de tratamiento.

Los sistemas HC-CCM han reportado valores de energía eléctrica mucho más bajos que para las CCM convencionales ya que están sujetos a resistencias internas más altas.

El mayor rendimiento eléctrico de los sistemas integrados reportados fue de una diferencia de potencial promedio igual a  $265,8 \pm 12,7$  mV y  $3714,1$  mW/m<sup>2</sup> para la densidad de potencia (Xu et al., 2018) trabajando con electrodos de carbono activado. Sin embargo, no se han informado valores similares al mencionado anteriormente, los valores se encuentran en rangos bastante amplios desde 0,08 hasta 226,4 mW/m<sup>2</sup> para aguas servidas de tipo sintéticas. Respecto a la

electricidad producida por los sistemas operados con aguas residuales reales provenientes de purines porcinos, las densidades de potencia registradas fueron de 9,4 mW/m<sup>2</sup> (Zhao et al., 2013) y 276 mW/m<sup>3</sup> (Doherty et al., 2014).

Por otra parte, debido a la naturaleza compleja de las aguas servidas, compuesta por sustratos orgánicos complejos es que la eficiencia coulombica (EC) reportada hasta ahora para los sistemas integrados HC-CCM es significativamente menor que para las CCM convencionales. Los estudios en CCM convencionales que han usado un cultivo puro de *Geobacter sulfurreducens* y acetato como donante de electrones (fuente de carbono) mostró una EC de 80 ± 3% (Speers y Reguera, 2012). Por el contrario, en HC-CC en los que hay una comunidad anódica muy diversa proveniente de un inóculo mixto (consorcio microbiano), donde además se usan moléculas complejas fermentativas como fuente de carbono (glucosa, agua servida), la EC informada varió de 0,01% (Wang et al., 2016) a 14,9% (Liu et al., 2017), lo que está indicando que la mayoría de la materia orgánica se elimina mediante vías de oxidación alternativas y no solo por la vía electrogénica.

Como tal, cualquier cantidad de energía recuperada por parte del sistema puede considerarse como una ganancia de energía neta. Sin embargo, se requiere una mejora drástica tanto en la densidad de potencia como en la eficiencia coulombica. El beneficio en términos de electricidad recuperada frente al aumento de la complejidad operativa y el aumento de los costos de los materiales deben ser estudiados más a fondo ya que por lo general los HCs a menudo usan arena, grava y materiales de desecho.



## CAPITULO II

### **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**



## **1. HIPOTESIS**

La integración de una celda combustible microbiana en un humedal construido genera energía en forma de electricidad mediante la biodegradación de la materia orgánica contenida en las aguas servidas y mejora el rendimiento del humedal construido como sistema de tratamiento.

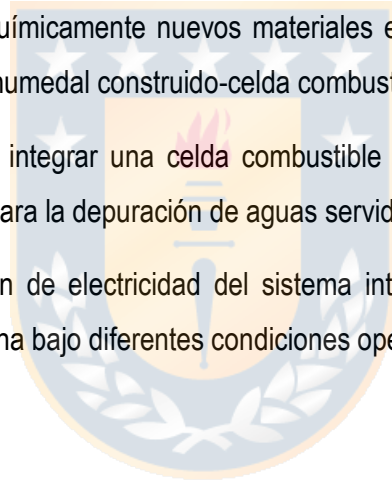
## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la generación de energía en forma de electricidad a partir del tratamiento de aguas servidas mediante la integración de una celda de combustible microbiana en un humedal construido.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar electroquímicamente nuevos materiales electrónicos para su aplicación en sistemas integrados humedal construido-celda combustible microbiana.
- Evaluar el efecto de integrar una celda combustible microbiana en el rendimiento del humedal construido para la depuración de aguas servidas.
- Evaluar la generación de electricidad del sistema integrado humedal construido-celda combustible microbiana bajo diferentes condiciones operacionales y de configuración.



## CAPITULO III



# EFFECT OF ZEOLITE-Fe ON GRAPHITE ANODE IN ELECTROACTIVE BIOFILM DEVELOPMENT FOR APPLICATION IN MICROBIAL FUEL CELLS

**Gonzalez, T., Ureta-Zañartu, M.S., Marco, J.F., Vidal, G. (2019).** Effect of Zeolite-Fe on graphite anode in electroactive biofilm development for application in microbial fuel cells. *Applied Surface Science*, 467-468:851-859.

**Effect of Zeolite-Fe on graphite anode in electroactive biofilm development for application  
in microbial fuel cells**

Thaís González<sup>1</sup>, M. S. Ureta-Zañartu<sup>2</sup>, J. F. Marco<sup>3</sup> and Gladys Vidal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Environmental Engineering & Biotechnology Group, Environmental Science Faculty & EULA–CHILE Center, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias del Ambiente, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. C. Libertador Bernardo O'Higgins 3363, Estación Central, Santiago, Chile.

<sup>3</sup>Instituto de Química Física "Rocasolano", CSIC, C. Serrano, 119, 28006-Madrid, Spain.



(\*) Corresponding author: Dr. Gladys Vidal

E-mail: [glvidal@udec.cl](mailto:glvidal@udec.cl)

Telephone: 56-41-2204067

Fax: 56-41-2207076

## Abstract

The performance of microbial fuel cells (MFCs) is highly dependent on the electrode materials. The electrode surface can be modified to provide a favorable environment for biofilms to enhance electron transfer from the bacteria to the anode. In this work, Faujasite zeolite-Y (ZY) was exchanged with iron (Fe) and was used to modify glassy carbon/graphite electrodes (GC/gr-ZY<sub>Fe</sub>) evaluating its effect in electroactive biofilm development for application in microbial fuel cells. The novel material was evaluated as an anode in MFCs by comparing its performance with GC/gr and GC/gr-ZY electrodes. The results show that when using a GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> electrode, an electroactive biofilm with good electrochemical activity for acetate degradation can be generated on the electrode surface. The maximum current density obtained with a GC/gr-ZY<sub>Fe</sub>-BF electrode (where BF is biofilm) was 7.7 times higher than that of a GC/gr anode. The modification generates a less hydrophobic electrode surface that facilitates microbial cell attachment, thereby improving bioelectricity production. By using scanning electron microscopy, a homogeneous microbial community with bacteria that had a similar short rod-shaped morphology was observed. Furthermore, electrochemical impedance spectroscopy demonstrated that the charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) decreased as the biofilm grew, revealing that the presence of the biofilm facilitated the electrochemical reaction. After 7 days of MFC operation, the GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> bioanode showed a reduction in  $R_{ct}$  from  $212.9 \pm 1.81 \Omega$  to  $151.5 \pm 1.46 \Omega$ , which was 2.4 times lower than that achieved with GC/gr. The biofilm on GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> was characterized using cyclic voltammetry, and the results showed a larger oxidation peak ( $169.8 \text{ mA cm}^{-2}$ ) than that of the GC/gr electrode ( $36.5 \text{ mA cm}^{-2}$ ), further supporting the better electron-transfer properties of the modified electrode. Additionally, this

result confirms the capability of biofilms to act as bioelectrocatalysts under acetate-oxidizing conditions.

Keywords: microbial fuel cell; anode modification; zeolite Y; biofilm growth; electrochemical characterization.

## 1. INTRODUCTION

Microbial fuel cells (MFCs) are bioelectrochemical devices that convert inorganic and organic waste into electricity using microorganisms as catalysts [1]. The anode is the site where a biocatalyst grows in the form of a biofilm, which promotes the decomposition of biomass to produce electrons and protons. For this reason, the characteristics of the electrode surface crucially affect the bacterial attachment and electrical connection between the bacteria and the electrode surface.

An ideal anodic material must be stable and biocompatible to promote microbial adhesion and biofilm formation; the material must also be conductive to facilitate the transfer and flow of electrons, thus promoting the electron transfer reaction rate on the electrode surface [2, 3]. Materials commonly used as anodes include commercial carbon-based electrodes, such as graphite rods, granular activated carbon, graphite felt and carbon cloth [4, 5]. To improve the anode performance, other types of non-conventional carbonaceous materials such as graphene, carbon nanotubes, conducting polymers, composites and metal oxides have also been developed as electrodes [6-9].

The electrode surface can be modified to become favorable environments for biofilm growth, taking advantage of the film's ability to enhance electron transfer (ET) from the bacteria to the anode surface, thus achieving more efficient anodes. Different surface modification technologies have been developed, such as doping, coating and functionalizing the electrode surface with different

materials [10]. An important aspect to consider regarding the electrode surface is its degree of hydrophobicity or hydrophilicity. An increase in hydrophilicity can be expected if the electrode surface is modified with transition metal oxides due to the presence of OH groups and adsorbed water or a hydroxide anion. Quiao et al. [11] modified a carbon fiber anode with NiO scales, whereby the electrode surface became more hydrophilic, thus improving the microbial adhesion to the electrode surface and directly increasing the electron transfer through the outer membrane and the cytochrome at the anode surface. The authors related this result to the wettability of these surfaces. Fu et al. [12] developed carbon nanotube multilayers with MnO<sub>2</sub> (50% by weight) and reported that the mixed anodes facilitated greater wettability than the electrodes without metal oxides. The increase in wettability improves the reaction rate and increases the power density of MFCs.

A simple and inexpensive method to alter the hydrophobicity of different electrodes is coating their surface with a graphite-zeolite mixture to increase the electrode's real surface area and to generate a change in its hydrophobic-hydrophilic characteristic. Zeolites are a special type of microporous alumino silicate with a three-dimensional structure that extends infinitely in the crystalline lattice [13]. Zeolites are composed of tetrahedrally bonded aluminum oxides (AlO<sub>4</sub>) and silicon oxides (SiO<sub>4</sub>) sharing a bond with an oxygen atom. Although these materials have been used in electrochemical cells [14], their application to MFCs has only been reported by Wu et al. [15]. The authors hydrothermally modified graphite electrodes from a NaX zeolite solution. This NaX zeolite is hydrophilic (Si/Al ratio of ~1.5), which decreases the hydrophobicity of graphite. The authors reported that the results showed a maximum power density and coulomb efficiency of 152% and 36%, respectively, which are higher values than those obtained with unmodified anodes. The improvement in the yield of the MFC was attributed to a super-hydrophilicity characteristic that was

generated due to modification of the anode with zeolite. According to the authors, NaX zeolite promotes this super-hydrophilicity characteristic by forming a thick biofilm, which accelerates the anodic bioelectrochemical reactions.

Alternatively, iron oxides have been used to modify carbon electrodes to increase electron transfer, which occurs due to the high biocompatibility and specific affinity of the outer cell membrane to the bacterial proteins. It was reported that an electrode coated with iron oxides had an approximately 4-fold higher power generation in a MFC that was inoculated with a mixed culture [16]. A great variety of natural and synthetic zeolites exist with different levels of hydrophobicity, and they can be interchanged with transition metals. For example, the Faujasite is a commercial synthetic zeolite with a 2.5 Si/Al ratio, cage structure formed by 12 rings and inner channel system of 7.4 Å x 7.4 Å. It has medium hydrophilicity, so is expected to decrease the hydrophobicity of the GC/graphite surface facilitating biofilm formation on the electrode surface, which leads to an improvement in the electron transfer across the anode; thus, the objective of this work is to modify GC electrodes with a mixture of graphite-ZY exchanged with Fe (GC/gr-ZYFe) and to evaluate its effect in electroactive biofilm development for application in microbial fuel cells. GC electrodes coated with a film of gr-ZYFe were used as anodes and the performance was evaluated through comparison with that of the GC/gr and GC/gr-ZY electrodes.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Zeolite-Y modification and characterization**

Faujasite zeolite (ZY), provided by Aldrich, St. Louis, USA, was used as received. ZY was exchanged with Fe(III) cations (Iron doped zeolite) according to the literature [17]. Briefly, 3.0 g of ZY and the corresponding amount of  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Merk>99%) required for obtaining a metal



loading of 6 wt.% were suspended and dissolved in 60 mL of double bidistilled water. The mixture was stirred at room temperature for 1 hour in a rotary evaporator until it was dry. To remove the Fe(III) that was not exchanged with the ZY, the mixture was washed repeatedly with 1 M and 0.1 M KCl solutions, centrifuged and dried in an oven (Trade RAIPAR®) at 105 °C overnight.

The modified zeolite was characterized using an X-ray photoelectron (XPS) CLAM2 electron analyzer in a vacuum at a pressure greater than  $5 \cdot 10^{-9}$  mbar, with a take-off angle of 90° using Mg  $K\alpha$  radiation. A constant pass energy of 200 eV was used to record the wide-scan spectra, whereas narrow-scan spectra were recorded using a pass energy of 20 eV. The binding energy scale was referenced to the main C 1s signal of the adventitious contamination layer, which was set at 284.6 eV.

The specific surface area of the anodes was evaluated using the Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface areas ( $S_{BET}$ ), and mesopore ( $V_m$ ), micropore and total pore ( $V_{total}$ ) volumes, which were determined by nitrogen adsorption-desorption isotherms at 77 K using a Micromeritics Tristar II instrument.

The morphology of the zeolites and the anodes was characterized by SEM with an ETEC Autoscan 490 LV coupled with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). FTIR-ATR Spectroscopy with a Bruker-Platinum-ATR instrument was used as a chemical characterization tool.

## **2.2. Electrode preparation and physicochemical characterization of the anode**

In a previous work, the graphite-zeolite electrodes were optimized the graphite-zeolite electrodes in terms of their resistance to charge transfer, considering that the zeolites are not conductive. The

optimum value determined was 20% ZY in graphite [18]. Regarding the content of Fe in aluminosilicates, the optimal results were found with Fe at 6 wt. % [19, 20].

A  $ZY_{Fe}$ -graphite suspension was prepared as previously reported [18] (including 50 mg graphite, 0.5 mL Nafion, 20 mg  $ZY_{Fe}$  and 4.0 mL double bidistilled water, sonicated for two hours), and 50  $\mu$ L was collected to be deposited on the surface of a serigraph glassy carbon (GC) electrode (Dropsens 110). The solvent was evaporated in a stove at 60° C for 30 min. GC electrodes coated with graphite and graphite-unexchanged ZY were used as controls. Finally, the GC/gr- $ZY_{Fe}$ , GC/gr-ZY and GC/gr electrodes were stabilized by repetitive cyclic voltammetry (RCV) at 0.1 V s<sup>-1</sup> for 10 scans in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) electrolyte. The real area of the electrode (Rugosity factor,  $R_F$ ) was determined using the method described by Trasatti et al. [21] for graphite electrodes, with the variant proposed by Fernández et al. [18] for graphite-zeolite electrodes. The method includes the determination of the double layer capacity by CV at different scan rates (10, 30, 50 and 100 mV s<sup>-1</sup>), only in the potential range associated with the charge/discharge of the double layer (-0.6 V to +0.6 V vs. Ag/AgCl). The slope of a plot of the capacitive current density ( $j_{dl}$ ) against the potential scan rate ( $v$ ) corresponds to the double layer capacity. The reference value for the double layer capacitance was obtained using a mirror-polished GC electrode (CHI) and is considered a unit roughness factor reference,  $C^\circ$ . Modified electrodes have areas over 20 times greater than the GC electrode that was used as a reference.

### **2.3. MFC construction, inoculation and operation**

For the formation of the biofilm, the experiments were carried out in triplicate. The system consisted of two compartment glass cells, separated by a glass key that is kept wet to allow the flow of ions. The volume of each compartment was 100 mL and a distance of 10 cm between the electrodes.

MFCs with modified GC electrodes (0.130 cm<sup>2</sup> geometric area) as the anode material (working electrode) and Pt (spiral, large area) as the cathode were prepared, and their electrochemical behavior was determined. The anodes include graphite (GC/gr), graphite-zeolite (GC/gr-ZY) and graphite-iron-exchanged zeolite (GC/gr-ZY<sub>Fe</sub>). The anode was connected through an electrical resistance of 100 ohms with the cathode during the inoculation process. The anodic compartment was inoculated with a mixed sludge. This mixture contained 50 % primary clarifier (Primary treatment) and 50 % activated sludge (Secondary treatment) from the domestic wastewater treatment plant (Concepción, Chile) and were fed with a growth medium containing CH<sub>3</sub>COONa (0.82 g L<sup>-1</sup>) in 10 mM PBS (pH 7.4; 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g KCl and 8 g NaCl up to a 1 L aqueous solution), 0.7 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0.2 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, and 1 mL L<sup>-1</sup> of a solution of trace elements (content per liter: 0.25 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and 0.1 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>). The system was maintained under constant stirring using a magnetic stirrer. To ensure anaerobic conditions, the growth medium together with the inoculum were purged with nitrogen for 30 min prior to use. The cathode compartment was filled with 80 mL of PBS (pH 7.4) and maintained with permanent aeration. The MFCs were operated at room temperature (30 °C ± 1 °C) in fed-batch mode for 7 days. The concentration of the acetate anion in the growth medium was controlled, remaining practically constant during the entire process. Each time that substrate depletion was observed (via a voltage decrease), 50 mL of solution was removed and replaced by the same volume of a new acetate-PBS solution.

#### **2.4. Electrochemical measurements**

Electrochemical measurements were performed with a CHI Instruments 660-C workstation with a 3-electrode configuration, including a working electrode (the prepared anodes), a Ag/AgCl reference

electrode (3 M KCl,  $E^\circ = 0.194$  V vs. SHE) and a large-area Pt coil as a counter electrode. The electrodes were characterized by CV at  $5 \text{ mV s}^{-1}$  with a potential range between  $-0.8$  V and  $+0.6$  V, in 10 mM PBS (pH 7.4) with and without sodium acetate in a one-compartment cell, before inoculation and after the biofilm was formed. All current density values were normalized by the anode geometric area, using the corresponding  $R_F$  value given in the figure caption. The electrodes were also characterized using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) at a constant potential ( $-0.2$  V vs. Ag/AgCl) using a sinusoidal modulation of 5 mV in a frequency range of 10 kHz to 10 mHz, with a logarithmic decrease of frequency, with 12 points per decade. The analysis of the impedance spectra was performed with the NOVA 2.1 program. Chronoamperometric curves were obtained at a controlled potential ( $E_{\text{Ag/AgCl}} = +0.3$  V) for 80 min to investigate the electrochemical behavior of the system.

## **2.5. Preparation and characterization of the biofilms**

The biofilms were set according to the methodology reported by Zhang et al. [22] in a 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 12 hours at  $4^\circ\text{C}$ . The biofilms were then dewatered at increasing concentrations of ethanol (30, 50, 80, 90 and 100%). Finally, the samples were dried to a critical point with  $\text{CO}_2$ . The samples were fixed to a metallic support with double-sided carbon tape and coated with a thin layer of gold for immediate observation using SEM. The degree of homogeneity of the biofilms was determined.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Characterization of zeolite modified with iron

The SEM image of the as received ZY zeolite is shown in Figure 1A. The zeolite shows a homogeneous morphology with a crystal structure of granular type. It is composed of agglomerates cubes and single particles on the order of  $1.81 \text{ mm} \pm 0.34$  on the diagonal and  $0.85 \text{ mm} \pm 0.12$ , respectively. The presence of Fe (Figure 1B) does not modify the structure of the zeolite. The SEM showed no changes in the morphology or in the size of particles. For EDS, it was estimated that the composition of Fe was 5.1 wt. % (2.47 atomic %). The unmodified ZY has 6% at/at of Na and 0% K, whereas in ZY-Fe near to 2.88 % in Na and 2.47% in Fe was observed. No K was detected.

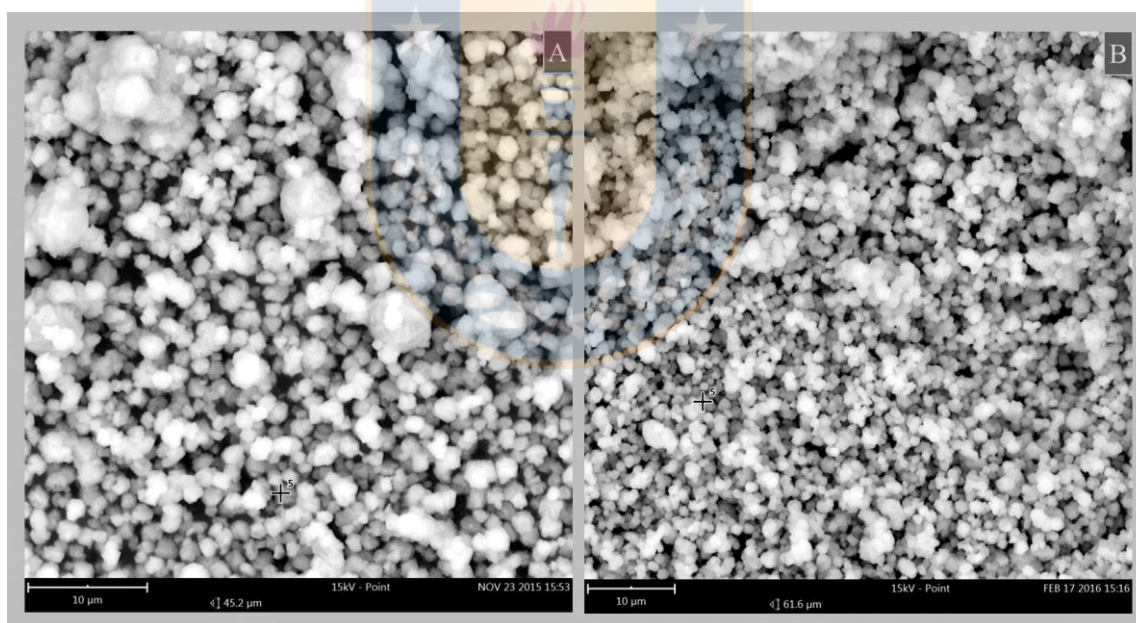


Figure 1. SEM micrographs for unexchanged Y zeolite (A) and Fe-exchanged Y zeolite (B).

The wide-scan XPS spectrum recorded from the original ZY is presented in Figure 2 (curve a), revealing, as expected, the contributions of Al, Si and O plus the typical C signal due to an adventitious carbon layer. In addition, intense peaks are observed at 260 eV and 296/380 eV, which

correspond to the presence of Na and K, respectively. The presence of Na and K is likely due to the charge compensation cations that in the zeolite structure. The wide-scan spectrum recorded from the iron-exchanged ZY is also presented in Figure 2 (curve *b*). It is interesting to note that this spectrum contains iron signals and that the Na and K peaks that were present in the original zeolite have now disappeared, indicating that these cations have been readily substituted by Fe cations. The Fe 2p background-subtracted XPS spectrum is shown as an inset in Figure 2. Apart from the characteristic Fe 2p<sub>3/2</sub> and Fe 2p<sub>1/2</sub> photoemission lines, the spectrum shows a clear shake-up satellite structure above the main Fe 2p<sub>3/2</sub> peak. Thus, the spectrum was fitted considering two spin-orbit doublets: one with binding energies characteristic of Fe<sup>2+</sup> (710.2 and 723.8 eV), and a second with binding energies characteristic of Fe<sup>3+</sup> (711.5 and 725.1 eV). There were two additional contributions: one to account for the intense Fe<sup>2+</sup> shake-up satellite structure at approximately 713.6 eV, and a second at 717.4 eV to account for a weak shake-up satellite that corresponds to Fe<sup>3+</sup>. Because of the several concomitant processes that contribute to the shape of the spectrum (i.e., pure photoemission processes and the presence of a shake-up structure), a unique fit is not possible [23]. Therefore, some restrictions to fit the spectrum to quantify the Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> ratio, were used. These restrictions include the same line width for the Fe 2p<sub>3/2</sub> lines and the Fe 2p<sub>1/2</sub> lines that correspond to both Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> chemical species and a Gaussian shape for all peaks used for the fit. The relative concentrations obtained from the XPS data are 39% for Fe<sup>2+</sup> and 61% for Fe<sup>3+</sup>. These results confirm that no changes occur in the original ZY structure when Fe is exchanged.

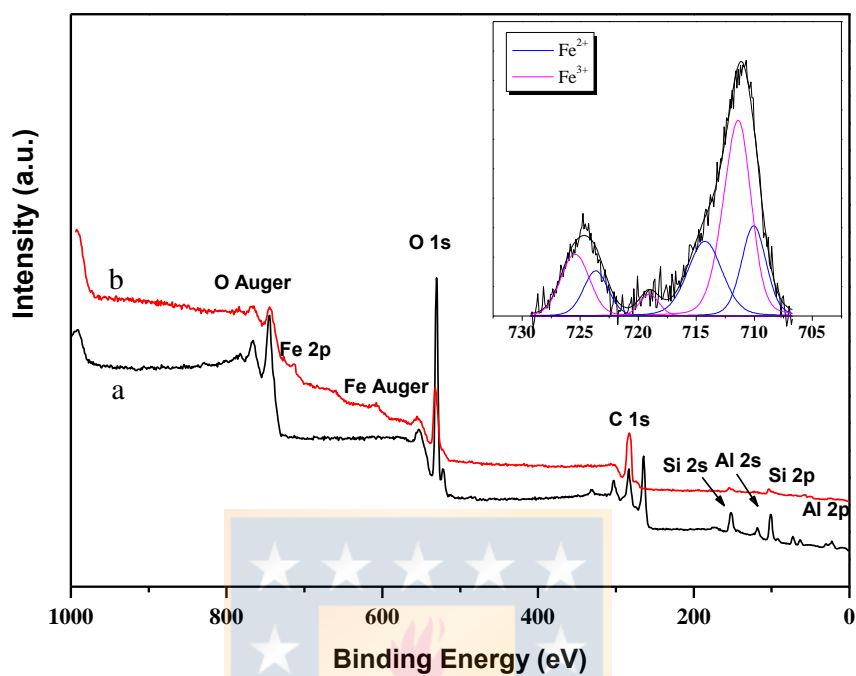


Figure 2. XPS general spectra: wide-scan spectrum recorded from the original Y zeolite (curve a) and wide-scan spectrum recorded from the Fe-exchanged Y zeolite. XPS spectra of Fe 2p corresponding to the Fe-exchanged Y zeolite showing the various contributions (inset).

The analysis of the BET adsorption/desorption isotherms (Figure S1 and Table 1) shows a decrease in the BET area near 66.2 % due to the presence of iron species, without a significant decrease in the pore diameter, despite the decrease observed in pore volume, which is evidence of a good distribution of iron in all the cavities.



Table 1. BET surface area and porosity of the unexchanged (ZY) and exchanged (ZYFe) zeolites.

<b>Zeolite</b>	<b>BET area (m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Porous Volume (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Microporous Volume (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Mesoporous Volume (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Porous diameter (mm)</b>
ZY	764	0.34	0.34	0.0	1.50
ZY <sub>Fe</sub>	258	0.18	0.14	0.04	1.57

The FTIR-ATR spectra of both ZY and ZY-Fe samples are shown in Figure 3. The spectra of the unmodified ZY is complex and agree with the data reported [24-25] showing the characteristics bands associated to the presence of water and/or hydroxyls groups (3000-4000 cm<sup>-1</sup> and 2330 cm<sup>-1</sup>). The wide main peak to (991 cm<sup>-1</sup>) has been attributed to the asymmetric and symmetric stretching modes of internal tetrahedra. The ZY-Fe spectra (curve 2) presents all the original peaks of ZY without shifted, implying that no formation of new bonds. The more intense band of the zeolite is increased with iron due to the iron oxides have a characteristic signal at 990 cm<sup>-1</sup>. The signal at 1300-1400 cm<sup>-1</sup>; 780-716 cm<sup>-1</sup> and 453 cm<sup>-1</sup> are characteristics of different structures of iron oxide. In summary, the method used for modified ZY does not affect the framework of this, as was observed in Fig.3

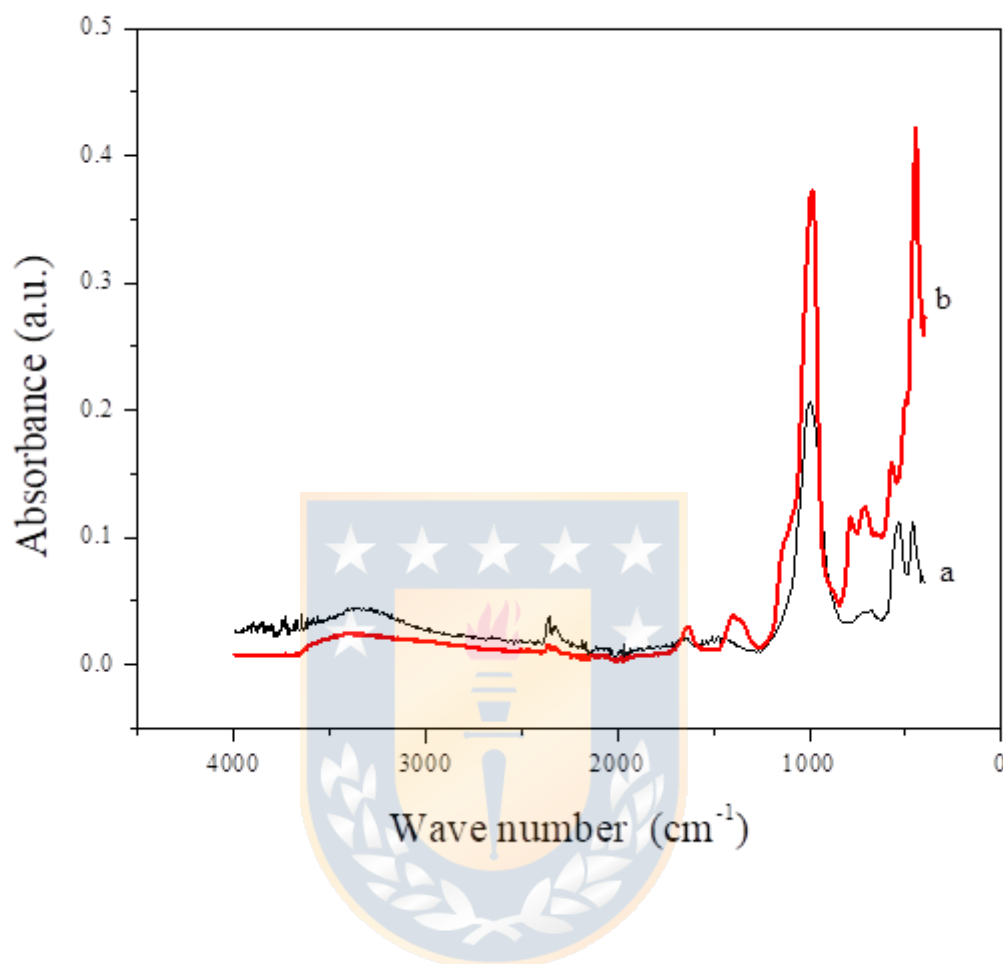


Figure 3. Fourier-transform infrared with Attenuated Total Reflection (FTIR\_ATR) spectra for unexchanged Y zeolite (curve a) and Fe-exchanged Y zeolite (curve b).

### 3.2. Formation and growth of the biofilm

Figure 4 shows the cell output voltage of GC/gr, GC/gr-ZY and GC/gr-ZYFe generated during MFC operation for the biofilm formation. The maximum voltages for GC/gr electrode varied between  $0.481 \pm 0.076$  V and  $0.535 \pm 0.110$  V until day 4. In the last batch the voltage slightly increased to  $0.582 \text{ V} \pm 0.031$  being 12.1% and 18.3 % lower compared to GC/gr-ZY and GC/gr-ZYFe,

respectively. On the other hand, a relatively minor difference among voltages of the GC/gr-ZY and GC/gr-ZYFe electrodes tested was observed during the first 4 feeding cycles. From the fifth cycle the GC/gr-ZYFe presents the highest performance with a stable maximum voltage of  $0.718 \pm 0.015$  V, which was 10.5% higher than that of the MFC with GC/gr-ZY electrode ( $0.653 \pm 0.018$  V).

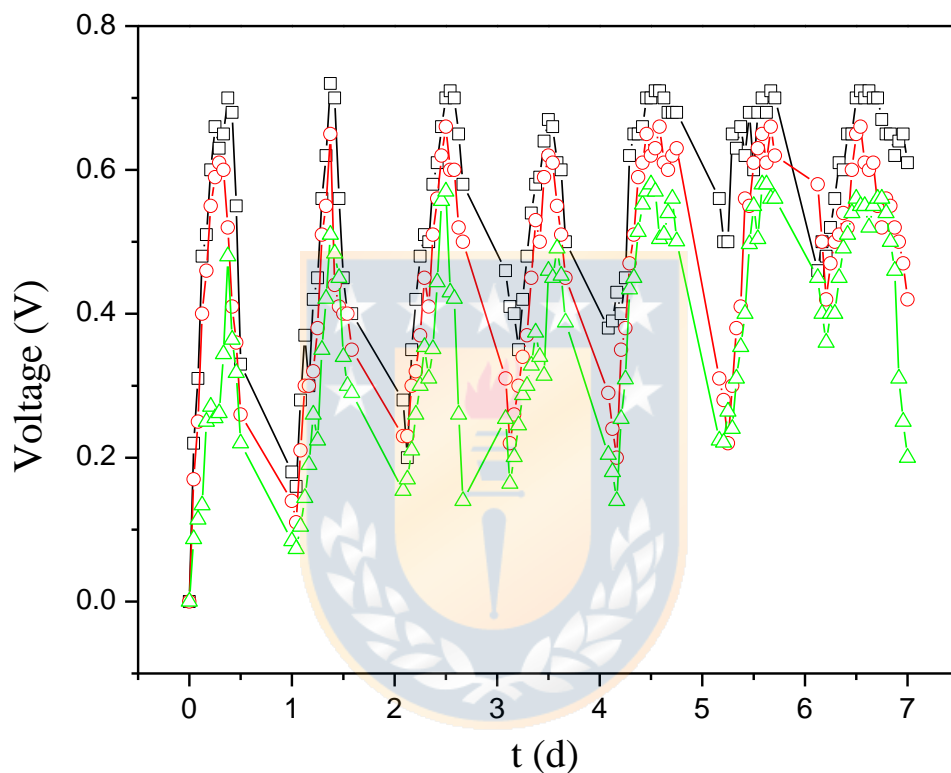


Figure 4. Voltage output generation during fed-batch MFC operation (biofilm growth) with different electrodes: GC/gr ( $\Delta$ ), GC/gr-ZY ( $\circ$ ) and GC/gr-ZYFe ( $\square$ ).

The effective colonization of the electrodes after 7 days of operating the MFCs was determined by transferring the biofilm-coated electrode to an electrochemical cell containing 10 mM acetate anions in PBS, for which the recorded current evolution was 80 min. The responses of the three electrodes (GC/gr, GC/gr-ZY and GC/gr-ZY<sub>Fe</sub>) with formed biofilms (a, b and c, respectively) and the control

electrode without the biofilm (curve *d*) are shown in Figure 5. The presence of a biofilm is evidenced for zeolite-based electrodes by a stabilized current over  $0.1 \text{ mA cm}^{-2}$  that is obtained between 60 min and 80 min. The current density was very similar for zeolite-based electrodes with values of  $0.144 \pm 5.12 \times 10^{-7} \text{ mA cm}^{-2}$  and  $0.152 \pm 7.64 \times 10^{-7} \text{ mA cm}^{-2}$  for GC/gr-ZY and GC/gr-ZY<sub>Fe</sub>, respectively.

When the same experiment was performed using ZY<sub>Fe</sub> a maximum was observed at 25 min, which then decreased until reaching the same observed stationary value for the sample without Fe (curve *c*). As expected, in the absence of a biofilm, no change in the current was observed (curve *d*), whereas in the absence of ZY (only for the GC/graphite electrode), the current increase was almost insignificant (curve *a*). For curves *b* and *c*, the maximum stable current was 7.7 times higher than that of the *a*-curve. These results imply that a bacterial film grew over the electrode surface and that this film presented catalytic activity for the degradation of organic matter. In addition, the system acted as a source of electrons injected into the external circuit, thus generating an electric current. The plausible explanation for the effect of zeolite when it is in a mixture with graphite supports our hypothesis, namely, that the zeolite mixture decreases the hydrophobicity of the electrode surface and improves the surface wettability. This property is related to the electrochemical reaction because it is one of the most important factors determining cell adhesion behavior. The presence of Fe can be considered an anchor point that facilitates the transfer of electrical charge and furnishing ZY and the Fe center together provides a better environment for biofilm growth. Finally, the stability of GC/gr-ZYFe with respect to the generation of electricity was checked by chronoamperometry (at +0.2 V vs. Ag/AgCl) after 2 days have finished the stage of biofilm formation

(Inset Fig.4). The current density was remained constant during the last 140 min with an average value of  $2.03 \times 10^{-5} \pm 8.5 \times 10^{-7} \text{ mA cm}^{-2}$ .

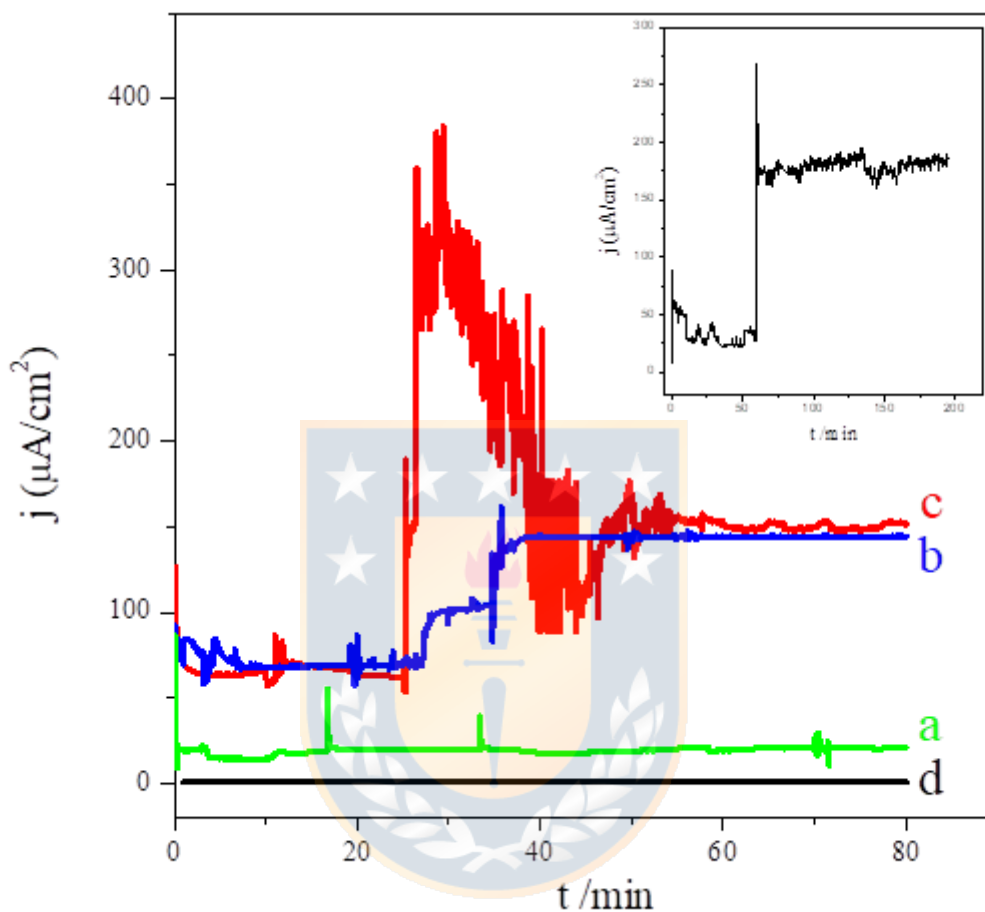


Figure 5. Current as a function of time (+0.20 V vs. Ag/AgCl applied potential) of the GC/gr (curve a), GC/gr-ZY (curve b) and GC/gr-ZYFe (curve c) electrodes after 7 days of biofilm growth in the presence of 10 mM acetate and electrodes without a biofilm (curve d). The inset is current generation of GC/gr-ZYFe electrode with biofilm after 2 days.

### 3.3. Biofilm characterization

#### 3.3.1. Morphological characterization of biofilms

The SEM images (Figure 6) show the surfaces of GC/gr (A), GC/gr-ZY (B) and GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> (C) before and after 7 days of MFC operation (D, E and F, respectively). Initially, the electrode surfaces have an irregular topography formed by non-porous GC flakes of different sizes (Figure 6A), as well as some cubical particles of ZY (inside the circle) (Figure 6B and 6C). The EDS analysis confirms the presence of ZY and ZY<sub>Fe</sub> in micrographs B and C, especially in the agglomerations and granules that are lighter in color. In agreement with Figure 1, no differences attributable to the presence of iron are observed by SEM-EDS. The GC electrode is coated with a homogeneous thin film of graphite and zeolite, as expected. The formation of a biofilm is evidenced in the micrographs obtained after 7 days of MFC operation (Figure 6 D-F), where a drastic change is observed in the electrode surface. At this time, there is a non-uniform film deposited on the GC flakes, revealing the presence of the biofilm. The biofilm coats the entire surface as a rough and porous mantle, as observed in the SEM images in which the original GC flakes are coated on all sides with the biofilm. The biofilm morphology exhibited similar characteristics in the three anodes, with diverse sizes and shapes of microorganisms, which are mostly rod-shaped and embedded in extracellular polymeric substances. The SEM images of the biofilms agree with the electrochemical response shown in Figure 5 because the electrode with higher effective currents has a film richer in microorganisms. Therefore, with respect to the electrode surface used in the formation of the biofilm, the effectiveness in the presence of bacteria on the electrode surface is in the order of GC/g-ZY<sub>Fe</sub> > GC/g-ZY > GC/g (Figs. 6D, E and F). Thus, the GC/g-ZY<sub>Fe</sub>-biofilm has a greater number of active sites on its surface. The results observed are in total agreement with our hypothesis in that the

hydrophilic characteristic of the zeolite ZY facilitates the access of the bacteria to the electrode/electrolyte interface, enabling the electron transfer with graphite to form the biofilm. The presence of iron, on the other side, plays an important role and probably facilitates the electron transport. According to the references [26-28], the bacteria that are adhered to these anodes could belong to the genus *Shewanella* and *Geobacter* because in studies of MFCs with pure strains, similar forms have been reported. It should be noted that the entire procedure was performed in triplicate, and the observed behaviors were all very similar.

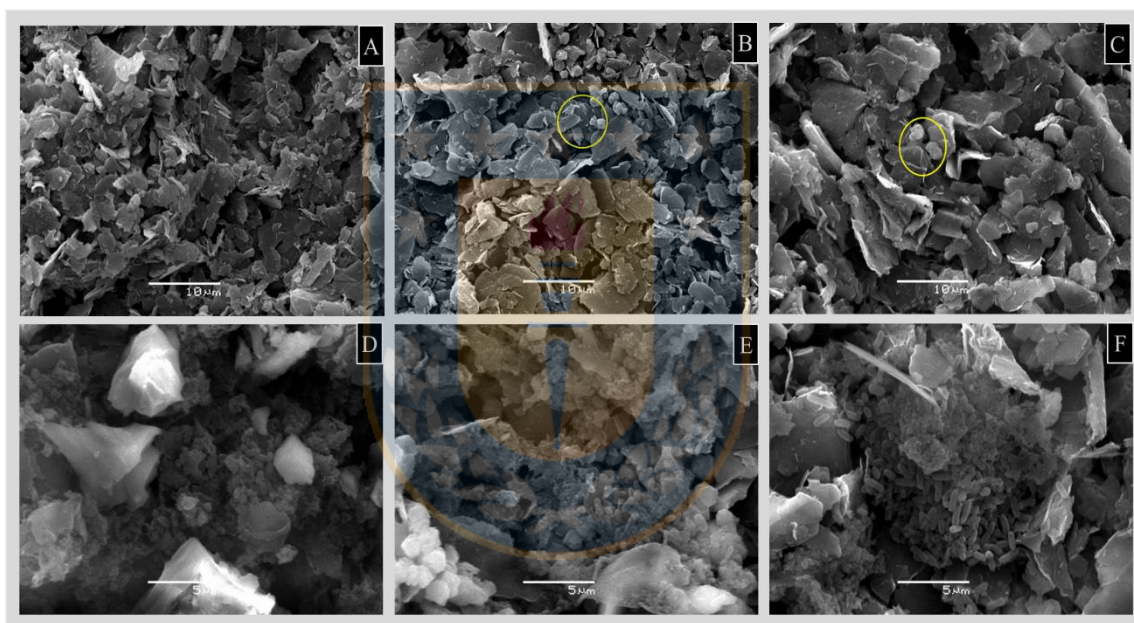


Figure 6. SEM micrographs of electrodes before microbial colonization: (A) GC/gr, (B) GC/gr-ZY, (C) GC/gr-ZYFe. After 7 days of MFC operation: (D) GC/gr, (E) GC/gr-ZY and (F) GC/gr-ZYFe.

### 3.3.2. Electrochemical behavior of anodes coated with a biofilm

Two aspects are fundamental in the electrochemical study of the behavior of biofilm anodes: the stability of the film and the electrical transport through it.



CV is typically used to analyze the electrochemical stability in these systems [29-32]. Figure 7 compares the CV results obtained at  $5 \text{ mV s}^{-1}$  in a PBS  $\text{N}_2$ -saturated electrolyte with the GC/gr, GC/gr-ZY and GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> electrodes in the absence (thin line) and the presence (thick line) of a biofilm. The results are representative of the experiments that were developed in triplicate. The potential scan starts from the open circuit potential (OCP) in the positive direction (see the arrow), until 0.6 V, after which the scan rate direction is reversed down to -0.8 V, ending the cycle at the positive potential. In the absence of a biofilm, the three working electrodes used show a large reduction peak (1c) near -0.3 V associated with the oxygen reduction reaction (ORR) (probably occluded in the graphite pores) and/or a quinone-/hydroquinone-like process, which is characteristic of the keto groups on the graphite surface (process 1a/1c, Figure 7). At a more negative potential, a new reduction process is observed, probably associated with hydrogen adsorption, previous step in the evolution reaction (HER) (peak 2c, Figure 7). Note that the electrode based on ZY<sub>Fe</sub> shows an increase in the current density of the double layer region, which is not attributable to a higher  $R_F$  value ( $R_F$  values are 13.8, 22.6 and 25.4 for GC/gr, GC/gr-ZY and GC/gr-ZY<sub>Fe</sub>, respectively) or an increase in the ohmic resistance. This result may be due to the poorly defined Fe(III)/Fe(II) processes. It has been reported that the species based on Fe do not have a single type of interaction with the electrode surface [18].

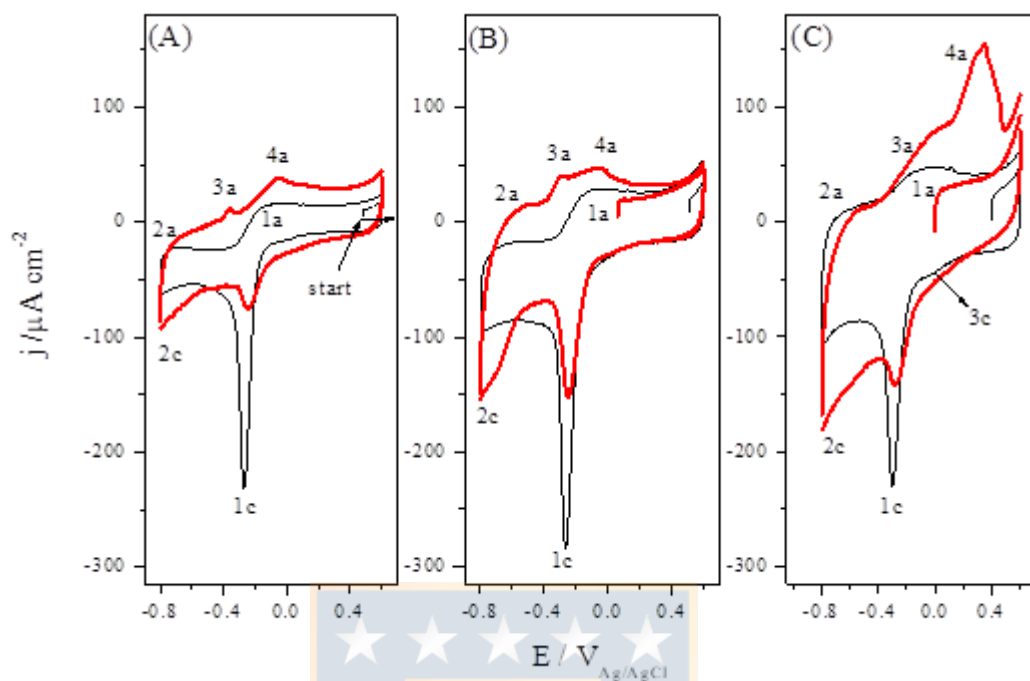


Figure 7. Cyclic voltammetry at 5 mV s<sup>-1</sup> in 10 mM PBS at pH 7.4 using different electrodes with a biofilm (thick line) and without a biofilm (thin line). (A) GC/gr, (B) GC/gr-ZY, and (C) CC/gr-ZYFe.

The voltammetric profiles change drastically when the electrode is coated with a biofilm. The 1c peak decreases, revealing that the graphite surface is not directly exposed to the electrolyte, and anodic currents are observed. Three anodic processes are defined, and none can be directly attributed to the process 1a observed in the bare electrode. The anodic currents are higher using the electrode based on ZY<sub>Fe</sub>, where an abrupt increase in intensity, associated with process 4a, is observed. This finding prompts the question of whether there could be a redox process between the biofilm and the species of Fe(III), which would regenerate by applying an electric potential. This occurs when the metal center serves as a redox mediator, as with the Fe(III)/Fe(II) redox couple. The HER (peak 2c in Figure 7) is shifted to a less positive potential, indicating that the biofilm-modified electrode surface decreases the hydrogen overvoltage, mainly in the presence of ZY and

ZY<sub>Fe</sub>, which is in agreement with the results reported by Marsilli et al. [31]. The CV results fully agree with the observations in Figures 5 and 6 in that the biofilms obtained on electrodes with ZY are homogeneous and have a larger number of active sites. In addition, the CV results indicate the presence of several active redox species whose responses are overlapped due to the nature of the mixed culture that was used for biofilm growth, especially on the GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> electrode, where a significant increase of current in the zone of Fe(II) oxidation potentials is observed. Therefore, the redox couple Fe(III)/Fe(II) acts as a redox mediator, playing the same role as typical biomolecules, such as flavins [32], the cytochrome c outer membrane, OmcA [33], OmcB [34], OmcZ [35] and MtrC [36], which are known to participate in the transfer of electrons by bacteria towards solid electrodes.

The most suitable electrochemistry technique to gain information about electrical transport is EIS [37-38]. Therefore, EIS experiments were performed to determine how the properties of electric charge transport are modified depending on the biofilm thickness. The results are shown in Figure 8 as a Nyquist plot for the ■ GC/Gr (curve 1), ● GC/gr-ZY (curve 2) and ▲ GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> (curve 3) electrodes as a function of growth time over 0 (A), 4 (B) and 7 (C) days. According to the Randles equivalent circuit, the characteristic semicircle can be interpreted as an uncompensated resistance ( $R_s$ ) in a series with a circuit formed by a charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) in parallel with a capacitor (double layer capacitance,  $C_{dl}$ ). According to the results shown in the Nyquist plots (Figure 8), it is necessary to change the capacitor by a constant phase element (CPE). Thus, the equivalent circuit  $R_s-R_{ct}/CPE$  (Figure 9) was used in the equivalent circuit for software simulation using Nova 2.1 software. The results shown in Table 2 indicate that the  $R_s$  values increase according to GC/g-ZY<sub>Fe</sub> > GC/g-ZY > GC/g, whereas the Faraday resistance decreases in the same order, according

to the role of ZY and ZY<sub>Fe</sub> in the charge transfer process. At the end of the incubation process, the uncompensated resistance was very similar, in accordance with the fact that the resistance of the electrolyte remained nearly constant. However, the R<sub>ct</sub> parameters decreased noticeably with the biofilm thickness, which agrees with an increase in the numbers of charge carriers (transferred electrons) due to a higher reaction rate, as observed by CV. It is notable that once the biofilm is formed, the decrease in the R<sub>ct</sub> parameter is observed markedly in the presence of ZY. Accordingly, the decreases in the faradaic resistance with electrodes based on ZY<sub>Fe</sub> are higher, tending toward a lower R<sub>ct</sub> value in the presence of Fe at a longer incubation time. Note that R<sub>ct</sub> is inversely proportional to the exchange current density (I<sub>0</sub>) of the reaction that occurs at the electrode surface. The capacitance of the anodes, evaluated as  $C = -1 / (Z_{im} \omega)$ , is constant with the real impedance Z<sub>Real</sub> and decreases slightly with the film growth. The capacitance against real impedance (C vs Z<sub>Re</sub> plot in Figure S2) trend is interesting because the presence of a large capacitance of an electrode surface without a biofilm is typical for anodes with micro- and nano porosity (Figure S2A). This capacitance decreases with a short incubation time where the original surface has been coated with the biofilm (Figure S2B), and it increases again with a longer incubation time, revealing that the new surface is also porous (Figure S2C).

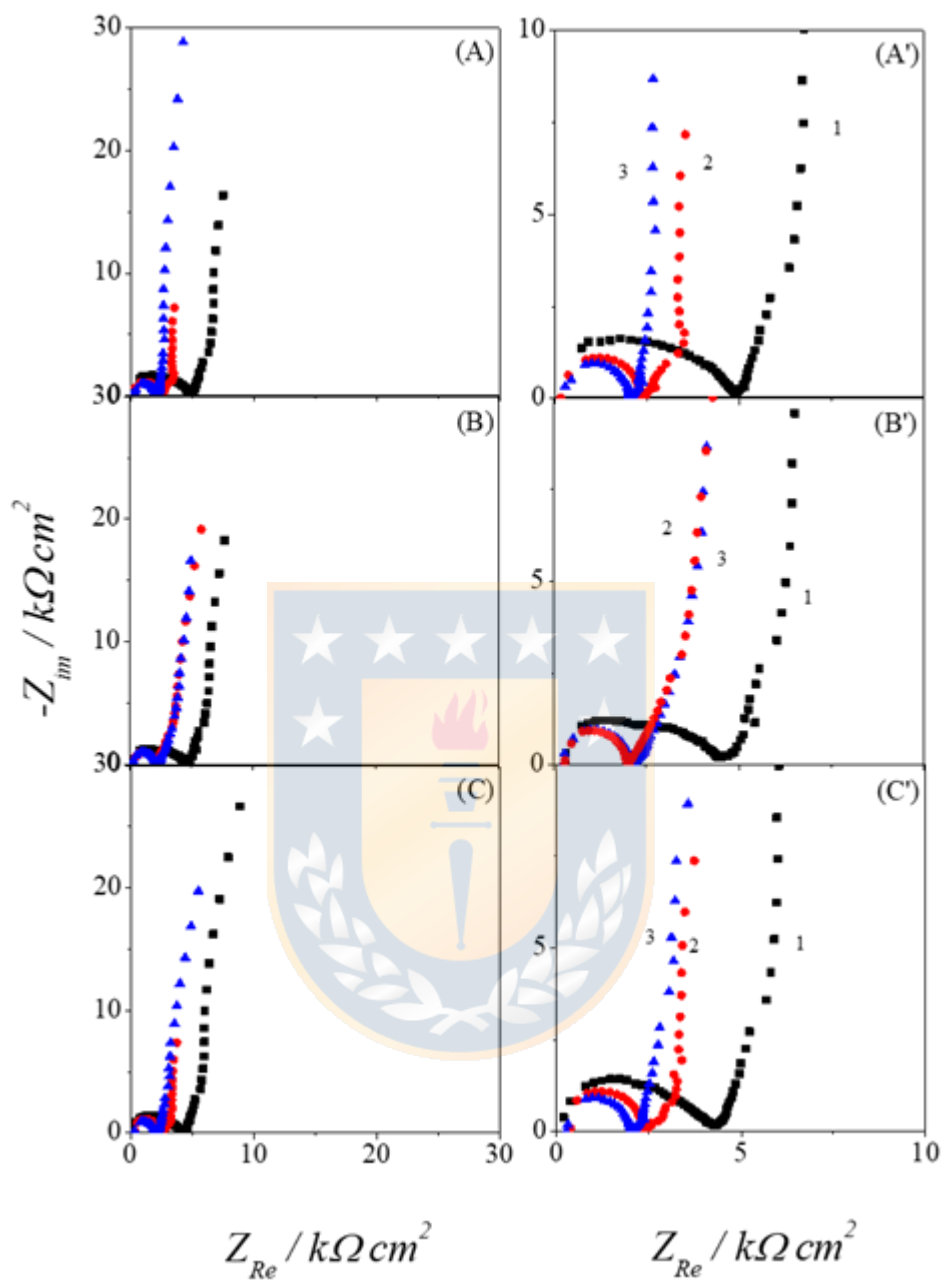


Figure 8. Effect of the biofilm growth time on the EIS behavior of ■ GC/gr, ● GC/gr-ZY and ▲ GC/gr-ZYFe anodes in 50 mM PBS electrolyte: (A) before microbial colonization and at (B) 4 days and (C) 7 days. Applied potential = -0.082 V.

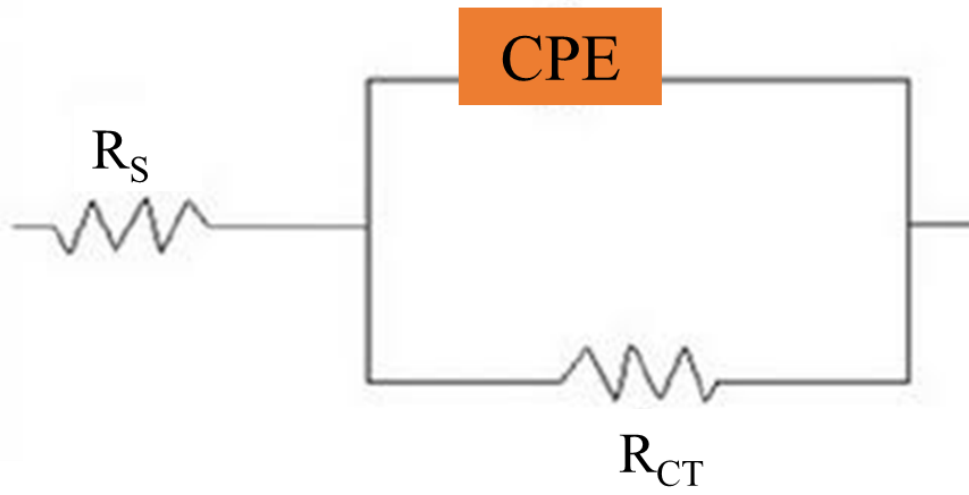


Figure 9. Randles equivalent circuit.



Table 2. Influence of biofilm growth on different anodes. EIS parameters (average values) from equivalent electrical circuit fitting in 10 mM PBS electrolyte at pH 7.4.

Biofilm growth (Days)	Electrode	EIS Test		
		(Average Values)		
		$R_s$ ( $\Omega$ )	$R_{ct}$ ( $\Omega$ )	$C_{dl}$ (nF)
0	Gr	10.96±0.63	371.0 ±1.22	2.65±0.05
	GrZY	15.20±0.54	242.5±1.16	2.88±0.06
	GrZY <sub>Fe</sub>	18.71±0.41	212.9±1.81	3.15±0.08
4	Gr	15.74±0.32	285.3±1.84	2.82±0.07
	GrZY	11.81±0.57	220.5±1.52	3.22±0.11
	GrZY <sub>Fe</sub>	16.10±0.52	200.0±1.21	3.26±0.90
7	Gr	13.05±0.27	213.8±1.39	3.87±0.12
	GrZY	16.22±0.48	165.7±1.34	3.15±0.06
	GrZY <sub>Fe</sub>	12.73±0.25	151.5±1.40	3.59±0.83

$R_s$ : uncompensated resistance,  $R_{ct}$ : charge transfer resistance,  $C_{dl}$ : double layer capacitance

### 3.3.3. Catalytic activity of the biofilms

The effectiveness of the bioelectrode as an anode for organic matter degradation, which is a process that must occur in a biocell, is determined by the catalytic activity for acetate anion degradation. The catalytic activity of GC/gr-ZY<sub>Fe</sub>-BF (an electrode coated with the biofilm) was evaluated using CV at 0.005 V s<sup>-1</sup> in 10 mM CH<sub>3</sub>COOH with PBS as the electrolyte at pH 7.4 and compared with GC/gr-ZY-BF and GC/gr-BF under the same experimental conditions. The biofilm obtained on GC/g-ZY<sub>Fe</sub> shows a higher current density, although for the GC/g-ZY-BF anode, the acetate degradation begins at a low potential (Figure 10). For the electrodes without a biofilm (inset Figure 10), no redox peaks related to acetate oxidation were observed. The acetate anion only reacts on the electrode if it is coated with a biofilm; for this anode, the I/E profile is similar to those obtained in the absence of acetate anion (Figure 7). The only current density observed is that associated with the charge of the electrical double layer. The bacteria play a fundamental role, acting as the site where the heterogeneous electrons are transferred from the acetate anion to the anode. The peak current density is a good parameter to determine the number of active sites. The biofilm on the GC/gr-ZY (Figure 10, curve 2) and GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> (Figure 10, curve 3) electrodes exhibited oxidation peaks with 135.4 μA cm<sup>-2</sup> at 0.21 V and 169.8 μA cm<sup>-2</sup> at 0.41 V, respectively, which represent a 25% increase in the presence of iron species. The GC/gr biofilm (Figure-10, curve 1) also shows an anodic process at a less positive potential (-0.41 V), and the oxidation peak (36.5 μA cm<sup>-2</sup>) was smaller than that of the gr-ZY and gr-ZY<sub>Fe</sub> electrodes. The weak peak current was probably caused by the lower number of microbial cells attached to the graphite material. A higher peak current density indicates more electrochemical activity, possibly meaning improvements in the electron transfer properties because there is a better environment for biofilm growth due to the



changes in surface hydrophobicity. This result is due to the larger number of bacteria attached to the electrode material that act as a bioelectrocatalyst for acetate oxidation. Similar results have been reported by Wu et al. [15] using NaX zeolite, where after 20 days of inoculation, the authors obtained a current of  $1.66 \text{ mA cm}^{-2}$ . Finally, when comparing these results with those obtained by EIS, it is evidenced that at a higher rate of charge transfer (lower faradaic resistance), there are no significant differences in the acetate anion reaction rate with different biofilm thicknesses, indicating that the charge transfer rate is likely to have kinetic and non-resistive control.

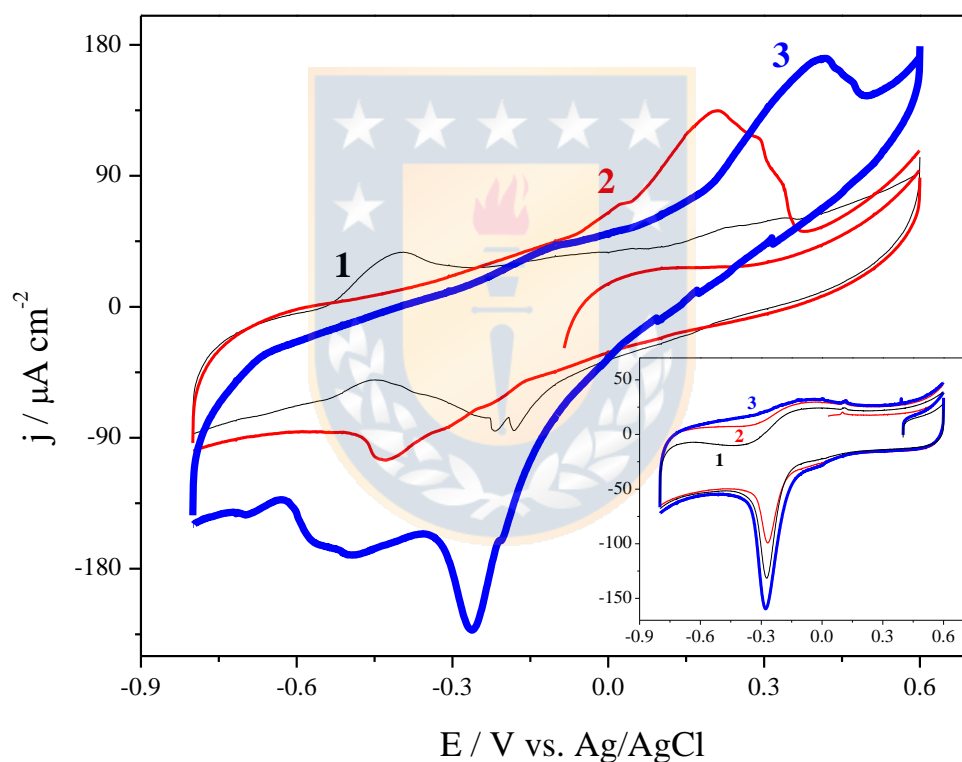


Figure 10. Cyclic voltammograms at  $5 \text{ mVs}^{-1}$  in a  $10 \text{ mM}$  acetate solution using different electrodes without (inset) and with a biofilm: (1) GC/gr, (2) GC/gr-ZY and (3) GC/gr-ZYFe

#### 4. CONCLUSIONS

In this study it was possible to develop an electroactive biofilm on GC/gr- ZYFe behaving as a bioanode. Thereby, the ZY zeolite showed to be a promising material for anode modification for use in MFCs. The GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> biofilm operating as a bioanode and that of the prepared intermediate electrodes showed that ZY zeolite is a promising material for anode modification for use in MFCs. Electrodes based on GC/gr-ZY as the anode in MFCs improve the performance compared with the GC/gr control. This performance is considerably improved when the ZY in the anode is exchanged with Fe. The rougher surface and the greater reactivity of the bioanodes obtained with GC/g-ZY<sub>Fe</sub> electrodes were attributed to the zeolite hydrophilicity, the microporous properties of ZY and the improvement of the electrical conductivity of the film by the iron species. The role of the iron species is to improve the efficiency of electron transfer between the bacteria and the anode. The thickness attained over 4 days of biofilm growth allows the anode to degrade the acetate anion. The system works best when the biofilm is grown for 7 days.

More studies are desirable; for example, the role of the hydrophilic/hydrophobic degree of zeolite should be examined. In this pioneering work, we used zeolite with medium hydrophilicity. Finally, the modification used in this study to prepare ZY<sub>Fe</sub>-graphite was demonstrated to be an effective and simple approach to improve the bio-current generation of graphite anodes. The low cost and abundance of synthetic and natural zeolites facilitate the development of a larger-scale investigation, such as at a pilot plant, and work is expected to continue in this direction.

#### Acknowledgments

This work was supported by the grants CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2015-211160606 from CONICYT (Chile), CONICYT/FONDAP/15130015 and FONDECYT 1140207.

## 5. REFERENCES

- [1] E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, Microbial fuel cells: Methodology and technology, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5181-5192.
- [2] Y. Hindatu, M. S. M. Annuar, A. M. Gumel, Mini-review: Anode modification for improved performance of microbial fuel cell, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 73 (2017) 236-248.
- [3] F. Li, Y. Sharma, Y. Lei, B. Li, Q. Zhou, Microbial Fuel Cells: The Effects of Configurations, Electrolyte Solutions, and Electrode Materials on Power Generation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 168–181.
- [4] J. Wei, P. Liang, X. Huang, Recent progress in electrodes for microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 9335-9344.
- [5] M. Zhou, M. Chi, J. Luo, H. He, T. Yin, An overview of electrode materials in microbial fuel cells, *J. Power Sources.* 196 (2011) 4427-4435.
- [6] W. Chen, Y.X. Huang, D.B. Li, H.Q. Yu, L. Yan, Preparation of macroporous flexible three-dimensional graphene sponge using an ice-template as the anode material for microbial fuel cells, *RSC Adv.* 4 (2014) 21619-21624.
- [7] G. Mohanakrishna, S.K. Mohan, S.V. Mohan, Carbon based nanotubes and nanopowder as impregnated electrode structures for enhanced power generation: evaluation with real field wastewater, *Appl. Energy.* 95 (2012) 31-37.

- [8] G. Gnana Kumar, C.J. Kirubakaran, S. Udhayakumar, C. Karthikeyan, K.S. Nahm, Conductive Polymer/Graphene Supported Platinum Nanoparticles as Anode Catalyst for the Extender Power Generation of Microbial Fuel Cells, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 16883-16893.
- [9] Q. Du, J. An, J. Li, L. Zhou, N. Li, X. Wang, Polydopamine as a new modification material to accelerate startup and promote anode performance in microbial fuel cells, *J. Power Sources* 343 (2017) 477-482.
- [10] J.M. Sonawane, A. Yadav, P.C. Ghosh, S.M. Adeloju, Recent advances in the development and utilization of modern anode materials for high performance microbial fuel cells, *Biosens. Bioelectron.* 90 (2017) 558–576.
- [11] Y. Qiao, X.S. Wu, C.X. Ma, H. He, C.M. Li, A hierarchical porous graphene/nickel anode that simultaneously boosts the bio- and electro-catalysis for high-performance microbial fuel cells, *RSC Adv.* 4 (2014) 21788-21793.
- [12] Y. Fu, J. Yu, Y. Zhang, Y. Meng, Graphite coated with manganese oxide/multiwall carbon nanotubes composites as anodes in marine benthic microbial fuel cells, *Applied Surface Science.* 317 (2014) 84–89.
- [13] C.H. Baerlocher, L.B. Mccusker, D.H. Olson, *Atlas of Zeolite framework types*, 6<sup>th</sup> ed, Elsevier (2007).
- [14] A. Doménech-Carbó, Theoretical scenarios for the electrochemistry of porous silicate-based materials: an overview, *J. Solid State Electrochem.* 19 (2015) 1887–1903.

- [15] X. Wu, F. Tong, T. Shun, X. Gao, J. Xie, X. Jing, C.C. Zhou, L.X. Zhang, P. Wei, Effect of zeolite-coated anode on the performance of microbial fuel cells, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (2015) 87-92.
- [16] Z. Mojovi, P. Bankovi, N. Jovi-Jovicic, A. Milutinovi-Nikolic, A. Abu Rabi-Stankovi, D. Jovanovic, Electrocatalytic behavior of nickel impregnated zeolite electrode, *International Journal of Hydrogen Energy.* 36 (2011) 13343-13351.
- [17] A. Babaei, M. Zendehtdel, B. Khalilzadeh, A. Taheri, Simultaneous determination of tryptophan, uric acid and ascorbic acid at iron (III) doped zeolite modified carbon paste electrode, *Colloids Surf B Biointerfaces.* 66 (2008) 226–232.
- [18] F. Fernández, C. Berrios, E. Garrido-Ramírez, N. Escalona, C. Gutiérrez, M.S. Ureta-Zañartu, Electrooxidation of 2-chlorophenol and 2,4,6-chlorophenol on glassy carbon electrodes modified with graphite–zeolite mixtures, *J. Appl. Electrochem.* 44 (2014) 1295–1306.
- [19] M.S. Ureta-Zañartu, M.L. Mora, M.C. Diez, C. Berrios, J. Ojeda, C. Gutiérrez, Chlorophenol electrooxidation on iron oxide-covered aluminosilicates deposited on glassy carbon, *J. Appl. Electrochem.* 32 (2002) 1211–1218.
- [20] E.G. Garrido-Ramírez, M.L. Mora, J.F. Marco, M.S. Ureta-Zañartu, Characterization of nanostructured allophane clays and their use as support of iron species in a heterogeneous electro-Fenton system, *Appl Clay Sc.* 86 (2013) 153-161.
- [21] S. Trasatti, A. Petri, Real Surface Area Measurements in Electrochemistry, *Pure and Applied Chemistry.* 63 (1991)1-734.

- [22] L. Zhang, X. Zhu, J. Li, Q. Liao, D. Ye, Biofilm formation and electricity generation of a microbial fuel cell start up under different external resistances, *J. Power Sources*. 196 (2011) 967-972.
- [23] M. Gracia, J.F. Marco, J. R. Gancedo, W. Exel and W. Meisel, Surface spectroscopic study of the corrosion of ultrathin Fe-57-evaporated and Langmuir-Blodgett films in humid SO<sub>2</sub> environments, *Surf. Interf. Anal.* 29 (2000) 82-91.
- [24] V. Crupi, D. Majolino, F. Longo, P. Migliardo, V. Venuti, FTIR/ATR study of water encapsulated in Na-A and Mg-exchanged A-zeolites, *Vib. Spectrosc.* 42 (2006) 375–380.
- [25] L. Ohlin, P. Bazin, F. Thibault-Starzyk, J. Hedlund, M. Grahn, Adsorption of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and H<sub>2</sub>O in zeolite ZSM-5 studied using in situ ATR-FTIR Spectroscopy, *J. Phys. Chem. C* 117 (2013)16972-16982.
- [26] J. Roy, S. Babanova, K. Garcia, J. Cornejo, L. Ista, P. Atanassov, Catalytic biofilm formation by *Shewanella oneidensis* MR-1 and anode characterization by expanded uncertainty, *Electrochimica Acta*. 126 (2014) 3–10.
- [27] G. Sun, D. Rodrigues, A. Thygesen, G. Daniel, D. Fernando, A. Meyer, Inocula selection in microbial fuel cells based on anodic biofilm abundance of *Geobacter sulfurreducens*, *Chin. J. Chem. Eng.* 24 (2016) 379–387.
- [28] X.H. Jiang, J. Petersen, E.R. Fitzgerald, L.A. Jackan, C.S. Lieber, A.M. Ringeisen, C.M. Lieber, J.C. Biffinger, Probing single to multi-cell level charge transport in *Geobacter sulfurreducens* DL-1, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1-6.

- [29] Y. Yuan, S.G. Zhou, N. Xu, L. Zhuang, Electrochemical characterization of anodic biofilms enriched with glucose and acetate in single-chamber microbial fuel cells, *Colloid Surf. B: Biointerfaces* 82 (2011) 641–646.
- [30] K.P. Katuri, P. Kavanagh, S. Rengaraj, D. Leech, *Geobacter sulfurreducens* biofilms developed under different growth conditions on glassy carbon electrodes: insights using cyclic voltammetry, *Chem. Commun.* 46 (2010) 4758–4760.
- [31] E. Marsilli, J. Sun, D.R. Bond, Voltammetry and growth physiology of *Geobacter sulfurreducens* biofilms as a function of growth stage and imposed electrode potential, *Electroanalysis* 22 (2010) 865-874.
- [32] E. Marsili, D.B. Baron, I.D. Shikhare, D. Coursolle, J.A. Gralnick, D.R. Bond, *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 3968–3973.
- [33] A. Carmona-Martinez, F. Harnisch, L.A. Fitzgerald, J.C. Biffinger, B.R. Ringeisen, U. Schröder, Cyclic voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants, *Bioelectrochem.* 81 (2011) 74–80.
- [34] K. Fricke, F. Harnisch, U. Schroder, On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells, *Energ. Environ. Sci.* 1 (2008) 144–147.
- [35] Y. Liu, F. Harnisch, K. Fricke, R. Sietmann, U. Schröder, Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 1006–1011.

[36] R. Hartshorne, B. Jepson, T. Clarke, S. Field, J. Fredrickson, J. Zachara, L. Shi, J. Butt, D. Richardson, Characterization of *Shewanella oneidensis* MtrC: a cell-surface decaheme cytochrome involved in respiratory electron transport to extracellular electron acceptors, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 1083–1094.

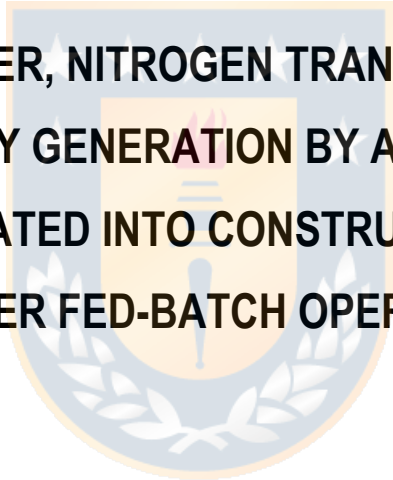
[37] R.P. Ramasamy, Z. Ren, M.M. Mench, J.M. Regan, Impact of initial biofilm growth on the anode impedance of microbial fuel cells. *Biotechnol Bioeng.* 101 (2008) 101-108.

[38] A.P. Borole, D. Aaron, C.Y. Hamilton, C. Tsouris. Understanding long-term changes in microbial fuel cell performance using electrochemical impedance spectroscopy. *Environ Sci Technol.* 44 (2010) 2740-2744.





## CAPITULO IV



# ORGANIC MATTER, NITROGEN TRANSFORMATION AND BIOELECTRICITY GENERATION BY A MICROBIAL FUEL CELL INTEGRATED INTO CONSTRUCTED WETLAND UNDER FED-BATCH OPERATION

**González, T., Vidal, G. (2019).** Organic matter, nitrogen transformation and bioelectricity generation by a microbial fuel cell integrated into constructed wetland under fed-batch operation (Submitted to).

**Organic matter, nitrogen transformation and bioelectricity generation by a microbial fuel cell integrated into constructed wetland under fed-batch operation**

Thaís González and Gladys Vidal\*

Environmental Engineering & Biotechnology Group, Environmental Science Faculty & EULA-CHILE Center, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

Submitted to: *Journal of Environmental Sciences*

Running title: Organic matter, nitrogen transformation and bioelectricity generation by a microbial fuel cell.

(\*) Corresponding author: Dr. Gladys Vidal

E-mail: [glvidal@udec.cl](mailto:glvidal@udec.cl)

Telephone: 56-41-2204067

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the organic matter, nitrogen transformation and bioelectricity generation in a constructed wetland with a microbial fuel cell integrated (CWMFC). For this, two integrated systems were installed and operated during 170 days: i) one was planted with *Schoenoplectus Californicus* (P-CWMFC) and ii) the other was unplanted (NP-CWMFC). Both systems were compared with a constructed wetland without electrodes (CW) used as a control.

The average removal efficiency of chemical oxygen demand (COD) ranged between 74- 87%, 69- 81% and 62-72% for P-CWMFC, NP-CWMFC and CW, respectively, with organic loading rates (OLR) of 4.8–7.9 g COD/m<sup>2</sup> d. The result showed that the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N removal efficiency were above 98% for P-CWMFC, 90% for NP-CWMC and 83% for CW. In terms of the effect of microbial fuel cell on wastewater treatment performance after start-up stage, significant differences between the integrated systems and control were noted ( $p < 0.05$ ). The highest electric performance was obtained for the P-CWMFC system at 7.9 g COD/m<sup>2</sup> d with a maximum power density, internal resistance and coulombic efficiency of 8.6 mW/m<sup>2</sup>, 251  $\Omega$  and 2.4 %, respectively.

**Keywords:** organic matter, nitrogen transformation, bioelectricity, constructed wetland, microbial fuel cell integrated, wastewater.

## 1. Introduction

The constructed wetlands (CW) are engineering systems that have been developed for industrial and domestic wastewater treatment. They are characterized by their low energetic consumption, good performance, and easy operation and maintenance. Consequently, they have become an alternative to conventional treatment systems for wastewater in decentralized areas with a population equivalent of up to 2000 (PE < 2000) (Vera et al, 2011, López et al., 2015).

In order to maximize the efficiency of domestic wastewater treatment, the CWs have been combined with other technologies, such as membrane bio-reactor, up-flow anaerobic sludge blanket or microbial fuel cells. These hybrid technologies have proven useful in the treatment of specific pollutants and/or sustainable for energy recovery (Liu *et al.*, 2015). In the case of the integration of MFCs into CWs, the idea is basically to provide an extra electron acceptor as conductor material (anode) in the anaerobic zone of the wetland to promote anaerobic degradation. This innovative system has become interesting since it has the double advantage of generating electric power and sustainably treating domestic wastewater (Yadav *et al.*, 2018). The feasibility of integrating both technologies is based on some of the similarities that make them compatible: i) the use of microorganisms to degrade pollutants, and ii) stratified redox conditions that means anaerobic and aerobic zones, where oxidation and reduction processes occur respectively. Previous studies have confirmed that CW-MFC systems compared to CWs don't reduce their effectiveness in pollutant elimination. Moreover, removal efficiency of 99%, 98%, and 87% have been reached for COD,  $\text{NH}_4^+$ , and  $\text{NO}_3^-$  respectively (Ramírez-Vargas et al., 2018). In addition, there are studies on the successful degradation of refractory organic compounds, such as nitrobenzene and Azo dye with a maximum removal efficiency of 92.8% and 95.6%, respectively (Fang et al., 2015; Xie et al., 2018). On the

contrary, the electrical performance of integrated systems remained low (0.093-226.3 mW/m<sup>2</sup>) regarding the minimum value reported for MFCs (2110 and 2850 mW/m<sup>2</sup>) (Pandey et al., 2016). The system faces important energy losses caused by different factors. Among them, the following factors can be highlighted: i) physiochemical (electrode material, superficial area, and distance among them) ii) biological (biocatalyst, biofilm, plant); and iii) operational (cell configuration, organic loading rate, pH, salinity) that influence the power generation (Butti et al., 2016). In order to improve electrical performance, many of these factors have been studied (Fang et al., 2013; Srivastava et al., 2015). For example, Doherty et al. (2015) proved that an integrated CW-MFC system operating under a continuous with simultaneous up-flow into the anode and down-flow into the cathode generated a maximum power 1.6 times stronger than a continuous up-flow regime. Some findings have shown that the position of the anode across the CW influences the performance of the MFC finding that the bigger the distances between the electrodes, the lower the power density generated due to an increase in the system's internal resistance (Doherty et al., 2015b; Fang et al., 2016). Recently, Xu et al. (2018) researched the influence of a separating membrane, such as glass wool, in power generation of CW-MFC where the system in absence of the separator showed better electric performance (66.22 mW/m<sup>2</sup>) than in its presence (17.14 mW/m<sup>2</sup>).

On the other hand, the plant's role has been widely researched in the CWs confirming that a part of the degradation and removal of nutrients is attributable to the present macrophyte activity. Depending on the species used, the nitrogen uptake varies from 0.5-60% (Kantawanichkul et al., 2009; Biaolowiec et al., 2012, López et al., 2016). In CW-MFC, the macrophyte becomes more relevant since if its roots release oxygen onto the cathode, the internal resistance is reduced and consequently improves the electrical performance. Additionally, rhizodeposits and roots exudates

have been used as fuel (carbon source), which contribute positively to power generation if they are oxidized onto the anode (Strik et al., 2008). However, not all macrophyte behave the same way regarding power generation. Wang et al. (2017a) reported a maximum power and electricity density for their three systems in the following order: *Typha orientalis* > *Scirpus validus* > *Juncus effuses*.

Despite the increase in the number of research carried out on this type of hybrid technology, the area is still in its initial research phase. The operational conditions (fed-batch) and/or the configurations (plant type) must be more optimized in order to achieve greater efficiency in the removal of pollutants along with an increase in power generation.

Considering the above, the objective of this research was to evaluate the transformation of organic matter, nitrogen and bioelectricity generation through an MFC integrated into CW under fed-batch operational conditions and *Schoenoplectus Californicus* as macrophyte.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Experimental systems construction, configuration and operation**

Three experimental units of vertical subsurface flow were built at a laboratory scale using identical columns of acrylic with an internal square section of 0.15 m by 0.15 m and 0.7 m high. The schematic representation of them is shown in Figure 1, where: a) CW stands for a constructed wetland system without Microbial Fuel Cell, b) P-CWMFC is the microbial fuel cell integrated into the constructed wetland with plant and c) NP-CWMFC is the microbial fuel cell integrated into the constructed wetland without the plant. Figure 1a shows the configuration for the CW system, consisting of a bottom layer of 25cm of gravel, then an intermediate layer of 20 cm of zeolite and a top layer of 25 cm of gravel. For the P-CWMFC and NP-CWMFC systems, from bottom to top were filled with a base of 10 cm of gravel, then 10 cm of activated granular carbon (anode), 20 cm of zeolite, 10 cm

of granular activated carbon (cathode) and 10 cm of gravel (Figure 1b and 1c) The anode and cathode were connected to an external electric resistance of 1000 ohm.

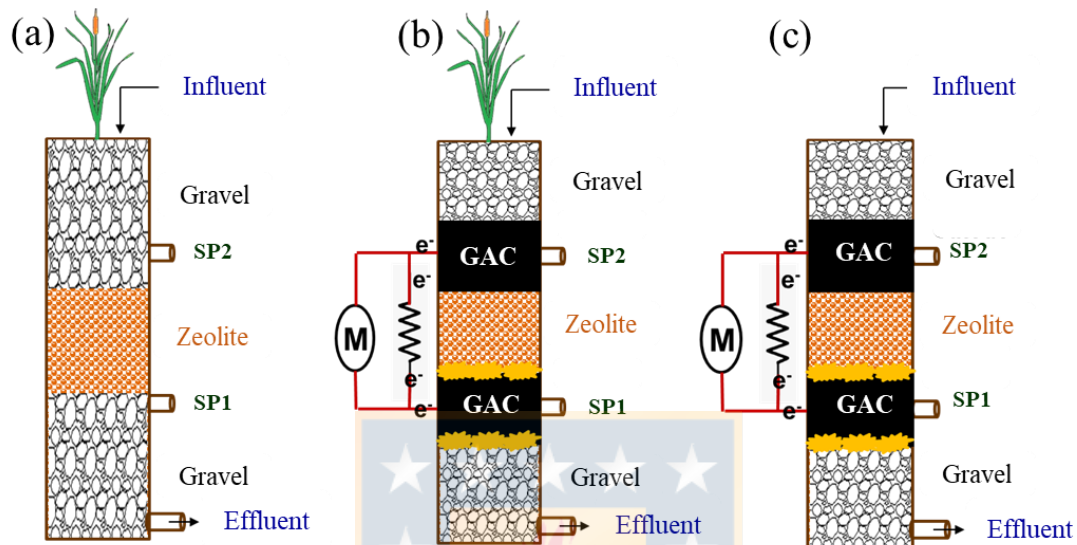


Figure 1. Schematic representation of the lab-scale: (a) CW, (b) P-CWMFC and (c) NP-CWMFC.

The general characteristics of CW and MFC are shown in Table 1. The granular activated carbon (CAG) was chosen as electrode material due to its compatibility with electroactive microbial communities and low cost (Wang et al., 2013). Before its use, CAG was pretreated by immersing it in 0.1 M NaOH and then in 0.1 M HCl to avoid any potential contamination of oils and metals, respectively. Additionally, two sampling points were installed in all studied systems. These were located at 24 (SP1) and 50 (SP2) cm from bottom to top in each reactor (Fig.1).

An individual of *Schoenoplectus Californicus* was planted in CW and P-CWMFC. This macrophyte was chosen due to its common use in wastewater treatment with constructed wetlands and also to its availability where the study was carried out (López et al., 2016, Sepúlveda-Mardones et al., 2017).

Table 1. Characteristics of construction for experimental set-up.

	Physical characteristics	Unit	Value
Constructed Wetland	<b>Support Matrix</b>		
	Type	-	Gravel Zeolite
	Particle size	mm	5-10
	<b>Vegetation</b>		
	Macrophyte	-	<i>Schoenoplectus Californicus</i>
	<b>Geometrics</b>		
	Superficial area	cm <sup>2</sup>	225
	Length/Width relation	-	4.7
	Water level	cm	0.4
	Total liquid volume	L	5
Microbial Fuel Cell	<b>Electrodes</b>		
	Material	-	Granular Activated Carbon (GAC)
	Particle diameter	mm	8-10
	Thickness layer	cm	10
	Distance between electrodes	cm	15
	<b>Electrical connections</b>		
	External resistance	ohm	1000
	Current collector	-	Stainless Steel mesh-12
	Wires	-	Cu

Table 2 shows the operational parameters of the systems which were divided into several stages. Stage I corresponds to the experiment startup (during May to June, 40 days), Stage II (during June to August, 63 days) and Stage III (during August and October, 63 days). Stages I and II used an



organic charge of 4.8 mg COD/m<sup>2</sup> d, while in Stage III this was increased to 7.9 mg COD/m<sup>2</sup> d. During every stage, water samples were taken from the influent, sample point 1 (SP1), sample point 2 (SP2) and effluent (Fig.1). The physicochemical parameters COD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N were monitored on day 1 and 7 of each batch. While the in-situ parameters: pH, temperature, conductivity, dissolved oxygen, and oxidation-reduction potential were monitored on day 2, 5 and 7 of each batch.

Table 2. Operational parameters during different stages in the experimental units.

Operational parameters	Stage		
	I	II	III
Batch quantity	5	8	8
COD (mg/L)	150	155	250
HRT (d)	7	7	7
Q (L/d)	0.7	0.7	0.7
OLR (COD g/m <sup>2</sup> d)	4.76	4.92	7.93
ALR (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N g/m <sup>2</sup> d)	1.45	1.48	1.51
Operational time (d)	42	63	63

HRT: hydraulic retention time; OLR: organic loading rate; ALR: ammonium loading rate; Q: flow.

## 2.2. Synthetic wastewater

The systems were feed with a synthetic solution that simulated physically pretreated domestic wastewater. The composition of domestic wastewater was the following (Villaseñor et al., 2013): glucose (0.12 and 0.32 g/L) and acetate (0.12 and 0.32 g/L) as carbon source, NH<sub>4</sub>Cl (0.17 g/L), NaCl (0.07 g/L), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.03 g/L), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.04 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.36 g/L), and 1mL/L

solution of essential trace elements (Liu et al., 2013a) (content per liter: 200 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 5 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 10 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 3 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$  and 0.4 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

### 2.3. Inoculation

The granular activated carbon and the gravel were inoculated with a 1:1 of mixed sludge (80% anaerobic sludge +20% secondary sludge) obtained from a wastewater treatment plant of activated sludge (Concepción, Region Biobio, Chile) and the growth medium contained  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (0.82 g/L) in 50 mM of phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4; 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g  $\text{KCl}$  and 8 g  $\text{NaCl}$  in 1 L aqueous solution), 0.7 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.2 g/L  $\text{CaCl}_2$ , and 10 mL/L of solution of essential trace elements. The inoculation was carried out under batch mode for a month before beginning the systems' operation. In order to ensure anaerobic conditions, the inoculum and the growing medium were purged with nitrogen gas for 20 minutes every day during inoculation. Additionally, to ensure the enrichment of electroactive bacteria and the formation of biofilm, 500 mL of  $\text{CH}_3\text{COONa}$  solution in 10 mM of PBS was added every 5 days.

### 2.4. Analytical methods

The in situ parameters such as pH, temperature, conductivity and oxidation-reduction potential (ORP) were measured using the multi-parameter portable equipment OAKTON PC650 480–485 (measurements of ORP with HI 3230B electrode, detection platinum pin, simple link  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  electrode referent, pH measurements with HI1230B electrode, general use glass, spheric bulb, simple link  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  electrode referent; T measurements with stainless steel WD-35418-05 sounding line, with Automatic Temperature Compensation (ATC) for pH and ORP). The concentration of dissolved oxygen (DO) in the water was measured with a portable oxygen sensor (HANNA OXI 330i/set HI 9146-04). In every batch, the influent samples, SP1, SP2 and effluent were filtered with Whatman membrane filters (0.45  $\mu\text{m}$  pore size) and were stored at 4°C for further physicochemical

analysis. The physicochemical parameters of COD (colorimetric method, 5210-B) and  $\text{NH}_4^{+-}\text{N}$  (distillation method, using NKT equipment), NT,  $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^{-}\text{-N}$  (specific Merck kits, Spectrocuant NOVA-60) were measured based on the protocols described in Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1998).

## 2.5. Calculation and electrochemical measurements

The organic matter removal efficiency measured as COD can be calculated using the following formula:

$$COD [\%] = \frac{C_{inf} - C_{eff}}{C_{inf}} \cdot 100 \quad (1)$$

where  $C_{inf}$  and  $C_{eff}$  are the concentrations in mg/L of COD for the influent and effluent, respectively. The cell voltage (V) of P-CWMFC and NP-CWMFC was recorded through external electric resistance (R) every 20 minutes using a multimeter with a data acquisition system (Keithley 2700). The current (I) was calculated using Ohm's Law:

$$I = \frac{V}{R} \quad (2)$$

The power (P) was calculated using:

$$P = I \cdot V \quad (3)$$

In order to obtain the current density ( $\text{mA}/\text{m}^2$ ) and power density ( $\text{mW}/\text{m}^2$ ) the current and power were divided by the superficial area ( $\text{m}^2$ ) of the anode. The electric performance was evaluated through polarization curve method. For this reason, the external electric resistance varied from 10 k $\Omega$  to 5  $\Omega$  and the voltage was recorded for 30 minutes each. The internal resistance of P-CWMFC and NP-CWMFC was determined from the lineal zone of the polarization curve (Logan, 2006).

The coulombic efficiency ( $CE$ ) was calculated according to the equation suggested for batch mode systems:

$$EC = 8 \cdot \int_0^{t_b} \frac{I}{F \cdot V_{an} \cdot \Delta COD} dt \quad (4)$$

where  $t_b$ ,  $F$ ,  $V_{an}$  and  $\Delta COD$  are the duration time of each batch, the Faraday constant (96845 C/mol), the anode volume ( $m^3$ ) and the removal of COD (mg/L), respectively.

## 2.6. Statistical analyses

The statistical analyses were carried out using the INFOSTAT software with a significance level of  $p=0.05$ . In order to determine the comparative statistical tests, first, the data were subjected to a normality test (Shapiro-Wilk test). Then, to compare the concentrations and elimination efficiencies among the CW, P-CWMFC and NP-CWMFC systems, the following tests were performed: a) data with normal distribution, a T-paired test and b) data without normal distribution, a Wilcoxon test. The effect of the plant was also compared and the following tests were performed: a) for normal data distribution, an ANOVA test and b) for data without normal distribution, a Kruskal-Wallis test.

## Results and discussions

### 3.1. Behavior of in situ parameters

Table 3 shows the behavior of the ORP, pH, T, OD parameters and conductivity measures in the anodic (SP1=24 cm) and cathodic compartment (SP2=50 cm) of each experimental system (CW, P-CWMF, and NP-CWMFC) in every operational stage. The control system (CW), as well as the integrated systems (P-CWMFC and NP-CWMFC), showed an increase of average pH from  $5.74 \pm 0.04$  (influent) to  $7.30 \pm 0.46$  in SP1 and  $7.41 \pm 0.40$  in SP2 in all operating stages. Similar results

with values in range of 7.52 to 8.30 for cathode and 6.80 to 7.32 for anode have been found in the literature for integrated systems CW-MFC (Wu et al., 2015; Wang et al., 2016; Türker and Yakar, 2017), who worked with influent with COD levels from 215 to 3620 mg/L. Additionally, there were no significant differences among the different systems in SP1 during stage I, II and III ( $p > 0.05$ ). On the contrary, the pH values in SP2 showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between the integrated systems (P-CWMFC and NP-CWMFC) and the control (CW) only in the stages II and III.



Table 3. In situ parameters in the experimental systems during the different operational stages.

Stage	System	SP	Parameter				
			pH	Temperature (°C)	Conductivity (mS)	ORP (mV)	DO (mg O <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> )
I	Influent	-	5.85±0.36	19.2±1.15	1.21±0.18	125.9±10.4	5.20±0.13
	CW	1	7.31±0.56	17.8±2.68	1.07±0.80	34.5±5.21	2.12±0.18
		2	7.18±0.44	19.0±2.30	1.09±0.16	68.6±7.44	2.10±0.29
	P- CWMFC	1	7.11±0.61	18.2±2.90	1.11±0.12	83.5±4.50	2.04±0.15
		2	7.32±0.51	19.8±2.12	1.14±0.57	110.1±11.7	2.12±0.23
	NP- CWMFC	1	7.17±1.0	18.7±1.35	1.02±0.1	80.16±3.25	2.00±0.17
		2	7.21±0.57	19.5±2.05	1.13±0.11	170.9±25.8	2.28±0.21
II	Influent	-	5.22±0.41	20.6±1.22	1.27±0.13	110.9±8.32	5.11±0.27
	CW	1	7.41±0.58	20.9±3.43	2.03±0.14	22.60±0.13	2.19±0.24
		2	7.21±0.51	21.8±2.57	2.59±0.83	132.5±20.3	2.05±0.24
	P- CWMFC	1	7.38±0.37	20.6±1.90	1.17±0.72	-11.1±0.17	1.84±0.13
		2	7.58±0.38	21.9±1.55	1.30±0.34	148.1±17.2	2.32±0.19
	NP- CWMFC	1	6.91±0.40	20.4±1.74	1.05±0.36	-13.7±1.11	1.89±0.10
		2	7.00±0.42	22.3±2.06	1.21±0.28	162.5±13.1	2.23±0.25
III	Influent	-	6.14±0.41	22.8±1.12	1.38±0.12	140.2±3.31	5.25±0.16
	CW	1	7.46±0.19	24.3±3.05	1.41±0.52	20.4±0.62	1.95±0.16
		2	7.40±0.15	27.8±1.25	1.47±0.19	150.6±22.4	2.23±0.32
	P- CWMFC	1	7.40±0.28	24.1±2.57	1.58±0.21	-26.9±1.70	1.53±0.14
		2	7.95±0.26	27.0±2.13	1.59±0.16	161.4±21.8	2.35±0.23
	NP- CWMFC	1	7.59±0.16	24.6±2.40	1.49±0.15	-15.5±0.84	1.64±0.12
		2	7.87±0.35	26.7±3.10	1.45±0.24	170.3±13.2	2.18±0.31

SP1: sample point in anodic compartment; SP2: sample point in cathodic compartment. All values are expressed as the mean + standard deviation. Stage I, n=5. Stage II, n=8. Stage III, n=8.

For NP-CWMFC the average pH obtained in SP1 was  $7.17 \pm 1.0$ ,  $6.91 \pm 0.4$  and  $7.59 \pm 0.16$  in stage I, II and III respectively, meanwhile, in SP2 the values were  $7.21 \pm 0.57$ ,  $7.10 \pm 0.42$  and  $7.87 \pm 0.35$  during the stage I, II and III, respectively. Moreover, it was observed that the values of the cathode zone in the range of 0.04 to 0.28 pH units higher than the ones obtained in all the operation stages.

In the case of P-CWMFC, the average pH in SP1 during stage I, II and III was  $7.11 \pm 0.61$ ,  $7.38 \pm 0.37$  and  $7.40 \pm 0.28$  respectively. The values obtained in the cathode were higher in 2.9, 2.7 and 7.4% regarding the anodic pH during stage I, II and III respectively. ( $7.32 \pm 0.51$ ,  $7.58 \pm 0.38$  and  $7.95 \pm 0.26$ ).

On the contrary, for the control system CW a reduction of 1.8, 2.8 and 0.8% was observed in the pH values when going from the anodic compartment to the cathodic one during stages I, II and III respectively. Consequently, this reduction on the pH of the anodic compartment might be the result of the presence of fatty acids formed by the degradation of organic matter through the metabolism electrochemically active microorganisms and/or anaerobic bacteria. On the other hand, Zhao et al. (2013) and Xu et al. (2017) proved that in the cathodic compartment, the pH increases since the protons are released in the anode zone and migrate towards the cathode, where they are consumed through different reduction processes.

When comparing the NP-CWMFC among different operation stages, this parameter showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between the stage III and the stages I and II, in the anodic compartment (SP1), as well as in the cathodic (SP2) due to an increase in OLR from 4.8 to 7.9 COD/m<sup>2</sup> d. This behavior was similar to the one reported by Xu et al. (2017), who observed that an increase on the pH of the cathodic ( $7.04 \pm 0.07$  to  $7.28 \pm 0.02$ ) and anodic compartment ( $6.83 \pm 0.02$  to  $7.2 \pm 0.06$ ) is produced when there is an increase in the organic fed charge and in its

concentrations (COD from 0 mg/L to 1000 mg/L). Meanwhile, the plant system (P-CWMFC) only showed significant pH differences in the cathodic compartment ( $p < 0.05$ ) between stages I and III, whose values were  $7.32 \pm 0.51$  and  $7.95 \pm 0.26$  respectively. On the other hand, the pH values weren't significantly different in stages II ( $7.58 \pm 0.38$ ) and III ( $7.95 \pm 0.26$ ) despite having a different OLR, therefore this factor didn't affect the values. Both compartments, SP1 and SP2 showed average temperatures ranged from  $17.8 \pm 2.7$  to  $19.8 \pm 2.1$  °C in stage I,  $20.4 \pm 1.7$  to  $22.3 \pm 2.1$  °C in stage II and  $24.1 \pm 2.6$  to  $27.8 \pm 1.3$  °C in stage III. An approximate increase of 33.5 and 39.8% in temperature was evidenced from fall/winter to spring/summer in SP1 and SP2 respectively. The differences found between CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC in SP1 as in SP2 weren't significant ( $p > 0.05$ ) in any of the stages. On the contrary, there were significant differences in all the systems ( $p < 0.05$ ) between the stages I, II and III in SP1 as in SP2. Therefore, the temperature values for the same stages varied according to the season.

Regarding the conductivity, CW showed average values between  $1.07 \pm 0.28$  and  $2.03 \pm 0.11$  mS in SP1 and  $1.09 \pm 0.16$ - $2.59 \pm 0.83$  mS in SP2 from the stages I to III. For the integrated systems P-CWMFC and NP-CWMFC, similar conditions were observed in conductivity as in the anodic and cathodic compartment, with values ranging from  $1.11 \pm 0.12$  to  $1.59 \pm 0.16$  and  $1.02 \pm 0.1$ - $1.49 \pm 0.15$  without a significant effect of the wetland height ( $p > 0.05$ ). The conductivity values showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between stages I and II in SP1 and SP2 for all systems. On the other hand, CW showed average values of ORP ranging from +34.5 to +20.4 mV in SP1, and average values above +68 mV in SP2 in all operation stages. The ORP values measured in SP2 during stage I were 63.9-82 mV lower than the ones found in stage II and III ( $p < 0.05$ ). On the other hand, SP1 didn't show significant differences among operational stages ( $p > 0.05$ ).



During stage II, both integrated systems obtained average values in SP1 and SP2 of  $-12.4 \pm 1.3$  mV and  $+155.3 \pm 7.2$  mV, respectively. On stage III, these ORP reached more negative values in case of SP1 ( $-21.2 \pm 5.7$  mV) and more positive ones in SP2 ( $166.3 \pm 4.9$  mV) which means an anoxic/anaerobic medium in the lower area and anoxic/aerobic in the upper area of the systems (Faulewetter et al., 2009). The ORP values were significantly different ( $p < 0.05$ ) between the anodic and cathodic compartment in the stages II and III. Additionally, Villaseñor et al. (2014) and Yakar et al. (2018) have found similar results ranging from  $-19.2$  mV to  $-10$  mV for the anodic compartment and from  $+43.03$  mV to  $+150$  mV in vertical CW-MFC systems operated in continuous mode.

Despite ORP values in SP1 for both systems improved by 70% from stage II to III, this value was lower than the ones reported by Oon et al. (2015) ( $-203$  mV) and Oon et al. (2016) ( $-143$  mV). This means that is not possible to have a completely anaerobic environment in the anode zone. This behavior might be related to the feeding mode used in this research. Therefore, Corbella et al. (2014) found that the redox conditions operated under continuous flow were between  $-160$  mV and  $-200$  mV (25 cm depth); while for the discontinuous flow these conditions lowered to  $-60$  and  $-110$  mV in a 15 cm depth. On the other hand, the presence of the plant (P-CWMFC) had a significant influence ( $p < 0.05$ ) in the reduction-oxidation conditions obtained in the anodic zone of the P-CWMFC system ( $-26.9 \pm 2.97$  mV) compared with NP-CWMFC ( $-15.5 \pm 3.18$  mV) during stage III. Consequently, in constructed wetlands without integrated MFCs is highly accepted for the redox state to be affected by the presence as well as by the plant species (Gagnon et al., 2007; Bialowiec et al., 2012). In general, the presence of the plants in constructed wetlands promotes higher ORP conditions compared with wetlands without plants (Tanner, 2001).

### 3.2. Wastewater treatment performance

- COD removal. Figure 2 shows the COD concentration of the effluent obtained from the 3 experimental systems during the 21 feeding cycles involving the different operational stages (I, II and III). In stage I (OLR = 4.8 COD g/m<sup>2</sup> d), the control system (CW) as well as the integrated systems (P-CWMFC and NP-CWMFC) showed effluent with COD concentrations between 100.50 ±1.74 and 140.5 ±2.71 mg/L from an average influent with COD equals to 149.3 ±3.61 mg/L. This reduction, lower to 50%, is caused by the acclimating of the microorganisms at the interior of each of the systems. For this motive, it was important to have a strong startup (longer than 50 days) after the inoculation of the electrode material and support medium, since the wastewater used is synthetic and doesn't contain any microorganism that can degrade present organic matter. In stage II, the observed range of value for the COD concentrations of the effluent was: 54.8-70.2 mg/L, 37.8-45.8 mg/L and 45.9-68.0 mg/L for CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC, respectively. After the start-up (50 days) it could be confirmed that the system in stage II reached a feeding stationary state with an organic loading of 4,9 COD g/m<sup>2</sup> d. For their part, Samsó and García (2013) showed that the systems, after a strong startup reached a higher microbial activity. Furthermore, Zhang et al. (2015) showed a positive correlation between microbial density and diversity, and the removal of DBO<sub>5</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N.

On the other hand, in stage III, the COD concentration of the effluent in CW varied from 62.54 to 72.83 mg/L. Meanwhile, for P-CWMFC and NP-CWMFC varied from 21.72 to 40.93 mg/L and from 30.16 to 45.54 mg/L, respectively. Wang et al. (2017) working with a synthetic influent (carbon source=glucose) of 215 mg/L of COD using fed-batch mode during 50 days of operation, reported effluent for integrated systems (CW-MCF) with COD values from 3 to 4 times higher (from 103 to

139 mg/L) than the ones obtained in this study. The difference in COD concentration of the effluent is mainly because of the operation time of our systems, which ranged from 100 to 180 days.



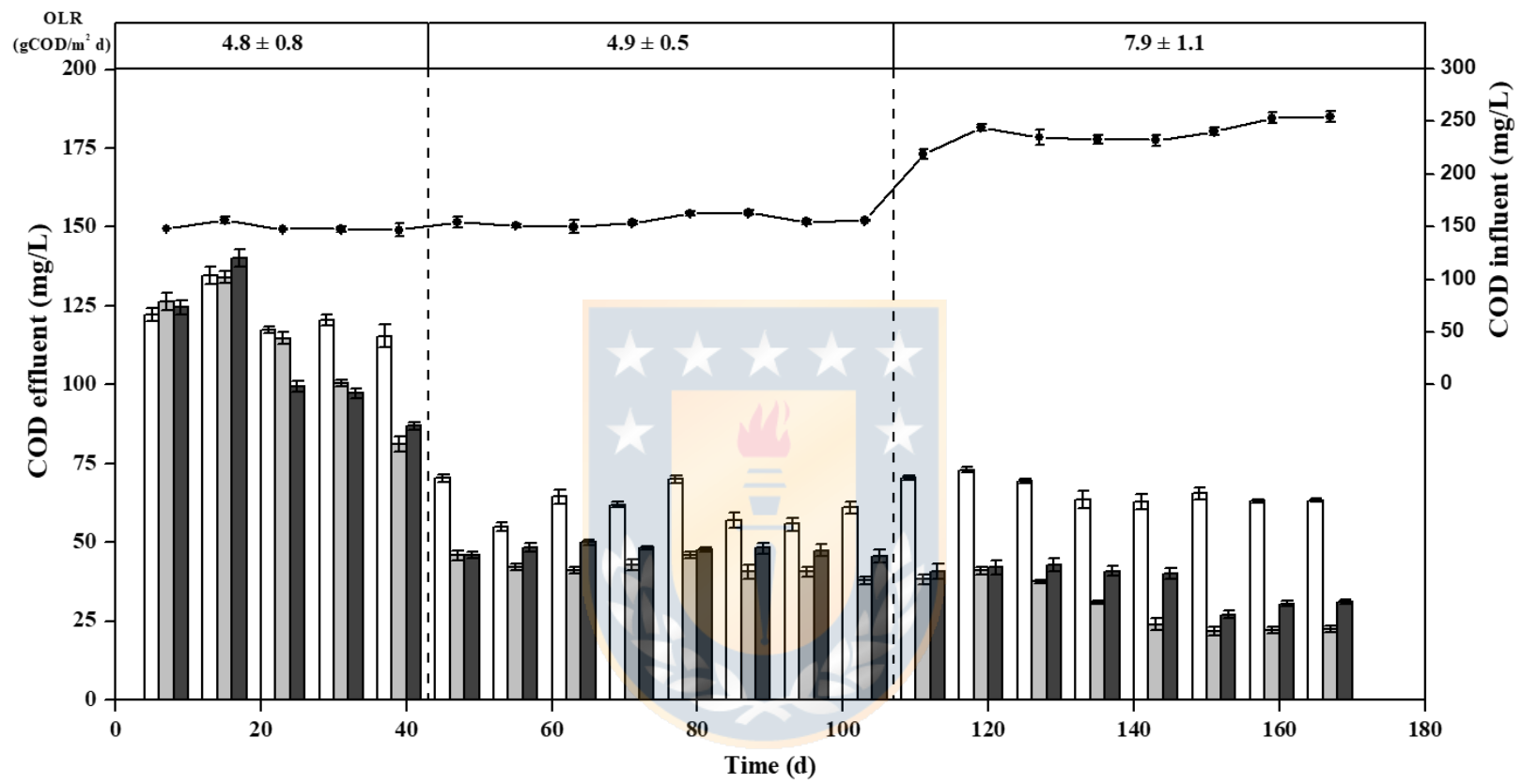


Figure 2. Effluent COD variation for CW ( $\square$ ), P-CWMFC ( $\blacksquare$ ) and NP-CWMFC ( $\blacksquare$ ) with time

Fig 3a and 3b show the average COD concentration of the effluent and the average removal efficiency for CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC during the stages I, II and III of the operation. Regarding the removal efficiency of COD in stage I there was no significant differences observed among any of the three operating systems ( $p>0.05$ ). The average values were 22.23 %, 28.57% and 29.13% for CW, P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively (Fig.3b). On stage I, the average COD concentration of the influent was  $149.3 \pm 3.61$  mg/L and the effluent of CW, P-CWMFC and NP-CWMFC were  $124.7 \pm 7.47$ ,  $112.4 \pm 20.1$  and  $112.1 \pm 19.7$ , respectively. On the other hand, in stage II a decrease in the average COD concentration of the effluent was observed. These values were 50.4%, 63% and 53.4% for CW, P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively. The average removal efficiency of ORL was 61.63%, 73.64% and 68.67% for CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC, respectively. The performance of COD removal in the P-CWMFC was significantly higher than in CW and NP-CWMFC ( $p<0.05$ ). On stage III, the average concentration of COD for CW ( $67.47 \pm 4.61$  mg/L) was significantly higher ( $p<0.05$ ) than P-CWMFC ( $29.21 \pm 8.72$  mg/L) and NP-CWMFC ( $36.87 \pm 6.25$  mg/L). Therefore, the greater efficiency rates in elimination were obtained by P-CWMFC and NP-CWMFC with 86.77% and 80.84%, respectively, finding no significant differences between the planted system and the one without plant (NP-CWMFC) ( $p>0.05$ ). On the contrary, CW obtained a removal efficiency of 71.79%, finding no significant differences ( $p>0.05$ ) between stages II and III. The significant difference ( $p<0.05$ ) found between CW and P-CWMFC and NP-CWMFC could be related to the different adsorption properties the gravel and GAC possess. Besides, the GAC, due to its compatibility to electrochemically active microorganisms, works as an extra electron acceptor. Since anaerobic degradation is a slow process and limited by the lack of availability of  $O_2$  or another acceptor, the anode in the case of the integrated systems contributes to improving the treatment

under anaerobic conditions through an electrogenic degradation (Srikanth and Venkata Mohan, 2012).

The results obtained by both integrated systems were between 63% and 143 % higher than the ones reported by Wang et al. (2017) who studied the behavior of carbon filter felt, stainless steel mesh, graphite rod and foamed nickel as anodes in similar operating conditions. This could be explained by the different adsorption properties of the aforementioned materials and the GAC. The functional groups and a large specific surface possessed by the granular activated carbon used in our study as electrode material. The activated carbon grains bonded with EAMs are capable to extract electrons from organic matter and storing them inside. These characteristics would improve the adhesion of microorganisms on the anodic surface, which could have improved the removal COD in the CW systems with integrated fuel cells (Sonawane et al., 2016).

Regarding the OLR effect on the removal efficiency of COD, only the P-CWMFC system showed a significant increase from 28.76 % to 86.77% between stages I and III ( $p < 0.05$ ). On the contrary, the NP-CWMFC didn't show significant differences regarding the elimination efficiency of COD, between the stages I and II ( $p > 0.05$ ), but it was significant between stages II and III since it increased by 69% to 81% ( $p < 0.05$ ).

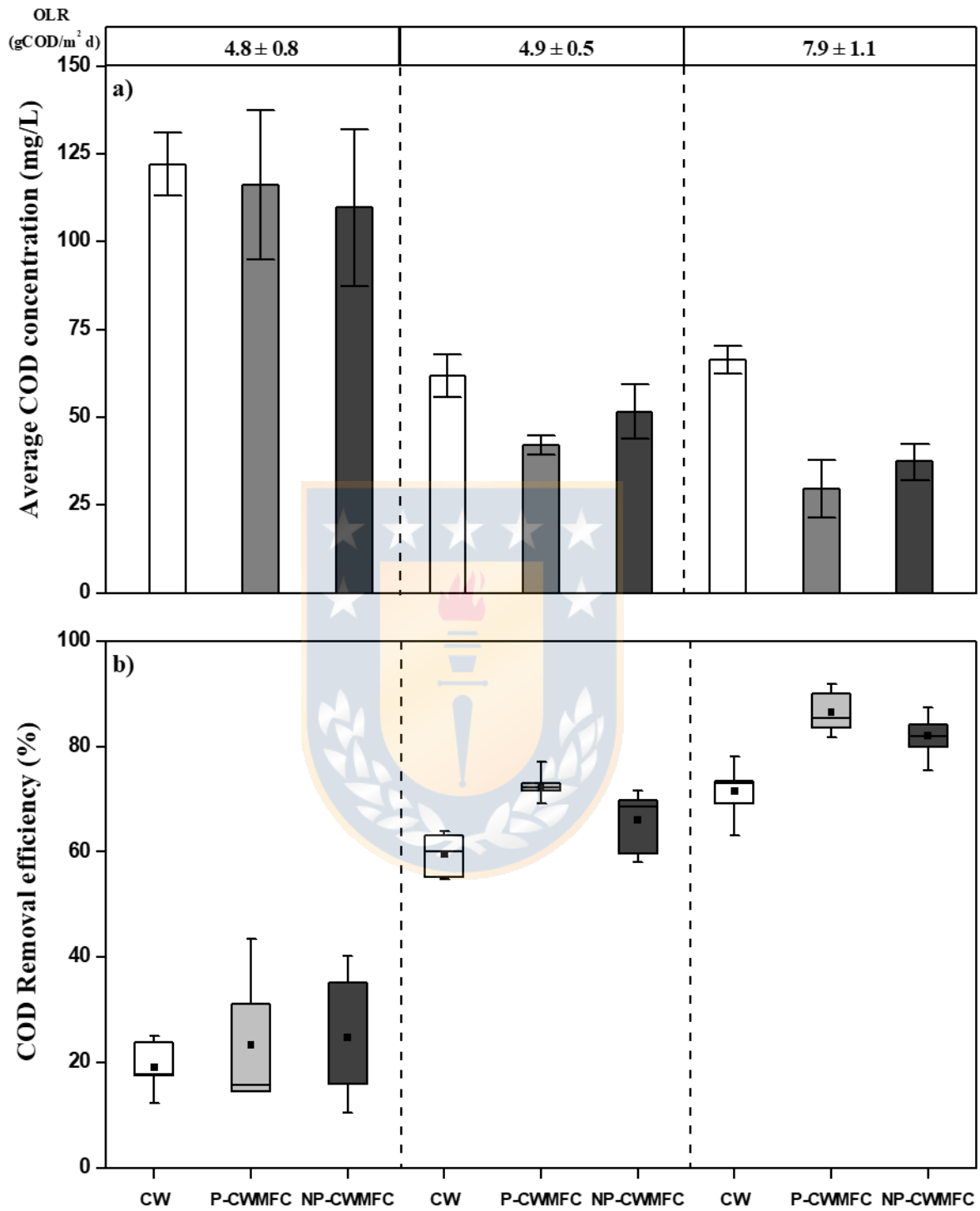


Figure 3. a) COD effluent concentrations (box plot) and b) COD removal efficiencies (bar chart) during different operation stages in CW (□), P-CWMFC (■) and NP-CWMFC (■).

In Table 4, the effect of HRT in the removal of organic matter, measured as COD during the three operational stages. In general, the observed tendency for the three systems was an increase in the removal efficiency of COD with an increase in HRT during all stages. The difference between the maximum and minimum value was 8.91, 10.5, 12.2% for CW; 10.2, 11.3, 14.1% for P-CWMFC and 14.6, 5.31, 9.98% for NP-CWMFC during the stages I, II and III, respectively. However, in the first two stages, the values obtained weren't significantly different from each other ( $p>0.05$ ).

Moreover, it was observed that at day 2 of HRT there was an increase of 42.4%, 58.4% and 60.86% for CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC, respectively; at day 5 of HRT, the values were 45.9%, 55.5% and 53.5% for CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC, respectively. At day 7 of HRT, the percentages were 53.7, 62.3 and 56.2 for CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC, respectively in the elimination of organic matter from stage I to III.

In the stage, I, the COD elimination efficiency in the control system (CW) was approximately 4, 10 and 7% lower than integrated systems (P-CWMFC and NP-CWMFC) in an HRT of 2, 5 and 7 days, respectively. Meanwhile, in stage III, these values were 21, 19 and 13% on day 2, 5 and 7, respectively.



Table 4. COD effluent concentration for CW, P-CWMFC and NP-CWMFC under different hydraulic retention time (2, 5 and 7 days) during the operational stages I, II and III.

HRT (d)	System	Stage I			Stage II			Stage III		
		COD (mg/L)		Removal efficiency (%)	COD (mg/L)		Removal efficiency (%)	COD (mg/L)		Removal efficiency (%)
		Average	Range		Average	Range		Average	Range	
2	CW	135.56±9.76	126.56-150.93	9.76	78.169±11.7	60.620-100.70	49.68	116.873±9.31	106.29-137.35	52.15
	P-CWMFC	126.56±12.9	92.440-152.31	14.88	59.568±6.37	50.140-71.310	61.67	62.726±15.20	44.330-77.650	73.26
	NP-CWMFC	131.26±15.8	105.77-141.20	11.98	59.776±5.64	47.490-80.350	61.77	63.634±10.51	36.920-70.820	72.84
5	CW	129.59±8.36	117.31-137.92	13.65	66.780±5.06	58.335-73.562	57.01	98.783±9.71	84.268-110.32	59.56
	P-CWMFC	113.09±21.8	84.463-139.38	23.94	52.204±4.58	45.115-57.362	66.41	48.148±13.01	21.663-63.250	79.48
	NP-CWMFC	113.25±20.3	89.087-134.40	24.06	52.685±7.94	40.865-67.471	66.30	52.541±12.15	30.291-69.570	77.58
7	CW	122.05±7.56	111.69-134.72	18.67	61.868±6.04	54.845-70.255	60.18	67.412±5.68	62.862-78.411	72.40
	P-CWMFC	111.32±21.1	81.125-134.02	25.13	42.065±2.73	37.780-45.813	72.94	29.593±8.16	20.724-40.932	87.39
	NP-CWMFC	109.44±22.2	85.892-140.15	26.61	51.476±7.65	45.544-66.026	67.08	38.907±6.30	30.432-45.925	82.82

- Nitrogen transformation. Figure 4 shows the concentration of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  from the effluent for CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC during the stages I, II and III composed by 21 feeding cycles. Through an ammonium removal profile in time, it was observed that during the start-up (stage I) the concentration of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  from the effluent ranged from 16.2 to 18.7 mg/L, from 14.0 to 18.2 mg/L and 12.8 to 16.5 mg/L for CW, P-CWMFC, and NP-CWMC, respectively. In CW, the concentration ranges of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  were from 7.44 to 9.67 mg/L and from 6.53 to 8.63 mg/L during stages II and III, respectively. In the case of integrated systems P-CWMFC and NP-CWMFC, a notorious decrease in the concentration of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  was observed, with values above 1.4 mg/L and below 5.0 mg/L, during stage II. In stage III, the values were reduced to 0.76 mg/L and 0.98 mg/L of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  in P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively.



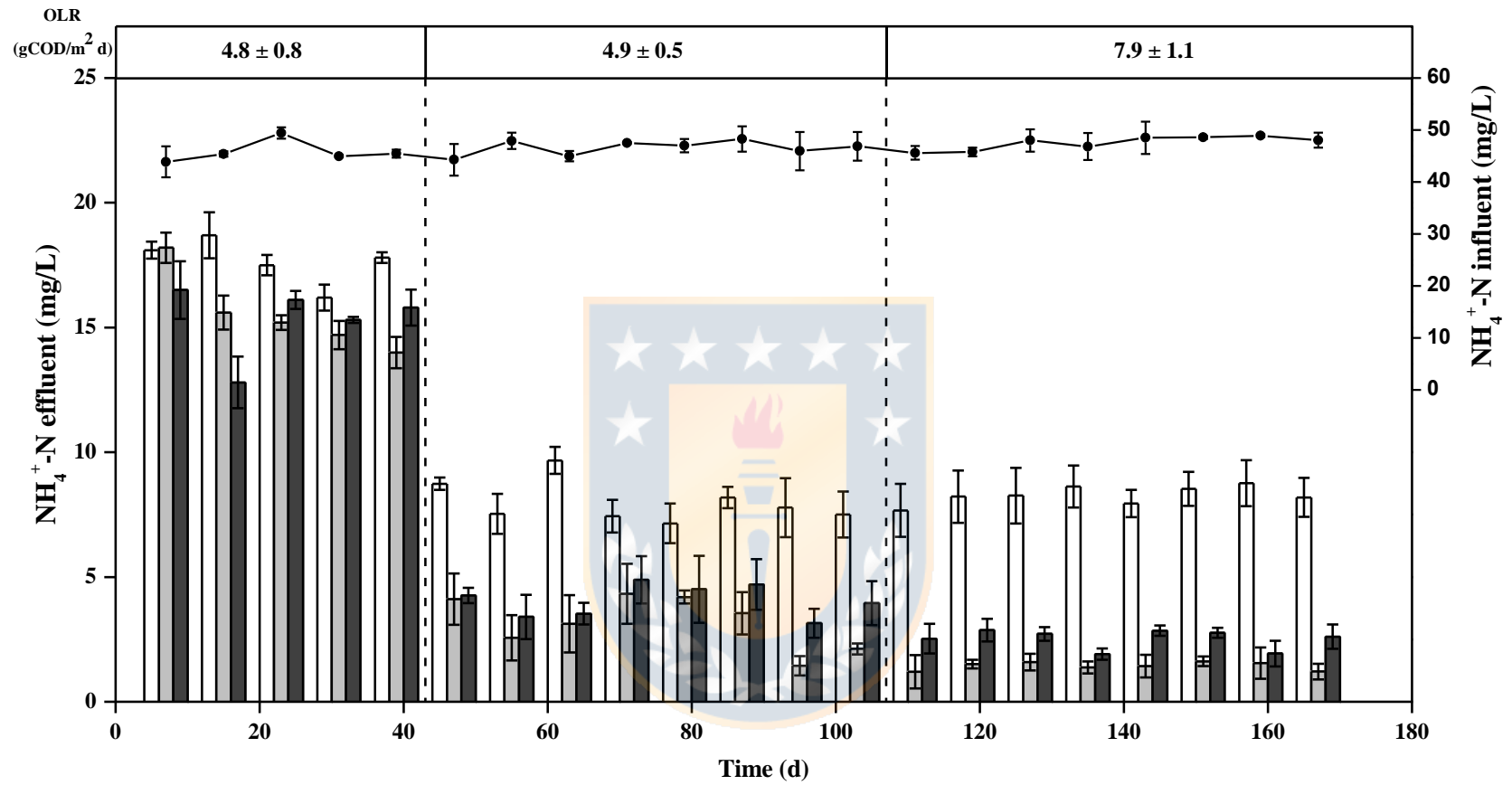


Figure 4. Effluent  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  concentration for CW (□), P-CWMFC (■) and NP-CWMFC (■) during different stages.

Figure 5a shows average effluent concentrations of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  for the control system (CW) as well as for the integrated systems (P-CWMFC and NP-CWMFC) during the different operation stages. The values obtained in stage I were  $17.66 \pm 0.93$  mg/L for CW,  $15.54 \pm 1.60$  mg/L for P-CWMFC and  $15.44 \pm 2.31$  mg/L for NP-CWMFC. This corresponds to a  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  removal efficiency of  $62.28 \pm 2.12$  %,  $65.98 \pm 3.97$  % and  $66.56 \pm 3.08$  % for CW, P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively (Fig.5b). There were no significant differences found on the removal performance of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  obtained among the different systems ( $p > 0.05$ ) during this stage. The concentration of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  in CW decreased to 8.05 and 8.65 mg/L on the stages II and III, respectively, without a significant effect in the OLR (stage II: 4.92 and stage III: 7.93 COD g/m<sup>2</sup> d) ( $p > 0.05$ ). The average removal efficiencies varied from  $83.71 \pm 1.65$  to  $82.62 \pm 2.16$  %, during stages II and III (Fig.5b). These results are consistent with the ones reported by Leiva et al. (2018), who recorded average removal efficiencies of 64-89% using ALRs of 1-4 g  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  /m<sup>2</sup> d. However, the nitrification in CW decreased by 6.94% due to an increase in C/N relation from 3.3 to 5.3 from stage II to III. The nitrification is benefited by the C/N relations lower than 2.5:1. This could be confirmed by the work of Liu et al. (2013) where a vertical wetland system without aeration, reduced its  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  removal efficiency by 59.19% to 45.75% when increasing the C/N relation from 2.5 to 10.

On the other hand, in the systems, P-CWMFC and NP-CWMFC, the average concentration of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  varied from  $3.19 \pm 0.82$  to  $1.45 \pm 0.38$  mg/L and from  $4.05 \pm 0.65$  to  $2.39 \pm 0.22$  mg/L, respectively, during stages II and III (Fig.6a). The efficiency levels were higher than 90% and lower than 98 % for both systems (Fig.6b). In stage III, a significant effect in the removal efficiency of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  was observed in the integrated systems compared to the control system. The difference between P-CWMFC and CW was 14.5%, and between NP-CWMFC and CW was 11.7% ( $p < 0.05$ ). These

results could be explained by the synergistic effect between the MFC and the constructed wetland. In this study, the presence of anodic and cathodic electrodes based on carbon (GAC) would propitiate the growth of nitrifying bacteria (ammonia oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB)) as well as electrochemically active bacteria, due to its compatibility and rough surface. Du et al. (2014) detected an increase of 29.6% to 40.8% in nitrifiers (*Nitrosomonas sp.*, *Nitrospira sp.* and *Nitrobacter sp.*) on the biocathode when the MFC changed from open circuit to closed circuit. Recently, Xu et al. (2018) proved to have a higher number of AOB ( $149\pm 7$ ), NOB ( $144\pm 8$ ) and Anammox ( $281\pm 8$ ) in the anodic zone of a CW-MFC system than in the same zone of a CW with AOB, NOB and Anammox equals to  $2\pm 1$ ,  $22\pm 7$  and  $93\pm 14$ , respectively.



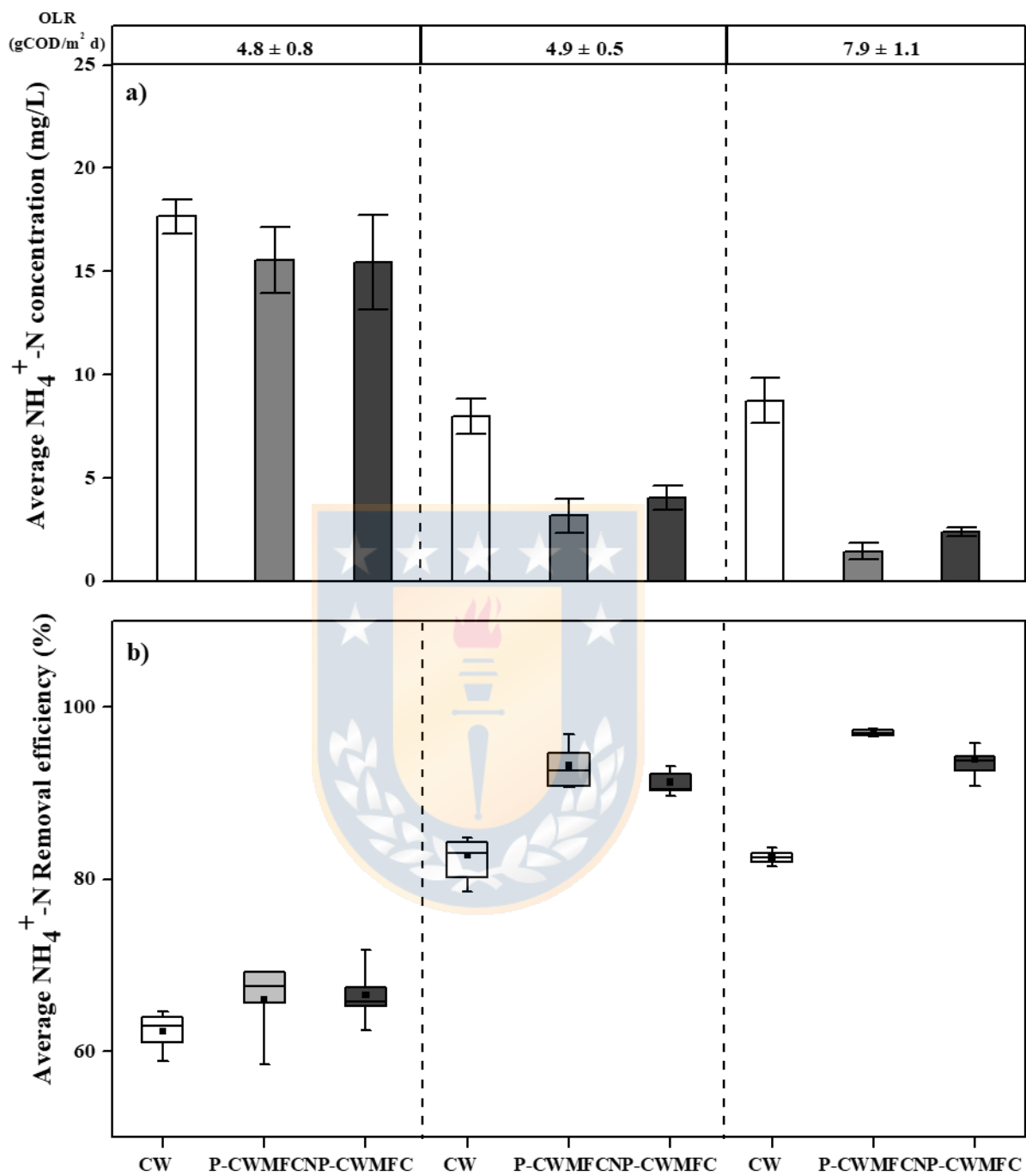


Figure 5. a)  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  effluent concentrations (bar chart) and b)  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  removal efficiencies (box plot) during different operation stages in CW (□), P-CWMFC (■) and NP-CWMFC (■).

Figure 6 shows the variation in the composition of different forms of nitrogen obtained from the anodic (SP1) and cathodic (SP2) compartment in CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC during stage III of the operation. In the three systems studied, a presence of  $\text{NO}_2^-$ -N and  $\text{NO}_3^-$ -N was observed. The values found in all systems ranged from 0.49-4.77 mg/L and 1.10-11.35 mg/L of  $\text{NO}_2^-$ -N and  $\text{NO}_3^-$ -N, respectively. Consequently, it was possible to prove that the main processes for nitrogen removal in synthetic wastewater were the nitrification, followed by denitrification since these compounds were not present in the influent. In the control system CW, the average nitrite concentration was 9.9 and 6.6 times higher than in P-CWMFC and NP-CWMC systems, respectively. In terms of nitrate, significant differences were observed in the concentrations obtained in the three systems ( $p < 0.05$ ) between SP1 and SP2. In the anodic compartment, the values were  $10.46 \pm 0.78$ ,  $1.48 \pm 0.29$  and  $1.68 \pm 0.31$  mg/L para CW, P-CWMFC, and NP-CWMFC, respectively. Meanwhile in the cathodic compartment, the concentrations were  $11.35 \pm 0.95$  mg/L for CW,  $1.10 \pm 0.07$  mg/L for P-CWMFC and  $1.34 \pm 0.54$  mg/L for NP-CWMFC. In the case of the integrated systems in both compartments (SP1 and SP2) the accumulation of  $\text{NO}_3^-$ -N was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than in the control system. In an MFC, nitrite and nitrate can be used as final electron acceptors in the cathode through electrochemical reduction competing with  $\text{O}_2$  or for autotrophic denitrification. The microorganisms can reduce the  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  to compounds like  $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  or  $\text{NO}$  (Nguyen et al., 2015), by taking the electrons from the oxidation of organic matter in the anode. For example, Gregory et al. (2004) proved that *Geobacter* was capable of recovering electrons through direct transfer from a graphite electrode, which was used to reduce  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NO}_2^-$ . It has also been confirmed that the electron transference participates in the transformation of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{N}_2$  on biocathodes formed with mixed culture (Chen et al., 2010).

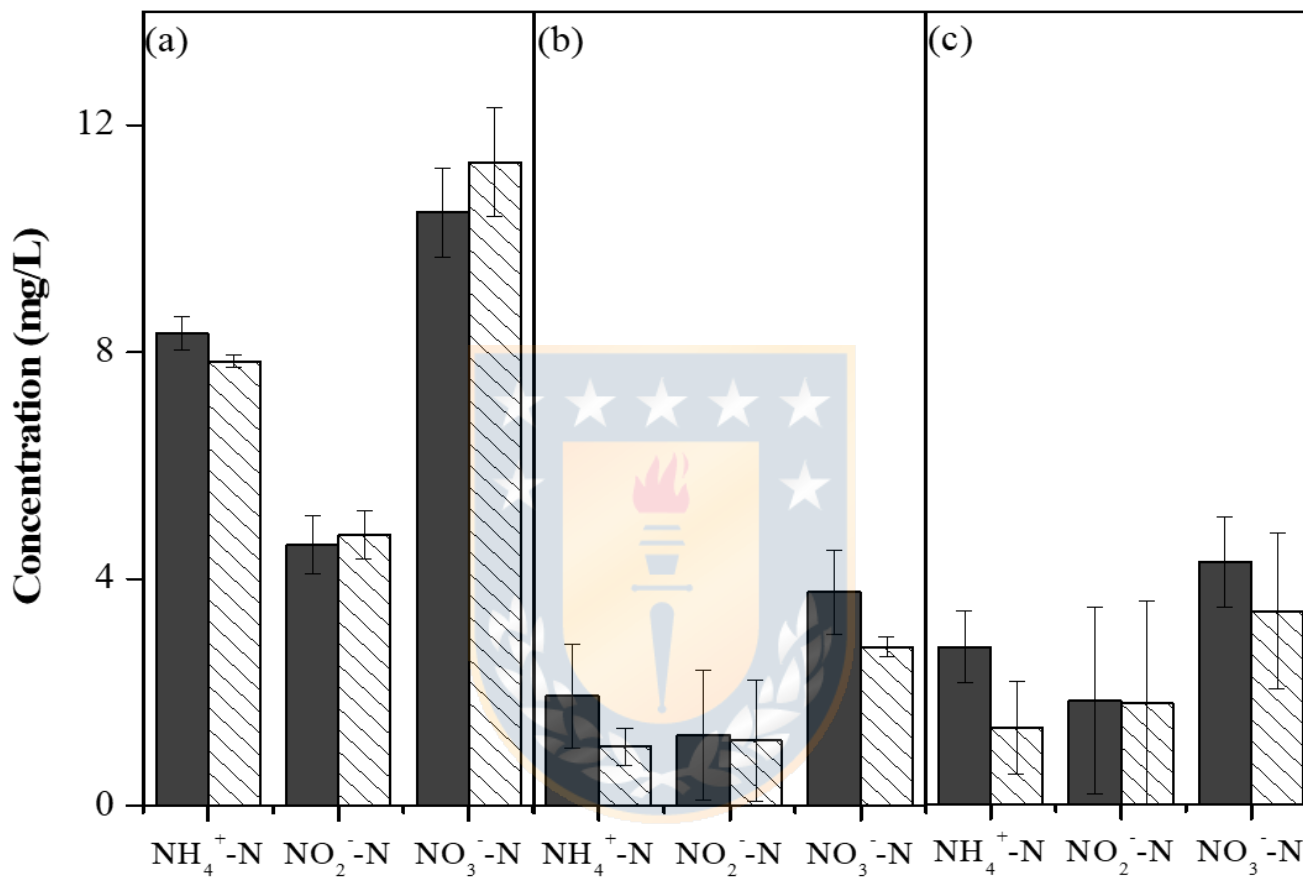


Figure 6. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub>-N and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N concentration for cathodic (□) and anodic (■) compartment in the systems: (a) CW, (b) P-CWMFC and (c) NP-CWMFC during operation stage III.



### 3.3. Bioelectricity generation

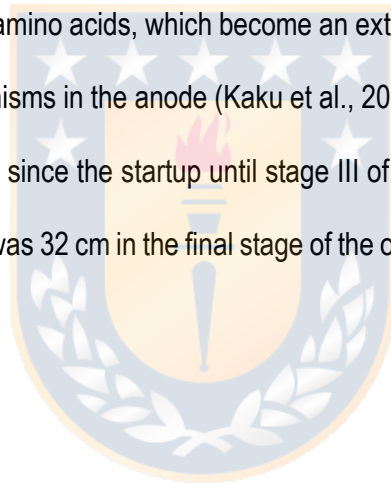
Figure 7 shows the output voltage generated through an external resistance ( $1000 \Omega$ ) for P-CWMFC and NP-CWMFC during the different operation stages. A response different from 0 voltage was observed from day 1 of the first feeding cycle (0.3728 mV and 0.8450 mV for P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively). During the startup period (stage I), both systems showed an increase in voltage, reaching a stable peak between 10 and 12 mV, and then reduce to a voltage of 1.12mV approximately. This voltage profile is related to the growth of an electroactive biofilm, due to the present microorganisms are generating electrons and transferring them to the electrode surface. The maximum average voltage until day 20 was  $14.83 \pm 0.54$  mV and  $16.40 \pm 0.32$  mV for P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively. In the following three cycles, the voltage increased by 14.8% for P-CWMFC and by 25.0 % for NP-CWMFC. There were no significant differences between both systems on the average voltage obtained ( $p > 0.05$ ).

On stage II, until day 60 of operation the voltage increases again obtaining maximum average values of  $48.05 \pm 7.43$  mV for P-CWMFC and of  $82.58 \pm 6.01$  mV for NP-CWMFC. During day 60 and 100 of the operation, a gradual change in voltage was observed and its maximum value range was  $119.69 \pm 17.95$ – $155.16 \pm 8.97$  mV and  $142.23 \pm 14.18$ – $150.08 \pm 4.62$  mV for P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively. The OLR was the same as the applied in stage I, for this reason, the observed behavior would be associated to an electroactive microbial growth on the anodic surface, since in an MFC the electricity generation depends directly of the biomass of the formed biofilm and the type of electrode surface (Kumar et al., 2016). Additionally, the average voltage values obtained were significantly different ( $p < 0.05$ ) between both systems.

During stage III, both systems showed a minor fluctuation in the output voltage ranging from 230.62 to 280.90 mV, and from 172.06 to 195.96 mV for P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively. An increase of 71.58% for P-CWMFC ( $255.93 \pm 10.92$  mV) and 46.71% for NP-CMFC ( $184.23 \pm 6.07$  mV) in the average voltage was observed when modifying the OLR from  $4.9 \pm 0.5$  to  $7.9 \pm 1.1$  g COD/m<sup>2</sup> d with an initial concentration of COD equals to 150 and 250 mg/L, respectively. These voltage values were higher than the ones reported by Zhao et al., 2013, who obtained voltage ranges from 35 to 40 mV using COD concentrations near 3000 mg/L and the same feeding methods used in this study. However, Song et al. (2017) obtained a 70% higher voltage than the one obtained in this study. They worked with the same electrode material (GAC) and similar glucose concentrations (0.2-0.25 g/L). The main difference was the operation mode since its system was fed in continuous up-flow improving the redox stratification conditions and dissolved O<sub>2</sub> in the integrated system (Corbella et al., 2016; Doherty et al., 2015).

Regarding the COD concentration of the influent, this had a significant impact in voltage generation ( $p < 0.05$ ) of P-CWMFC and NP-CWMFC, which indicates that at higher COD concentration there is more organic substrate available to be used by the electrochemically active microorganisms and transform into electric energy (Liu and Logan, 2004). Many studies have proved that the output voltage increases approximately in a linear form with the increase of the concentration of COD of the wastewater in MFC systems (Prasertsung and Ratanatamskul, 2013; Del Campo et al., 2013). On the other hand, Xu et al. (2017) evaluate the response in voltage of an integrated system (CW-MFC) facing a variation in the COD concentration from 0 to 1000 mg/L, showing a linear correlation between the output voltage and the acetate concentration ( $101.99 \pm 7.422$  to  $668.46 \pm 0.01$  mV,  $R^2 = 0.9710$ ).

Additionally, during this stage, the planted system generated approximately an output voltage 1.5 times higher than the not planted system. The difference observed between P-CWMFC and NP-CWMFC was 76.361 mV. On this sense, there was a significant effect of the plant on the generated voltage output ( $p < 0.05$ ) during stage III. This obtained voltage difference was similar to the described by Fang et al. (2013) y Liu et al. (2013a) who obtained voltage differences between planted and non-planted systems of 81.5 mV and 100 mV, respectively. This improvement in the voltage could be related to the presence of the macrophyte, since previous studies with plant-MFC systems have proven that their roots can exude a certain type of compounds, such as carbon hydrate, carboxylic acid, and amino acids, which become an extra supply of organic matter likely to be oxidized by the microorganisms in the anode (Kaku et al., 2008; Deng et al., 2012). This agrees with the root growth observed since the startup until stage III of our study. Initially, the roots had a length of 1 cm and its growth was 32 cm in the final stage of the operation when reaching the anode.



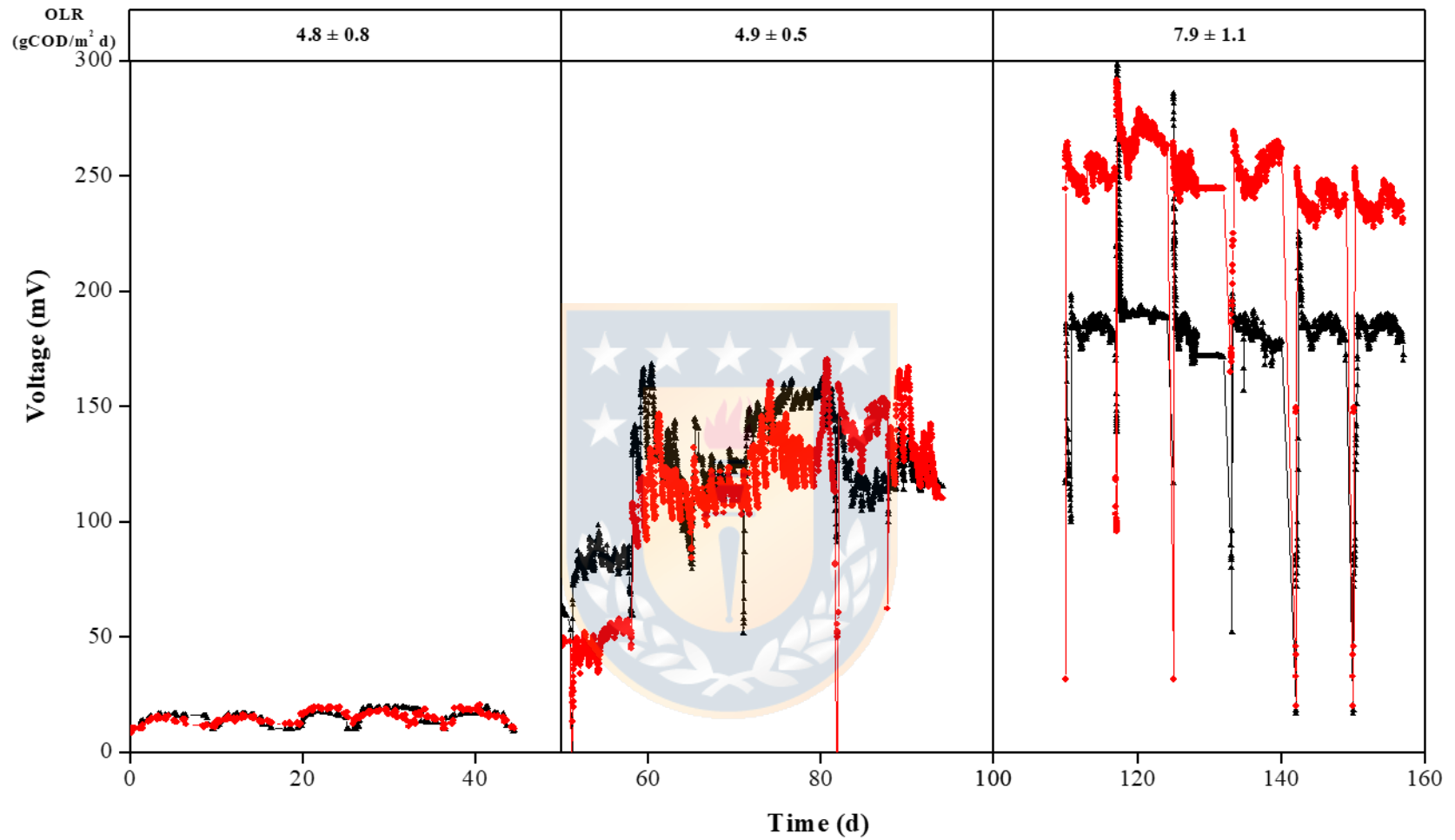


Figure 7. Voltage fluctuation recording across a 1000  $\Omega$  external resistor for P-CWMFC (●) and NP-CWMFC (▲) during different stages.

The electric performance of the integrated systems P-CWMFC and NP-CWMFC was characterized through polarization and power density curves (Fig.1S), obtained under a stationary state after day 80 (stage II) and 140 (stage III) of operation. The polarization curves of P-CWMFC and NP-CWMFC in both stages showed three zones correspondent to different voltage losses (activation, ohmic and concentration) that occur in an MFC. The Fig.1S showed that low current density ( $< 15$  mA in stage I and  $< 5$  mA in stage II) the activation losses were not important due to a mild voltage drop (see section 1). On the contrary, the intermediate current densities (section 2) the voltage dropped hard (between 80 and 190 mV). This almost linear voltage drop with the current shows that the ohmic losses were the ones that mostly affected the bio-electricity generation. This might indicate that the voltage losses in P-CWMFC and NP-CWMFC were caused by electrolyte resistance (low ionic conductivity) and resistance in used electrodes (electron collector, electric connections and electronic components between the measuring tool and the power generator device in the study, see Table 1 and Figure 1). At high current density (section 3) a mild reduction of voltage was observed ( $< 10$  mV) which indicates that the concentration losses were not relevant either. This happened because the mass transference wasn't limited for the chemical species diffusion, that means that there were neither losses on the anode for the consumption of oxidates substrates (carbon source contained in the synthetic wastewater) nor accumulation of products ( $H^+$ ) in the nearby electrolyte (Rismani-Yazdi et al., 2008).

Table 5 shows the power density values, open circuit voltage, internal resistance, and coulombic efficiency obtain during stage II and III for P-CWMFC and NP-CWMFC. The maximum power density was 5.295 and 8.555  $mW/m^2$  for P-CWMFC on stage II and III, respectively. Meanwhile, for NP-CWMFC, the values were 1.398  $mW/m^2$  in stage II and 2.451  $mW/m^2$  in stage III. An increase

in the power density was observed (62% for P-CWMFC and 75 % for NP-CWMFC) with the increase of the OLR from 4.92 to 7.93 g COD/m<sup>2</sup> d. The increase of the substrate concentration had a significant influence ( $p < 0.05$ ) in electricity generation in both systems. When working with <1000 mg/L COD concentrations, the organic matter fails to reach the cathodic compartment. This maintains the available dissolved O<sub>2</sub> levels so the reduction reactions can occur and complete the electric circuit (Doherty et al., 2015). The observed tendency was similar to the results of Wang et al. (2016), who by duplicating the COD concentration, its maximum power density increased by 3.5- and 4.6-times using graphite electrodes and carbon fiber, respectively.

The bioelectricity generation of the planted system (P-CWMGC) was improved in a factor of 2.2 and 3.5 compared to NP-CWMFC during stage II and III, respectively. The plant affected positively ( $p < 0.05$ ) the power density obtained in both stages. As mentioned above, the plant's roots play an important role in bioelectricity generation (Doherty et al., 2015). Specifically, the bacteria associated with the plant rhizosphere while being in contact with the electrodes improve their electrochemical properties. The cathodic potential turns more positive, while the anodic potential turns more negative generating more power density (Wei et al., 2010; Timmers et al., 2012; Liu et al., 2015). Even more, Fang et al. (2013) observed potentials of +300 mV and -420 mV for planted systems, and +250 mV and -380 mV for not planted systems. This proved that plant growth improves the electrode potential of MFC, which reduces its internal resistance. Since the maximum power is produced when the internal resistance is equal to the external resistance, the internal resistance reduction is one of the reasons to improve the energy generation performance for Plant- MFC systems.

Even for Plant-MFC system, there is a syntrophy between the plant and microorganism, and another between the fermentative bacteria and electrochemically active bacteria. Lu et al. (2015) reported that the electricity generation is significantly higher ( $105 \text{ mA/cm}^2$ ) in planted systems (PMFC) than in control systems without plants ( $1\text{-}3 \text{ mA/cm}^2$ ). Using pyrosequencing techniques and clones' library they showed that rhizodeposits conversion at electric current was carried out through syntrophic interactions between fermentative bacteria, like Anaerolineaceae and electrochemically active bacteria, like Geobacter.

On the other hand, in this study, it was observed that the internal resistance of NP-CWMFC system was higher than P-CWMFC by 8.10% and 52.7 % in stage II and III, respectively. Consequently, the planted system reduced by 7.52% and 34.5% the internal resistance in stage I and II, respectively. Apparently, the presence of the plant could be improving the catalytic activity of the anode, since the roots of *Schoenoplectus Californicus* grew across the reactor. This will improve microbial density and diversity in the plant's rhizosphere (Timmers et al., 2012). In fact, Hou et al. (2012) proved that the microorganisms present in the plant's rhizosphere can change the properties of the adhered surface, reducing the resistance of electrode materials.

Between stage II and III, only an increase of 6% and 3% was observed in the Open Circuit Voltage (OCV) of P-CWMFC and NP-CWMC, respectively. The OCV variation wasn't significant ( $p > 0.05$ ) between stage II and III in any of the studied systems when the COD concentration increased from 150 to 250 mg/L. However, the presence of the plant increased significantly ( $p < 0.05$ ) the open circuit voltage by 46.6 and 51.2% during stage II and III, respectively. The OCV values obtained for P-CWMFC were similar to the ones reported by Fang et al. (2016) and Xu et al. (2016), although for

NP-CWMF they were approximately 50 % lower than the found by Liu et al. (2013a) and Fang et al. (2013a).

Regarding the coulombic efficiency, the values obtained for P-CWMFC and NP-CWMFC ranged from 4.3 to 3.6% and 2.4 to 2.1%, respectively, during the whole operation time. There were no significant differences ( $p>0.05$ ) between the stages I and II. The values previously reported are higher than the ones reported by Yadav et al. (2012) (0.05-0.06%), Doherty et al. (2015b) (0.1-0.36%) and Oon et al. (2016) (0.60-1.42%). However, the values in this study are considerably lower than the ones obtained by Liu and Logan (2004) (87%) and Mohan et al. (2008) (27.0%) for MFC type systems. This would indicate that in our systems, only a part of the organic matter (glucose + acetate) was turned into bioelectricity, while the most part of the substrate could be degraded by other processes, such as fermentation and/or methanogenesis (Kim et al., 2005). One possible explanation of the low CEs values obtained is that the anodic material of our systems was inoculated with a mixed sludge. The great microorganism diversity present in this type of inoculum (Jiang et al., 2010; Gao et al., 2014) makes electrochemically active, fermentative, acetogenic and methanogenic bacteria to compete for the same substrate, causing an electron loss (Jung y Regan 2011; Kaur et al., 2014).



Table 5. Bioelectricity generation performance of P-CWMFC and NP-CWMFC during operational stage III.

Parameters	Unit	P-CWMFC		NP-CWMFC	
		Stage		Stage	
		II	III	II	III
OCV	mV	462.5±14.0	430.7±19.1	161.9±11.4	272.1±10.2
$J_{\text{máx.}}$	mA/m <sup>2</sup>	21.56±0.12	27.39±0.18	11.07±0.02	14.66±0.08
$P_{\text{máx.}}$	mW/m <sup>2</sup>	5.295±1.05	8.550±1.20	1.398±0.911	2.451±0.86
$R_{\text{int}}$	Ω	460.0±11.5	250.7±10.7	425.4±12.0	360.3±10.4
CE	%	4.3±0.21	2.4±0.13	3.6±0.11	2.1±0.15

OCV: open circuit voltage;  $I_{\text{máx.}}$ : maximum current;  $P_{\text{máx.}}$ : maximum power density;  $R_{\text{int}}$ : internal resistance; CE: coulombic efficiency.

#### 4. Conclusions

After 170 days of operation, the control system (CW) and integrated systems (P-CWMFC and NP-CWMFC) reached removal efficiency for organic matter (COD) above 72% and 87%, respectively. Nitrogen removal efficiency was 83%, 98% and 90% for CW, P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively. Additionally, P-CWMFC and NP-CWMFC showed significant differences ( $p < 0.05$ ) in the removal efficiencies when compared to CW. Therefore, by integrating a microbial fuel cell into a constructed wetland, the wastewater treatment performance was improved.

The average voltage of P-CWMFC and NP-CWMFC increased 71.6% and 46.7%, respectively, when the organic loading rate varied from 4.9 to 7.9 g COD/ m<sup>2</sup> d. Moreover, the maximum power density also increased from 5.3 to 8.6 mW/m<sup>2</sup> and from 1.4 to 2.5 mW/m<sup>2</sup> for P-CWMFC and NP-CWMFC, respectively. On the other side, the plant played an important role in the electric performance of integrated systems. The wetland plant enhanced the bioelectricity generation decreasing 1.4 times internal resistance in stage III.

## Acknowledgments

This work was supported by the grants CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2016-211160606 from CONICYT (Chile) and CONICYT/FONDAP/15130015.

## References

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation (APHA-AWWA-WEF)., 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Ed. APHA-AWWA-WEF, Washington DC.

Bialowiec, A., Davies, L., Albuquerque, A., Randerson, P. F., 2012. Nitrogen removal from landfill leachate in constructed wetlands with reed and willow: redox potential in the root zone. *J. Environ. Manage.* 97, 22-27. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.11.014>.

Butti, S., Velvizhi, G., Sulonen, M., Haavisto, J., Koroglu, E., Cetinkaya, A., Singh, S., Arya, D., Modestra, J., Vamsi Krishna, K., Verma, A., Ozkaya, B., Lakaniemi, A.M., Puhakka, A., Venkata Mohan, S., 2016. Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: maneuvering towards upscaling. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 53, 462-476. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.058>

Camacho, J. V., Vico, M. D. C. M., Andrés, M., Rodrigo, R., Morales, F. J. F., Cañizares, P. C., 2014. Energy production from wastewater using horizontal and vertical subsurface flow constructed wetlands. *Environ. Eng. Manag. Journal.* 13, 2517-2523.

Chen, G.W., Choi, S.J., Cha, J.H., Lee, T.H., Kim, C.W., 2010. Microbial community dynamics and electron transfer of a biocathode in microbial fuel cells. *Korean J. Chem. Eng.* 27, 1513–1520. <http://doi.org/10.1007/s11814-010-0231-6>.

Corbella, C., Garfi, M., Puigagut, J., 2014. Vertical redox profiles in treatment wetlands as function of hydraulic regime and macrophytes presence: surveying the optimal scenario for microbial fuel cell implementation. *Sci. Total Environ.* 470-471, 754-758. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.068>.

Corbella, C., Guivernau, M., Viñas, M., Puigagut, J., 2015. Operational, design and microbial aspects related to power production with microbial fuel cells implemented in constructed wetlands. *Water Res.* 84, 232-242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.005>.

Del Campo, A. G., Lobato, J., Canizares, P., Rodrigo, M. A., Morales, F., 2013. Short-term effects of temperature and COD in microbial fuel cells. *Appl. Energy* 101, 213-217.

Deng, H., Chen, Z., Zhao, F., 2012. Energy from plants and microorganisms: progress in plant-microbial fuel cells. *Chem. Sus. Chem.* 5, 1006-1011. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100257>.

Doherty, L., Zhao, X., Zhao, Y., Wang, W. 2015a. The effects of electrode spacing and flow direction on the performance of microbial fuel cell constructed wetland. *Ecol. Eng.* 79, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.03.004>.

Doherty, L, Zhao, Y., Zhao, X., Hu, Y., Hao, X., Xu, L., Liu, R., 2015b. A review of a recently emerged technology: Constructed wetland-Microbial fuel cells. *Water Res.* 85, 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.016>.

Du, Y., Feng, Y., Dong, Y., Qu, Y., Liu, J., Zhou, X., Ren, N., 2014. Coupling interaction of cathodic reduction and microbial metabolism in aerobic biocathode of microbial fuel cell. *RSC Adv.* 4, 34350-34355. <http://doi.org/10.1039/C4RA03441D>.

Fang, Z., Song, H., Cang, N., Li, X. N., 2013. Performance of microbial fuel cell coupled constructed wetland system for decolorization of azo dye and bioelectricity generation. *Bioresour. Technol.* 144, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.073>

Fang, Z., Song, H. L., Cang, N., Li, X. N., 2015. Electricity production from Azo dye wastewater using a microbial fuel cell coupled constructed wetland operating under different operating conditions. *Biosens. Bioelectron.* 68, 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.047>

Fang, F., Cheng, S., Cao, X., Wang, H., Li, X., 2016. Effects of electrode gap and wastewater condition on the performance of microbial fuel cell coupled constructed wetland. *Environ. Technol.* 38, 1051-160. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2016.1217280>.

Faulwetter, J., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M., Brisson, J., Camper, A., Stein, O., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecol. Eng.* 35, 987–1004. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.030>.

Gao, C., Wang, A., Wu, W., Yin, Y., Zhao, Y., 2014. Enrichment of anodic biofilm inoculated with anaerobic or aerobic sludge in single chambered air-cathode microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 167, 124-132. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.120>.

Gagnon, V., Chazarenc, F., Comeau, Y., Brisson, J., 2007. Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands. *Water. Sci. Technol.* 56, 249-254.

*Bioresour. Technol.* 167, 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.120>.

Gregory, K. B., Bond, D. R., Lovley, D. R., 2004. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 6, 596–604

Hou, B., Hua, Y.Y., Sun, J., 2012. Performance and microbial diversity of microbial fuel cells coupled with different cathode types during simultaneous azo dye decolorization and electricity generation. *Bioresour. Technol.* 127, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.017>.

Jiang, D., Li, B., Jia, W., Lei, Y., 2010. Effect of Inoculum Types on Bacterial Adhesion and Power Production in Microbial Fuel Cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 182–196. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8541-z>.

Jung, S., Regan, J. M., 2011. Influence of external resistance on electrogenesis, methanogenesis, and anode prokaryotic communities in microbial fuel cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 564-571. <https://doi.org/10.1128/AEM.01392-10>

Kantawanichkul, S., Kladprasert, S., Brix, H., 2009. Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucratus*. *Ecol. Eng.* 35, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.06.002>.

Kaku, N., Yonezawa, N., Kodama, Y., Watanabe, K., 2008. Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 43–49.

Kaur, A., Boghani, H. C., Michie, I., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., Premier, G. C., 2014. Inhibition of methane production in microbial fuel cells: operating strategies which select electrogens over methanogens. *Bioresour. technol.* 173, 75-81.

Kim, J.R., Min, B., Logan, B.E., 2005. Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 23-30.

- Kumar, R., Singh, L., Zularisam, A.W., 2016. Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 56, 1322–1336. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.029>.
- Leiva, A.M., Reyes-Contreras, C., Vidal, G., 2018. Influence of *Agapanthus africanus* on nitrification in a vertical subsurface flow constructed wetland. *Int. J. Phytoremediation* 20, 530-537. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1393390>.
- Liu, H., Logan, B.E., 2004. Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane. *Environ Sci Technol.* 38, 4040-4046. <http://dx.doi.org/10.1021/es0499344>.
- Liu, R., Zhao, Y., Doherty, L., Hu, Y., Hao, X., 2015. A review of incorporation of constructed wetland with other treatment processes. *Chem. Eng. J.* 279, 220-230. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.023>
- Liu, S., Song, H., Wei, S., Yang, F., Li, X., 2014. Bio-cathode materials evaluation and configuration optimization for power output of vertical subsurface flow constructed wetland-microbial fuel cell systems. *Bioresour. Technol.* 166, 575-583. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.104>
- Liu, S., Song, H., Yang, F., Li, X., 2013a. Power Generation Enhancement by Utilizing Plant Photosynthate in Microbial Fuel Cell Coupled Constructed Wetland System. *Int. J. Photoenergy.* 2, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/172010>.
- Liu, L., Zhao, X., Zhao, N., Shen, Z., Wang, M., Guo, Y., Xu, Y., 2013b. Effect of aeration modes and influent COD/N ratios on the nitrogen removal performance of vertical flow constructed wetland. *Ecol. Eng.* 57, 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.019>

- Logan, E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K., 2006. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* 40: 5181-5192. <http://dx.doi.org/10.1021/es0605016>.
- López, D., Fuenzalida, Vera, L., Rojas K. and Vidal, G., 2015. Relationship between the removal of organic matter and the production of methane in subsurface flow constructed wetlands designed for wastewater treatment. *Ecol. Eng.* 83, 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.06.037>.
- López, D., Sepúlveda, M. and Vidal, G., 2016. *Phragmites australis* and *Schoenoplectus californicus* in constructed wetlands: Development and nutrient uptake. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 16, 763-777. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000055>.
- Lu, L., Xing, D. and Ren, Z.J., 2015. Microbial community structure accompanied with electricity production in a constructed wetland plant microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 195, 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.098>
- Mohan, S. V., Raghavulu, S. V., Sarma, P. N., 2008. Influence of anodic biofilm growth on bioelectricity production in single chambered mediatorless microbial fuel cell using mixed anaerobic consortia. *Biosens. Bioelectron.* 24, 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.03.010>
- Nguyen, V.K., Hong, S., Park, Y., Jo, K., Lee, T., 2015. Autotrophic denitrification performance and bacterial community at biocathodes of bioelectrochemical systems with either abiotic or biotic anodes. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 180–187.
- Prasertsung, N., Ratanatamskul, C., 2013. Effects of organic loading rate and operating temperature on power generation from cassava wastewater by a single-chamber microbial fuel cell. *Desalin. Water Treat.* 52, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2013.826405>.

Oon, Y., Ong, S., Ho, L., Wong, Y., H, Y., Kaur, W., 2015. Hybrid system up-flow constructed wetland integrated with microbial fuel cell for simultaneous wastewater treatment and electricity generation. *Bioresour. Technol.* 186, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.014>

Oon, Y.L., Ong, S., Ho, L., Wong, Y., Dahalan, F., Oon, Y.L., Lehl, k., Thung, W., Nordin, N., 2016. Up-flow constructed wetland-microbial fuel cell for azo dye, saline, nitrate remediation and bioelectricity generation: From waste to energy approach. *Bioresour. Technol.* 266, 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.035>.

Pandey, P., Shinde, V., Deopurkar, R., Kale, S., Patil, S., Pant, D., 2016. Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Appl. Energy.* 168, 706-723. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.01.056>

Ramírez-Vargas, C., Prado, A., Arias, C., Carvalho, P., Esteve-Núñez, A., Hans Brix., 2018. Microbial Electrochemical Technologies for Wastewater Treatment: Principles and Evolution from Microbial Fuel Cells to Bioelectrochemical-Based Constructed Wetlands. *Water* 10, 1-29. <https://doi.org/10.3390/w10091128>, 2018.

Rismani-Yazdi, H., Carver, S.M., Christy, A.D., Tuovinen, O.H., 2008. Cathodic Limitations in Microbial Fuel Cells: An Overview. *J. Power Sources* 180, 683-694. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2008.02.074>

Samsó, R., García, J., 2013. Bacteria distribution and dynamics in constructed wetlands based on modeling results. *Sci. Total Environ.* 461–462, 430–440.



Sepúlveda-Mardones, M., López, D., Vidal, G., 2017. Methanogenic activity in the biomass from horizontal subsurface flow constructed wetlands treating domestic wastewater. *Ecol. Eng.* 105, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.039>

Sonawane, J., Yadav, A., Ghosh, P., Adeloju, S., 2016. Recent advances in the development and utilization of modern anode materials for high performance microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 90, 558-576. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.014>

Song, H., Zhang, S., Long, X., Yang, X., Li, H., Xiang, W., 2017. Optimization of Bioelectricity Generation in Constructed Wetland-Coupled Microbial Fuel Cell Systems. *Water* 9, 185. <https://doi.org/10.3390/w9030185>.

Srikanth, S., Venkata Mohan, S., 2012. Influence of terminal electron acceptor availability to the anodic oxidation on the electrogenic activity of microbial fuel cell (MFC). *Bioresour. Technol.* 123, 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.049>.

Srivastava, P., Yadav, A.K., Mishra, B. 2015. The effects of microbial fuel cell integration into constructed wetland on the performance of constructed wetland. *Bioresour. Technol.* 195, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.072>

Strik, D. P., Hamelers, H. V., Snel, J. F., Buisman, C. J., 2008. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int. J. Energy Res.* 32, 870-876.

Tanner, C., 2001. Plants as ecosystems engineers in subsurface-flow treatment wetlands. *Water Sci. Technol.* 44, 9-17.

- Timmers, R. A., Strik, D. P., Arampatzoglou, C., Buisman, C. J., Hamelers, H. V., 2012. Rhizosphere anode model explains high oxygen levels during operation of a *Glyceria maxima* PMFC. *Bioresour. Technol.* 108, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.088>
- Türker, O., Yakar, A., 2017. A hybrid constructed wetland combined with microbial fuel cell for boron (B) removal and bioelectric production. *Ecol. Eng.* 102, 411-421. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.02.034>.
- Vera, I., García, J., Sáez, K., Moragas, L., Vidal, G., 2011. Performance evaluation of eight years experience of constructed wetland systems in Catalonia as alternative treatment for small communities. *Ecol Eng.* 37, 364-371. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.11.031>.
- Vera, I., Araya, F., Andrés, E., Sáez, K., and Vidal, G., 2014. Enhanced phosphorus removal from sewage in mesocosm-scale constructed wetland using zeolite as medium and artificial aeration. *Environ. Technol.* 35, 1639-1649. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.877984>
- Villaseñor, J., Capilla, P., Rodrigo, M.A., Canizares, P., Fernández, F.J., 2013. Operation of a horizontal subsurface flow constructed wetland-microbial fuel cell treating wastewater under different organic loading rates. *Water Res.* 47, 6731-6738. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.005>.
- Vymazal, J., 2013. Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: A review. *Ecol. Eng.* 61, 582-592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.06.023>.
- Wang, Y., Yang, H., Ye, C., Chen, X., Xie, B., Huang, C., Xu, M., 2013. Effects of plant species on soil microbial processes and CH<sub>4</sub> emission from constructed wetlands. *Environ Pollut.* 174, 273-278. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.032>.

Wang, J., Song, X., Wang, Y., Abayneh, B., Ding, Y., Yan, D., Bai, J., 2016. Microbial community structure of different electrode materials in constructed wetland incorporating microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 221, 697-702. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.116>.

Wang, J., Song, X., Wang, Y., Bai, J., Li, M., Dong, G., Lin, F., Lv, Y., Yan, D., 2017a. Bioenergy generation and rhizodegradation as affected by microbial community distribution in a macrophytes. *Sci. Total Environ.* 607-608, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.243>

Wang, J., Song, X., Wang, Y., Zhao, Z., Wang, B., Yan, D., 2017b. Effects of electrode material and substrate concentration on the bioenergy output and wastewater treatment in air-cathode microbial fuel cell integrating with constructed wetland. *Ecol. Eng.* 99, 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.015>.

Wu, D., Yang, L., Gan, L., Chen, Q., Li, L., Chen, X., Wang, X., Guo, L., Miao, A., 2015. Potential of novel wastewater treatment system featuring microbial fuel cell to generate electricity and remove pollutants. *Ecol. Eng.* 84, 624-631. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.09.068>.

Xie, T., Jing, Z., Hu, J., Yuan, P., Lui, Y., Cao, S., 2018. Degradation of nitrobenzene-containing wastewater by a microbial-fuel-cell-coupled constructed wetland. *Ecol. Eng.* 112, 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.12.018>.

Xu, L., Zhao, Y., Fan, C., Fan, Z., Zhao, F., 2017. First study to explore the feasibility of applying microbial fuel cells into constructed wetlands for COD monitoring. *Bioresour. Technol.* 243, 846-854. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.179>

Xu, L., Zhao, Y., Tang, C., Doherty, L., 2018a. Influence of glass wool as separator on bioelectricity generation in a constructed wetland-microbial fuel cell. *J. Environ. Manage.* 207, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.035>.

Xu, F., Cao, F. Q., Kong, Q., Zhou, L. L., Yuan, Q., Zhu, Y. J., Wang, Q., 2018b. Electricity production and evolution of microbial community in the constructed wetland-microbial fuel cell. *Chem Eng J.* 339, 479-486. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.02.003>

Yadav, A.K., Dash, P., Mohanty, A., Abbassi, R., Mishra B.K., 2012. Performance assessment of innovative constructed wetland-microbial fuel cell for electricity production and dye removal. *Ecol. Eng.* 47, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.06.029>

Yadav, A. K., Srivastava, P., Kumar, N., Abbassi, R., Mishra, B.K., 2018. Constructed wetland microbial fuel cell: an emerging integrated technology for potential industrial wastewater treatment and bioelectricity generation. In: Stefanakis AI, ed. *Constructed wetlands for industrial wastewater treatment*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 493-510.

Yakar, A., Türe, C., Tüker, O. C., Vymazal, J., Saz, Ç., 2018. Impacts of various filtration media on wastewater treatment and bioelectric production in up-flow constructed wetland combined with microbial fuel cell (UCW-MFC). *Ecol. Eng.* 117, 120-132. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.03.016>.

Zhang, Y., Carvalho, P.N., Lv, T., Arias, C., Brix, H., Chen, Z., 2015. Microbial density and diversity in constructed wetland systems and the relation to pollutant removal efficiency. *Water Sci. Technol.* 73, 679-686. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.542>.

Zhao, Y., Collum, S., Phelan, M., Goodbody, T., Doherty, L., Hu, Y., 2013. Preliminary investigation of constructed wetland incorporating microbial fuel cell: batch and continuous flow trials. *Chem. Eng. J.* 229, 364-370. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.023>

Zhou, M., Fu, W., Gu, H., Lei, L., 2007. Nitrate removal from groundwater by a novel three-dimensional electrode biofilm reactor. *Electrochim. Acta* 52, 6052–6059. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.03.064>



## CAPITULO V



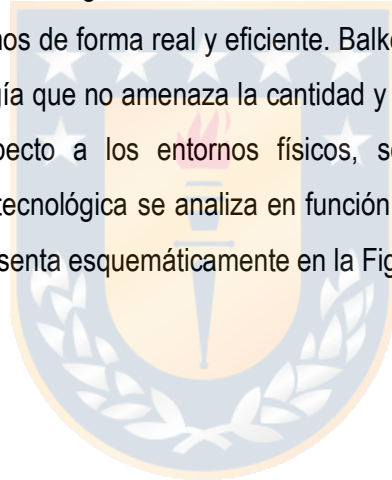
## **1. Sostenibilidad en el tratamiento de aguas servidas mediante la integración de sistemas bioelectroquímicos a humedales construidos.**

Varios estudios ya han analizado los cambios e impactos mundiales del cambio climático y la variabilidad relacionada en los recursos hídricos. Sin embargo, pocos se han centrado en una evaluación de cuáles son los efectos específicos, y la adaptación y mitigación necesarias para los sistemas de tratamiento y distribución de agua en ciudades de todo el mundo (Zouboulis y Tolkou, 2014). El cambio climático no se trata solo de cambios de temperatura. Todo el ciclo del agua también se ve afectado. Un planeta más cálido significa que la atmósfera tiene la capacidad de retener una mayor humedad. En consecuencia, hay cambios en la cantidad de vapor de agua, lluvia y circulación de agua en la atmósfera. La lluvia tiene muchas características como cantidad, frecuencia, intensidad y tipo. El cambio climático está afectando el ciclo hidrológico de las siguientes formas: variando los patrones de precipitación, la nieve y el hielo se están derritiendo, y el vapor de agua atmosférico y la evaporación están aumentando (Singh y Tiwari, 2019). Debido a esto, existe un riesgo de introducir nuevos problemas al implementar diversas soluciones debido a la complejidad y dinámica de las problemáticas actuales. Para garantizar que esas soluciones planteadas tengan un efecto positivo, la sostenibilidad es una herramienta útil como punto de partida para identificar soluciones para el ciclo del agua. Por lo tanto, es importante definir el concepto de sostenibilidad y de tecnología sostenible en el tratamiento de aguas residuales.

El concepto de desarrollo sostenible se basa en la observación de que la economía, el medio ambiente y el bienestar social ya no pueden separarse. La Comisión Mundial sobre Medio Ambiente y Desarrollo definió desarrollo sostenible como “desarrollo que satisface las necesidades de la generación actual sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades” (WCED 1987). Para implementar un desarrollo sostenible se necesita buscar soluciones que equilibren los costos con respecto a los diferentes recursos (ambientales, económicos y socioculturales) de tal manera que la contribución a los problemas locales y globales se minimice o al menos se conozca y se tenga en cuenta. Estas soluciones deben basarse en una visión a largo plazo y global que considere posibles problemas futuros. De este modo se evita la exportación de problemas en el tiempo o el espacio. El concepto de sostenibilidad deja espacio para la interpretación basada en el conocimiento actual, las circunstancias locales y la cultura. Por

lo tanto, debe haber una diversidad de soluciones de desarrollo sostenible, preferiblemente flexibles para adaptarse a las situaciones cambiantes.

Para los problemas que se presentan en el sector del agua se están buscando soluciones tecnológicas. Si se toma en cuenta la sostenibilidad como punto de partida, se tendrá que analizar la sostenibilidad de las diferentes soluciones tecnológicas. La tecnología sostenible es muy similar a lo que solía definirse como tecnología apropiada, es decir, tecnología compatible o fácilmente adaptable al entorno natural, económico, técnico y social que ofrece la posibilidad de un mayor desarrollo con una visión a largo plazo y global. Esto significa que se deberán considerar las diferentes dimensiones de la sostenibilidad al analizar dicha tecnología. La tecnología sostenible puede ser de alta tecnología o de baja tecnología siempre, que sea apropiada para circunstancias específicas. Las soluciones tecnológicas sostenibles deben ser eficaces, proporcionando una solución con los costos mínimos de forma real y eficiente. Balkema (2003) identificó la tecnología sostenible como una tecnología que no amenaza la cantidad y calidad de los recursos y tiene los costos más bajos con respecto a los entornos físicos, socioculturales y económicos. La sostenibilidad de la solución tecnológica se analiza en función de la interacción de la tecnología con su entorno. Esto se representa esquemáticamente en la Figura 1.





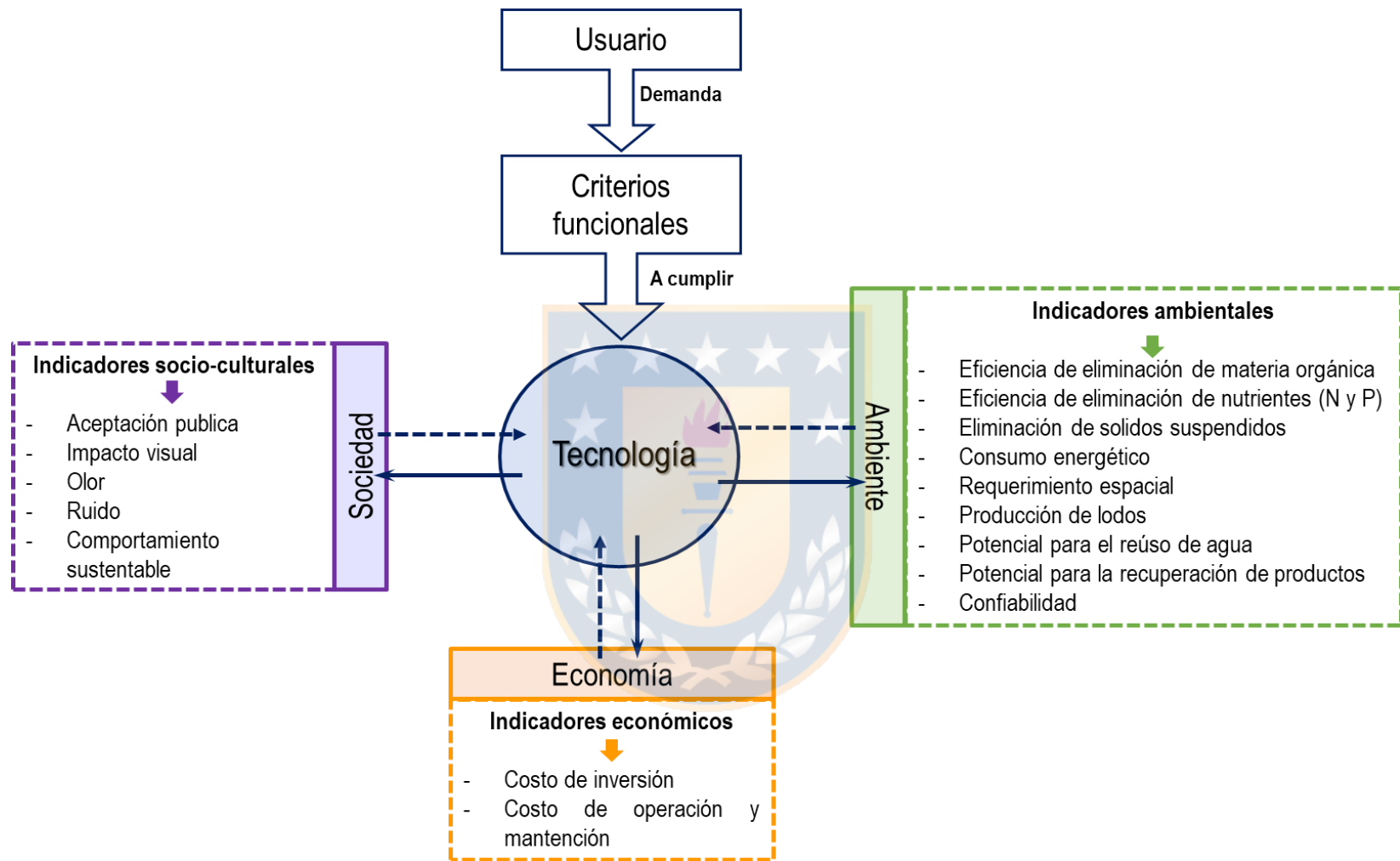


Figura 1. Tecnología en función de la interacción con su entorno y los indicadores usados en la evaluación de la sostenibilidad de un tratamiento de aguas residuales.

Para cumplir su función, la tecnología utiliza recursos de su entorno y a su vez lo afectará a través de las emisiones. Por ejemplo, los diferentes recursos que se pueden usar son: dinero del entorno económico, recursos naturales como el agua y energía del entorno físico o ecológico, y experiencia del entorno sociocultural. Por otra parte, las emisiones que pueden afectar al entorno son: la disminución del valor económico debido a la implementación de una tecnología o la demanda de recursos escasos, como la mano de obra, puede afectar el entorno económico, la contaminación ambiental puede deteriorar el entorno físico o ecológico, mientras que los inconvenientes o la participación pueden ser negativos o influir positivamente en el entorno sociocultural (Molinos-Senante et al., 2015). Finalmente, la tecnología sostenible es una tecnología que no amenaza la cantidad y la calidad (incluida la diversidad) de los recursos. Las soluciones más sostenibles son aquellas que tienen los costos más bajos con respecto a los diferentes entornos. A medida que la cantidad y la calidad de los recursos y la resistencia del medio ambiente a las emisiones difieran en el tiempo y el espacio, también lo hará la solución tecnológica más sostenible. Siguiendo la visión tradicional de la sostenibilidad (WCED, 1987), el concepto de tecnología sostenible se divide en tres componentes o dimensiones: ambiental, económico y social. Cada uno de estas dimensiones es evaluada mediante diferentes indicadores (ver Figura 1).

En el caso de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas, los indicadores económicos representan los costos asociados con la construcción y el funcionamiento de la planta de tratamiento. A menudo son decisivos a la hora de elegir una tecnología en una situación práctica (Balkema et al., 2002). Los indicadores más utilizados son los costos de inversión, operación y mantenimiento. Cabe destacar que cuando se comparan los costos de inversión de diferentes tecnologías de tratamiento, es primordial tener en cuenta la vida útil de cada tecnología.

Los indicadores ambientales se refieren a la eficiencia ambiental de la tecnología de tratamiento de aguas residuales respecto a calidad del efluente, recursos utilizados, emisiones y el potencial de la tecnología para implementar procesos adicionales. Debido a que los componentes convencionales de la calidad del agua asociados con el tratamiento de aguas residuales son: materia orgánica, sólidos suspendidos, nitrógeno y fósforo, el grupo de indicadores ambientales se relaciona con la eficiencia de la eliminación de dichos contaminantes. Respecto a la huella de carbono, el indicador elegido es la energía consumida para llevar a cabo el tratamiento. El espacio requerido por las diferentes tecnologías de tratamiento difiere considerablemente si serán utilizadas

para sectores urbanos o rurales (tecnologías tanto intensivas como extensas). Por lo tanto, la superficie de tierra a ocupar se propuso como indicador de sostenibilidad ambiental. Debido a que los lodos son un subproducto inevitablemente generado en las plantas de tratamiento, cuya gestión es uno de los problemas más complejos que enfrenta la industria (Metcalf y Eddy, 2004), la producción de lodos también se consideró como un indicador ambiental del desempeño de las tecnologías de tratamiento de aguas servidas. Otro grupo de indicadores ambientales es el potencial para reutilizar el agua y el potencial para recuperar productos de las aguas residuales. Respecto a los indicadores sociales, estos representan el impacto de la tecnología de tratamiento en la sociedad. La mayoría son indicadores cualitativos y, por lo tanto, a menudo no se abordan en la evaluación de la sostenibilidad de las tecnologías. Sin embargo, es esencial incluir el impacto de la implementación de la tecnología en la sociedad en general. Los indicadores en esta categoría son los siguientes: (i) olor; (ii) ruido; (iii) impacto visual; (iv) aceptación pública; (v) complejidad de la construcción y operación (Molinos-Senante et al., 2014).

La implementación de las plantas de tratamiento de aguas servidas requiere inversión, pero seleccionar la tecnología más adecuada no es solo un problema económico, ya que otros criterios como los aspectos ambientales y sociales, deben tenerse en cuenta en el proceso de decisión. Por lo tanto, existe la necesidad de un cambio de paradigma, considerando los aspectos ambientales y sociales, y no solo los problemas técnicos y económicos. En este contexto, la selección del diseño de planta más apropiado implica el cumplimiento de una variedad de objetivos y la consideración de criterios múltiples de sostenibilidad (Muga y Mihelcic, 2008).

Por otra parte, los procesos convencionales de aguas servidas demandan consumos intensos de sustancias químicas, energía y materiales. La demanda energética requerida aproximada es 0.5-2 kWh/m<sup>3</sup> de agua servida tratada para la eliminación de carbono y nitrógeno de forma parcial (Gude, 2015), enfocándose sólo en satisfacer las normas de descarga. Adicionalmente, una cantidad considerable de gases de efecto invernadero (GEI) como CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O son liberados a la atmósfera. Por cada 1000 m<sup>3</sup> de aguas servidas tratadas se liberan a la atmósfera 1500 toneladas de gases de efecto invernadero (Wang et al., 2010). Por otro lado, la generación excesiva de lodo es un pasivo ambiental que necesita tratamiento adicional y un lugar adecuado para su posterior disposición. Los sistemas convencionales establecidos en la mayor parte del mundo se basan principalmente en la tecnología de lodos activados, donde el consumo energético es 0,33-0,60

kWh/m<sup>3</sup>. El 50% del gasto total en energía eléctrica es ocupado en tanques de aireación con una producción de lodos entre 0,35-0,45 g SSV/g DQO (Gude, 2016). Estos hechos demuestran que los sistemas de tratamiento no son sostenibles ante el actual escenario mundial con problemas energéticos relacionados por un lado al agotamiento de combustibles fósiles y la escasez de agua debido al cambio climático y mala gestión del recurso. Por otro lado, la urbanización y migración, son tendencias globales que combinado con los efectos del cambio climático han aumentado la demanda principalmente de agua, alimentos y energía, poniendo en riesgo la sostenibilidad del nivel de vida actual (Virdis et al., 2011). La presión que existe sobre la disponibilidad de agua también ha afectado a otros sectores consumidores como la agricultura, industria minera y por supuesto la generación de energía. Frente a la alta demanda de recursos, ha surgido la necesidad de que estos puedan ser potencialmente recuperados a partir de diferentes fuentes residuales líquidas (Virdis et al., 2011). Por lo tanto, es importante darles un valor económico a los residuos y tomar conciencia de que no debe perderse esta fuente de obtención de recursos. En general las aguas residuales de tipo industrial, servidas y agrícolas son ubicuas y representan una fuente potencial de recuperación de recursos como energía, agua y nutrientes. Las aguas servidas podrían potencialmente proporcionar una producción energética de hasta 2,2 kWh/m<sup>3</sup>, considerando el contenido de energía de la glucosa como 4,4 kWh/kg DQO. El desarrollo de tecnologías capaces de recuperar la energía, el agua y los nutrientes desde aguas residuales son cruciales para la gestión de recursos en el futuro. En vista de los problemas anteriores, el diseño y operación de los sistemas de tratamiento de aguas residuales actuales deberá conseguir desde la eliminación completa de contaminantes, hasta la recuperación de recursos, minimizando el uso de energía y maximizando su retorno.

En términos generales, la energía disponible en las aguas servidas se puede encontrar de dos formas y se clasifica como química y térmica. El 26 % de la energía química está en forma de carbono (medida como demanda química de oxígeno- DQO) y nutrientes (nitrógeno y fósforo), y se puede recolectar de manera eficiente. Por otro lado, la energía térmica tiene la principal parte de este potencial energético con un 74 %, pero no puede ser extraída excepto mediante el uso de bombas de calor y sujeto a la temperatura de la fuente de recursos (agua residual). Sin embargo, mediante la extracción de la energía química no visible, el tratamiento de aguas servidas se puede convertir en un proceso que libera energía en lugar de un proceso consumidor de energía. Al mismo

tiempo que depura las aguas servidas, eliminando la contaminación ambiental. Específicamente, la energía contenida en las aguas servidas se encuentra presente principalmente bajo tres formas: a) materia orgánica (1,79 kWh/m<sup>3</sup>), b) nutrientes (0,70 kWh/m<sup>3</sup>) y c) energía térmica (7,00 kWh/m<sup>3</sup>) (Gude, 2015). Respecto a lo anterior, se ha planteado la recuperación de energía a partir de la transformación de la materia orgánica contenida en el agua servida a metano como subproducto del tratamiento anaeróbico. La investigación proveniente del EPRI (Electric Power Research Institute) muestra que la digestión anaeróbica con aprovechamiento de biogás puede producir alrededor 350 kWh de electricidad por cada 3780 m<sup>3</sup> de agua servida tratada en la planta. Por otro lado, las PTAS con una capacidad de tratamiento de menos de 18900 m<sup>3</sup>/d no producen suficiente biogás para hacer viable o rentable la generación de electricidad, lo cual hace que esta tecnología no sea la más ocupada en el tratamiento de aguas servidas (Scott y Yu, 2015).

En este contexto las tecnologías con sistemas bioelectroquímicos están surgiendo como soluciones innovadoras para el tratamiento de residuos líquidos, ofreciendo plataformas flexibles para los procesos de oxidación y reducción. Se ha desarrollado una gran variedad de aplicaciones utilizando la energía producida en los sistemas bioelectroquímicos, como la generación directa de energía eléctrica (celda combustible microbiana), la producción química (celda de electrolisis microbiana) o la desalinización del agua (celda de desalinización microbiana) (Chen et al., 2015). La celda de combustible microbiana se distingue de otros sistemas comunes de generación de energía a partir de materia orgánica como la digestión anaerobia ya que presenta varias ventajas operacionales y funcionales (Rabaey y Verstraete, 2005): (i) convierten de forma directa el sustrato orgánico en energía eléctrica permitiendo una alta eficiencia de conversión, (ii) operan eficientemente a temperatura ambiente e incluso a muy bajas temperaturas, (iii) producen menor cantidad de CO<sub>2</sub> en comparación con otra tecnología actual que utilice combustibles fósiles, (iv) no necesita aporte de energía para airear el cátodo ya que esto se realiza pasivamente, (v) reducción en la generación de lodos sanitarios debido a que la materia orgánica contenida en las aguas servidas se transforma en energía eléctrica, y (vi) su potencial aplicación en lugares que carecen de infraestructuras eléctricas ampliando la diversidad de los combustibles que se utilizan para satisfacer las necesidades energéticas de la sociedad. Adicionalmente, las CCMs ofrecen beneficios ambientales (recuperación de agua y baja huella de carbono); beneficios económicos (ingresos por energía y productos de valor agregado: productos químicos, bajos costos operativos,

eliminación de procesos posteriores) y beneficios operativos (autogeneración de microorganismos, buena resistencia al estrés ambiental y susceptibles de monitoreo y control en tiempo real (Xu et al., 2019).

A pesar de la gran cantidad de ventajas mencionadas, se sigue haciendo un gran esfuerzo para mejorar el rendimiento y reducir los costos de construcción y operación de las CCMs. Todo esto para garantizar su idoneidad práctica y económica en aplicaciones a gran escala.

En la búsqueda del propósito mencionado anteriormente es que el sistema integrado planteado en esta tesis consistente en la implementación de una CCM en humedales construidos de tipo Subsuperficial Vertical fue investigado. Por un lado, las ventajas que presenta la tecnología de celda de combustible microbiana respecto a indicadores de tipo económico se puede disminuir al estar ocupando el HC como una CCM ya que los costos de inversión son menores. Por otro lado, se reduce el impacto ambiental de la tecnología de humedales construidos respecto a sus emisiones de metano. De esta forma los sistemas integrados HC-CCM pueden convertirse en una alternativa sostenible para el tratamiento de aguas residuales (Srivastava et al., 2019). Debido a la naturaleza de las tecnologías CCM y HC, la sinergia entre ellas se hace posible. Al integrar ambas tecnologías no solo se proporciona un excedente de energía mientras se depuran las aguas residuales, sino que también contribuye a la mejora y monitoreo del proceso de tratamiento en general. La producción de electricidad de una CCM es interesante en el escenario de humedales construidos, ya que esta tecnología tiene un consumo energético  $<0,1 \text{ kWh/m}^3$  para el tratamiento de aguas servidas (Corbella et al., 2017). Así, la implementación de CCMs en humedales construidos puede resultar en la generación de suficiente electricidad para cubrir parte de los requisitos energéticos del sistema o para alimentar dispositivos de entrada en ubicaciones remotas como sensores de calidad de agua. Los beneficios de la integración para la sostenibilidad en el tratamiento de aguas servidas son variados abarcando indicadores de tipo sociocultural, económico y ambiental tal como se muestra en la Figura 2. Se logra una mejora significativa en la capacidad de tratamiento, la disminución de problemas de colmatación y es efectivo para combatir el cambio climático, haciendo más sostenible la tecnología de humedales construidos (Corbella et al., 2017). Respecto a las emisiones de gases de efecto invernadero, la tecnología de CCM es un enfoque prometedor para ser integrado en humedales o arrozales. Al incorporar un ánodo en el HC, este funciona como un aceptor de electrones para las bacterias, lo que ayuda a prevenir las

reacciones bioquímicas que conducen a la formación de metano. De hecho, las bacterias electroquímicamente activas ocupan materia orgánica como alimento, lo que reduce la disponibilidad de la fuente de carbono para las bacterias metanogénicas. Estudios han demostrado que las emisiones de  $\text{CH}_4$  en los campos de arroz se pueden reducir hasta en un 50% utilizando una CCM (Arends et al., 2014). Recientemente, Wang et al. (2019) mostraron que al insertar una CCM las emisiones de gases de efecto invernadero se reducen significativamente. En un 5,9% a 32,4% en equivalentes de  $\text{CO}_2$  de los HCs al reducir de un 17,9% a un 36,9% de  $\text{CH}_4$  y un 7,2% a un 38,7% de emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ . Estos hallazgos pueden tener implicaciones importantes para el control de las emisiones de metano de los humedales, y la combinación del enfoque bioelectroquímico con otras estrategias de mitigación tendrá importancia para la aplicación práctica. La implementación de MFC en humedales construidos da como resultado la optimización del proceso de tratamiento y la reducción de su impacto ambiental.





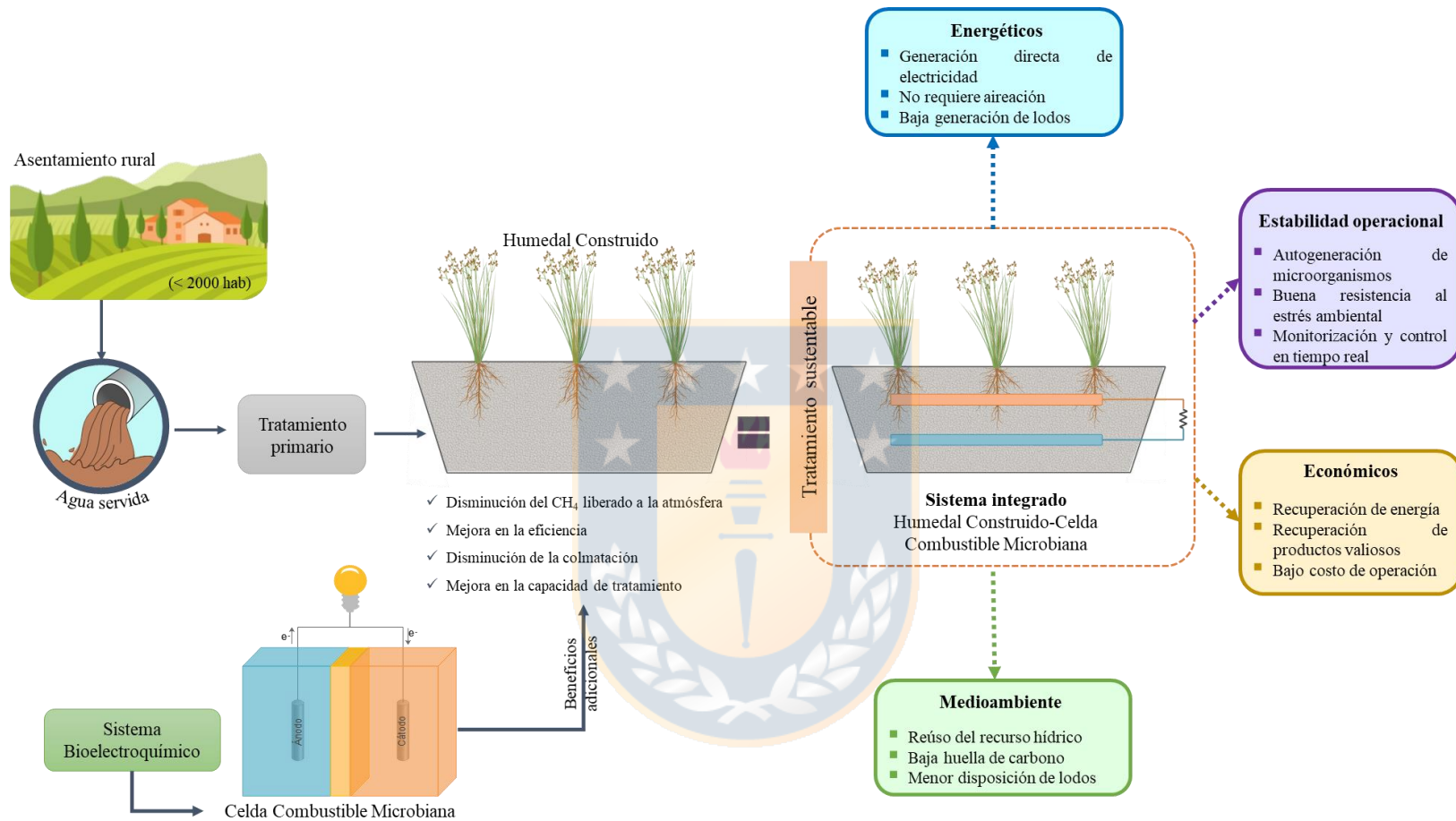


Figura 2. Beneficios de la tecnología emergente de humedales construidos-celdas combustibles microbianas para la sostenibilidad en el tratamiento de aguas servidas.



## **2. Comportamiento del sistema integrado humedal construido-celda combustible microbiana en el tratamiento de aguas servidas.**

Los HCs son reconocidos a nivel mundial como una tecnología robusta y ecológica aplicada en el tratamiento de una gran variedad de aguas residuales. Sin embargo, su eficiencia en la eliminación de nutrientes y materia orgánica aún debe mejorarse para cumplir con los estrictos estándares de descarga (Wang et al., 2017). En general los HCs son lentos en el tratamiento, por ejemplo, en humedales de tipo subsuperficial debido a sus condiciones anaeróbicas los aceptores de electrones disponibles son limitados o insuficientes. La capacidad de las CW para tratar las aguas residuales está bien establecida y, como tal, la integración de los MFC en las CW no debería reducir su eficacia para eliminar los contaminantes de las aguas residuales. Por el contrario, al integrar ambas tecnologías se demostró que la eficiencia de la eliminación puede mejorarse aún más a través de los efectos de sinergia entre los HCs y las CCMs (Kabutey et al., 2019). La idea básica detrás de este enfoque es proporcionar un aceptor de electrones extra en forma de material conductor (ánodo) en la zona anaeróbica de los HCs para promover la reacción anaeróbica (Yadav et al., 2018). En la literatura se ha reportado el uso de la DQO para probar la capacidad del sistema integrado HC-CCM en el tratamiento de aguas residuales. Srivastava et al. encontraron que la integración de la CCM aumentó entre 27 a 49% la eliminación de DQO en el sistema CW-MFC en comparación con el HC tradicional. Del mismo modo, Doherty et al. (2015) mostraron que el 33% de la DQO total se eliminó en el compartimento anódico, donde solo contenía el 13,6% del volumen de líquido del sistema CW-MFC.

### **2.1 Procesos de degradación de materia orgánica en el sistema integrado humedal construido-celda combustible microbiana**

Los humedales construidos son sistemas complejos que pueden separar y transformar los contaminantes mediante mecanismos físicos, químicos y biológicos de forma simultánea o secuencial a medida que el agua residual fluye a través del sistema (Vymazal, 2011). Los principales mecanismos de eliminación son las separaciones líquido/sólido y transformaciones de los constituyentes. En el caso de las separaciones, estas incluyen separación por gravedad, filtración, absorción, adsorción, intercambio iónico, extracción, y la lixiviación. Por su parte, las transformaciones pueden ser químicas (reacciones oxidación/reducción, floculación, reacciones

ácido/base, precipitación) o una serie de reacciones bioquímicas que ocurren bajo condiciones aeróbicas, anóxicas o anaerobias (Kadlec y Wallace, 2009).

La materia orgánica presente en el agua servida se compone de una mezcla compleja de biomoléculas (Vymazal y Kröpfelová, 2009) que se encuentra como Materia Orgánica Particulada (MOP) y Materia Orgánica Disuelta (MOD). La primera puede ser eliminada o retenida por procesos físicos (sedimentación y filtración), mientras que la forma disuelta es eliminada por procesos mediados por microorganismos en el humedal construido (Du et al., 2014). En la parte superior del HC donde predominan condiciones aeróbicas, la degradación de materia orgánica ocurre por medio de respiración aeróbica realizada por el metabolismo de microorganismos aeróbicos (bacterias heterótrofas) que utilizan el oxígeno como último aceptor de electrones. Muchas de estas bacterias son facultativas en relación al aceptor de electrones y pueden utilizar tanto el  $\text{N-NO}_2^-$  como el  $\text{N-NO}_3^-$  cuando el oxígeno es depletado (García et al., 2010).

Adicionalmente, los HCs desarrollan un ambiente anaeróbico en su parte inferior o en todo el sistema si se encuentran inundados de forma permanente. Por lo cual el principal proceso encontrado para la degradación de materia orgánica es la vía anaeróbica. Este tipo de degradación es un proceso biológico muy complejo que ocurre en ausencia de oxígeno. Se realiza en varias etapas donde participan distintos tipos de bacterias conocido como consorcio microbiano (bacterias fermentativas, bacterias oxidantes de ácidos orgánicos, metanogénicos), los cuales son capaces de convertir compuestos orgánicos presentes en las aguas servidas en  $\text{CO}_2$ , nuevas células bacterianas,  $\text{CH}_4$  y otros gases (ej. ácido sulfúrico o  $\text{H}_2\text{S}$ ) (Gerardi, 2003; Angelidaki et al., 2011). En la Figura 3 se muestra la degradación de la materia orgánica por procesos anaeróbicos. En la primera etapa, se genera la hidrólisis de las macromoléculas (alto peso molecular), para luego continuar con la etapa fermentativa, acetogénica y metanogénica. Los compuestos orgánicos en su mayoría insolubles, tales como hidratos de carbono, proteínas y lípidos se descomponen en monómeros y dímeros solubles, es decir, mono azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga (> 8 átomos de carbono) a través de la etapa hidrolítica. La hidrólisis corresponde a un proceso mediado por la actividad de dos tipos de enzimas: las excretadas por los microorganismos como parte del metabolismo extracelular, y las enzimas inmovilizadas en coloides del suelo y materiales húmicos (Speece, 2008). A su vez, la hidrólisis de los polímeros es realizada por

diferentes grupos enzimáticos. Las enzimas encargadas de hidrolizar los azúcares, proteínas y lípidos corresponden a las amilasas, proteasas y lipasas, respectivamente.

Seguido de esto, viene la fermentación o acidogénesis donde las moléculas orgánicas solubles (aminoácidos, monosacáridos y ácidos grasos), formados en la etapa anterior son transformados a compuestos de menor peso molecular. Como ácidos orgánicos (ácidos grasos volátiles-AGV) de 2 a 8 átomos de carbono (acetato, butirato, lactato) y compuestos reducidos como etanol,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ , entre otros (Moreno et al., 2007; Angelidaki et al., 2011; Christy et al., 2015). Durante la etapa acetogénica, los AGV y el etanol, formados anteriormente, son transformados en acetato,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , mediante las bacterias acetogénicas sintotróficas a partir de dos rutas diferentes: deshidrogenación acetogénica (producen acetato a partir de la fermentación ácidos propiónico, butírico y alcoholes) e hidrogenación acetogénica, donde las bacterias homoacetogénicas sintetizan acetato a partir de hidrogeno, dióxido de carbono y/o sacáridos (Angelidaki et al., 2011). La última etapa es la metanogénica, donde se utilizan los productos generados en la acetogénesis y se transforman en  $\text{CH}_4$  (Liu et al., 2011). Las principales vías para la formación de metano en ambientes anaeróbicos son: i) la metanogénesis acetoclástica donde el acetato es convertido a metano y dióxido de carbono y ii) la metanogénesis hidrogenotrófica donde el dióxido de carbono se reduce a metano (Conrad et al., 2010; Angelidaki et al., 2011).

La Figura 3 muestra una vía adicional de degradación de la materia orgánica que poseen los sistemas híbridos HC-CCM. Este proceso se conoce como bioelectrogénesis y consiste en la oxidación electroquímica de la materia orgánica con la consecuente generación de electricidad. En ausencia de oxígeno, la materia orgánica puede sufrir diferentes reacciones de oxidación a través del metabolismo de microorganismos electroquímicamente activos que actúan como biocatalizadores. En la cámara anódica, los microorganismos utilizan los sustratos orgánicos como fuente de carbono y donantes de electrones para producir la molécula portadora de energía (ATP). La materia orgánica ingresa al microorganismo donde través de la glucólisis y ciclo del ácido cítrico, se oxida hasta convertirse en dióxido de carbono, electrones y protones. Paralelamente,  $\text{NAD}^+$  (nicotinamida adenina dinucleótido) y FAD (flavina adenina dinucleótida) se reducen a su forma transportadora de electrones NADH y FADH<sub>2</sub>. Estos portadores de electrones transfieren sus electrones desde el citoplasma a la membrana celular para luego ser transportados al ánodo mediante los diferentes mecanismos de transferencia electrónica directa o mediada (Watanabe,

2008). Por lo tanto, el ánodo juega un papel fundamental como aceptor de electrones externo para que la oxidación de sustratos orgánicos pueda ocurrir al interior del HC. Para que la oxidación ocurra exitosamente es necesario la formación de una biopelícula sobre el ánodo la cual está formada por una gran diversidad de comunidades microbianas que dependiendo del inóculo utilizado para colonizarlo. En biopelículas de cultivos mixtos, los microorganismos electroactivos deben competir por los donadores de electrones con otros grupos microbianos como fermentadores, acetógenos y metanógenos provocando una disminución de la eficiencia energética del sistema (Jung y Regan, 2011). La complejidad de las biopelículas anódicas dificulta dilucidar los mecanismos electroquímicos que ocurren en el bioánodo, pero llegar a comprender de forma precisa la bioelectrogénesis y los procesos de competencia ayudará a mejorar el rendimiento de los sistemas bioelectroquímicos. A pesar de esto se sabe de estudios previos que ciertas moléculas como acetato e hidrógeno, pueden ser usados directamente por los microorganismos electroactivos obteniendo 8 y 2 electrones, respectivamente (Jung y Regan, 2007). Otros en cambio, como la glucosa, puede primero ser fermentado a otros productos (piruvato, acetato, etanol) para luego sufrir diferentes reacciones de oxidación. También puede oxidarse de forma incompleta produciendo 8 electrones o completamente dando 24 electrones (Xing et al., 2009). Aunque los metanógenos son los competidores predominantes de los microorganismos electroactivos, otros microorganismos pueden consumir electrones a través de distintas vías a la producción de electricidad en los CCMs. Es decir, estos microorganismos no electroactivos dirigen una parte de los electrones disponibles en el sustrato lejos del ánodo a través de otras vías distintas a la generación de electricidad (Freguia et al., 2008). Este es el caso de las bacterias fermentativas que pueden prevalecer en el caso de sistemas alimentados con sustrato fermentable, como los hidratos de carbono, ya que la fermentación es termodinámicamente más favorable que el mecanismo respiratorio de los electroquímicamente activos (Premier et al., 2013). Sin embargo, los electroactivos pueden crear una cooperación sinérgica con las bacterias fermentativas al producir electricidad a partir de ácidos grasos volátiles y alcoholes resultantes de la fermentación de azúcares (Kiely et al. 2011). Una parte de los electrones también puede ser consumida por el metabolismo aeróbico en caso de intrusión de oxígeno en la cámara anódica (Kim et al. 2007). Se ha informado que las arqueas metanogénicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, consumen electrones para formar metano a partir de acetato o de  $H_2$  y  $CO_2$ , respectivamente. Ambos compiten

con los electroactivos en las CCMs operados a temperatura ambiente (Chung y Okabe 2009) y mesofílicas (Rismani-Yazdi et al. 2013). Aun así, se ha reportado que en sistemas integrados las emisiones de metano disminuyen 20 veces respecto al control que no posee celda combustible microbiana (Cabezas, 2010). Friedman et al. (2016) también demostró que al incorporar una CCM en un arrozal disminuyeron en un 50% las emisiones de metano debido a la competencia entre los procesos metanogénicos y bioelectrogénicos.





### 3. Factores que limitan el desempeño eléctrico de los sistemas integrados HC-CCM

En base a la literatura reportada, queda claro que las densidades de potencia obtenida de los sistemas HC-CCM (0,15-131 mW/m<sup>2</sup>) tienden a ser inferiores a los valores de la mayoría de las CCMs puras (6,72-1410 mW/m<sup>2</sup>). Esta diferencia entre los sistemas HC-CCM y CCM se debe principalmente a la ocurrencia de una resistencia no compensada (resistencia óhmica). Se suman también, la resistencia a la transferencia de carga debido a una velocidad de reacción lenta en los electrodos (cinética) y la resistencia causada por una difusión retardada (transporte). Teniendo en cuenta lo anterior, la forma más directa para obtener una mayor densidad de potencia sería la reducción de las resistencias no compensadas de los sistemas integrados. Para lograr esto es que se ha evaluado a una escala de laboratorio una gran variedad de factores fisicoquímicos, biológicos y operacionales que influyen en el desempeño eléctrico de los sistemas HC-CCM. Oon et al. (2018) demostraron que al aumentar la conductividad del electrolito desde 0,87 a 1,35 mS/cm las pérdidas óhmicas del sistema disminuyeron, con lo cual la densidad de potencia se incrementó cerca de un 9%. Por otra parte, las pérdidas por activación pueden ser disminuidas al aumentar el área superficial activa del ánodo. Por ejemplo, modificar la superficie electrodo con sitios activos (electrocatalisis). Trabajar a una temperatura óptima de operación dependiendo de los microorganismos electroactivos predominantes podría mejorar el desempeño eléctrico. Por ejemplo, para microorganismos mesofílicos (crecimiento óptimo entre 15-35 °C) una disminución de la temperatura de operación conllevará a una menor generación de energía.

Existen factores limitantes adicionales que deben considerarse como i) la competencia entre microorganismos electroactivos y otros microorganismos (bacterias metanogénicas) por electrones o sustratos que conducen a eficiencias coulombicas bajas; ii) el deterioro del cátodo con el tiempo y el crecimiento excesivo de bacterias heterotróficas a su alrededor que hacen que las concentraciones de aceptores de electrones como el O<sub>2</sub> disminuya y iii) la alta concentración de materia orgánica que podría aumentar ligeramente la acidez dentro de los sistemas, limitando el crecimiento de MEAs y la difusión de protones.

#### 3.1 Efecto de la carga orgánica: Aplicación del sistema HC-CCM como sensor de la demanda química de oxígeno (DQO)

La cantidad de materia orgánica expresada como DQO afecta en gran medida el desempeño eléctrico de los sistemas HC-CCM. Proporcionar suficientes compuestos orgánicos para la oxidación en el ánodo debe estar en equilibrio con la cantidad de DQO que llega al cátodo. Como ya se sabe, las



celdas combustibles microbianas son sistemas que generan electricidad a partir de la oxidación de compuestos orgánicos por medio de bacterias electroactivas. Esta tecnología integrada en los HCs podría llegar a convertirse en una herramienta en línea para la evaluación de la concentración de materia orgánica ya que proporciona directamente una señal eléctrica que puede correlacionarse con el contenido orgánico de aguas residuales. La eficiencia de eliminación de DQO es ampliamente usada como indicador de la degradación de materia orgánica en los sistemas de humedales construidos. Por lo tanto, las mediciones de este parámetro juegan un papel importante en el monitoreo del funcionamiento de un HC. Sin embargo, el método tradicional utiliza dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) como un fuerte oxidante en medio ácido con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y un catalizador de plata ( $Ag_2SO_4$ ). Los compuestos orgánicos oxidables actúan reduciendo el dicromato, Cr (VI), a ion crómico Cr (III). La cantidad de dicromato consumida proporciona una medida de la concentración de contaminantes en el agua. Por lo tanto, esta determinación colorimétrica contiene sustancias químicas altamente tóxicas y peligrosas ( $Ag_2SO_4$ ,  $K_2Cr_2O_7$  y  $H_2SO_4$ ).

Una de las principales ventajas que derivada de la utilización de la CCM como sensor es la posibilidad de implementación *in situ*, el monitoreo en línea y evitar procedimientos de laboratorio complejos que requieren la adición de productos químicos. Hasta ahora, varios autores ya han observado un aumento en la señal eléctrica de salida al suministrar mayores cargas orgánicas a los sistemas HC-CCM (Srivastava et al., 2015; Oon et al., 2016; Wang et al., 2017). Por ejemplo, Liu et al. (2014) observaron que la densidad de potencia incrementó su valor desde 33.7 a 44.6 mW/m<sup>2</sup> al variar la concentración del influente desde 50 a 250 mg DQO/L. La relación entre DQO y densidad de potencia quedó ampliamente demostrada por Xu et al. (2017). Los resultados mostraron la existencia de dos correlaciones lineales entre las señales bioeléctricas (voltaje de salida de la CCM) y la concentración de DQO (acetato). La primera es con una DQO de 0 a 500 mg/L ( $101,9 \pm 7,42$  a  $631,7 \pm 7,41$  mV,  $R^2 = 0,9710$ ) y la segunda desde 500 a 1000 mg DQO/L ( $631,7 \pm 7,41$  a  $668,5 \pm 0,01$  mV,  $R^2 = 0,9245$ ). Además, los resultados también revelaron la especificidad del sistema en términos de diferentes tipos de fuente de carbono. En general, el trabajo de Xiu et al. (2017) presentó la viabilidad de utilizar el sistema integrado HC-CCM para la detección de DQO *in situ* durante el proceso de tratamiento de aguas residuales, lo que promete ser una técnica innovadora para el monitoreo de la calidad del agua dentro de los humedales construidos.

En el presente trabajo de tesis, se evaluó el efecto de 5 cargas orgánicas (5, 8, 12, 28 y 33 g DQO/m<sup>2</sup> d) sobre la generación de electricidad tanto para el sistema NP/HC-CCM (ausencia de macrófita) como



para P/HC-CCM (presencia de macrófita). La densidad de potencia fue obtenida a partir de las curvas de polarización realizadas durante el día 5 de cada ciclo. De acuerdo a la Figura 4, ambos sistemas muestran una tendencia similar en la densidad de potencia la cual aumenta con el incremento de la carga orgánica hasta 28 g DQO/m<sup>2</sup> d. Sin embargo, al aplicar la carga más alta de 33 g DQO/m<sup>2</sup> d la máxima densidad de potencia de NP/HC-CCM y P/HC-CCM disminuye un 54% y 30%, respectivamente. Al parecer el aumento de la carga de DQO aumentaría la concentración de materia orgánica que llega al compartimento catódico. Esto provoca un aumento en la demanda de oxígeno en el cátodo limitando la cantidad de O<sub>2</sub> disponible para las reacciones de reducción necesarias para completar el circuito eléctrico. Además, de acuerdo a la literatura un aumento de DQO en el cátodo puede promover el desarrollo de una biopelícula heterotrófica que limita la transferencia de masa de reactivos y productos desde el electrodo (Xu et al., 2016).

Por otra parte, se observa que a 5 y 8 g DQO/m<sup>2</sup> d la densidad de potencia del sistema P/HC-CCM fue 3,5-3,8 veces mayor respecto a NP/HC-CCM. Este comportamiento cambia a partir de la carga de 12 g DQO/m<sup>2</sup> d, donde ahora el sistema no plantado (NP/HC-CCM) es el que posee los valores más altos de densidad de potencia, llegando a obtener un máximo de 22,3 mW/m<sup>2</sup> de energía. Esta diferencia se asocia con el crecimiento de las raíces de la macrófita presente en el sistema P/HC-CCM. Durante los tres primeros periodos (aclimatación y operación) las raíces de la especie *Schoenoplectus californicus* crecieron gradualmente hasta aproximadamente 12 cm sin llegar a tocar el cátodo. De esta forma la rizosfera excreta O<sub>2</sub> en el compartimento catódico mejorando las condiciones aeróbicas en el cátodo lo que conlleva un aumento en el desempeño eléctrico del sistema debido a una disminución en la resistencia interna de este. Después de 170 días de operación, las raíces de la planta atravesaron los 10 cm de espesor del cátodo, lo que provocó que los exudados de la rizosfera al ser compuestos orgánicos aumentaran la demanda de O<sub>2</sub> reduciendo la cantidad disponible para las reacciones reducción.

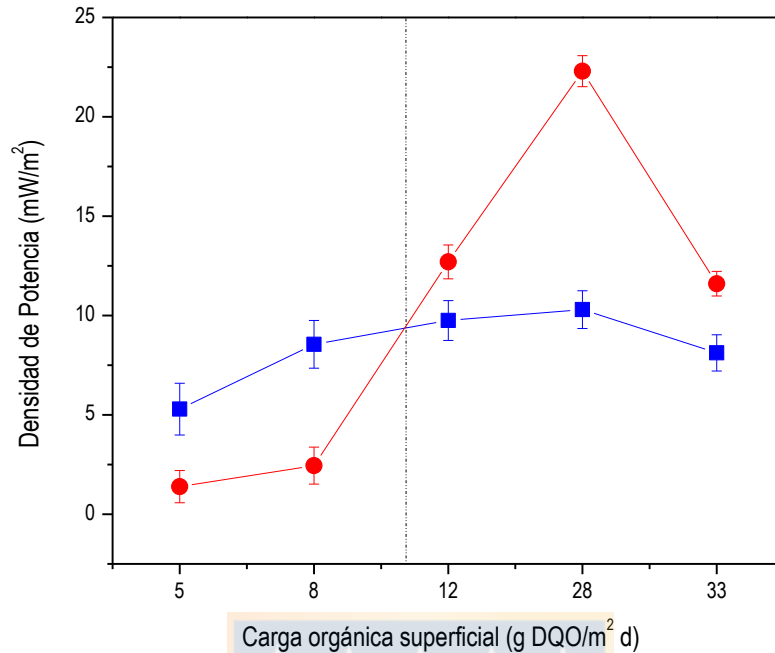


Figura 4. Densidad de potencia obtenida por NP/HC-CCM (●) y P/HC-CCM (■) bajo diferentes cargas orgánicas aplicadas.

### 3.2 Efecto de la planta y su rol en los sistemas integrados

El uso de plantas vivas para la degradación *in situ* y la eliminación de contaminantes del ecosistema se ha establecido desde hace mucho tiempo. En los sistemas de humedales, las plantas acuáticas se han usado como herramienta para la eliminación de metales pesados y la biorremediación (Corbella et al., 2014). Ellas juegan un rol importante en los procesos de tratamiento de un agua servida. Específicamente, sus raíces pueden eliminar los contaminantes presentes en el agua mediante diferentes vías como la absorción, adsorción y enriquecimiento, o también la captación de nutrientes (Fang y Tan, 2011). Esto se traduce en una efectiva eliminación de compuestos orgánicos y de sólidos suspendidos volátiles del orden de un 70% (Kadlec, 2009; Vymazal, 2011). Adicionalmente, las plantas pueden aumentar la disponibilidad de superficie para el crecimiento de microorganismos formando una biopelícula que mejora la capacidad de tratamiento del humedal construido.

Por otra parte, la planta cuando se encuentra integrando una celda de combustible microbiana cumple con otras funciones dentro de estos sistemas. Dos factores relevantes de mencionar son el oxígeno liberado y la gran cantidad de exudados secretados por las raíces de las plantas que influyen en la

diferencia de potencial promoviendo la generación de electricidad. Mas aún, algunos de estos exudados y metabolitos microbianos como el ácido fórmico, el ácido succínico y la biotina actúan como mediadores para la transferencia electrónica. Por lo tanto, la rizosfera vegetal facilita un microambiente favorable para el metabolismo bacteriano (utilizando rizodepósitos vegetales) mediando sus equivalentes reductores para aprovechar la bioelectricidad a través de un sistema electroquímico microbiano (Schroder, 2007).

Hasta ahora, una variedad de especies de plantas, incluyendo marismas (*Spartina anglica* y *Arundo donax*), de agua dulce (*Arundinella anomola*), gramíneas (*Pennisetum setaceum*, *Lolium perenne*) y plantas de humedales (*Ipomoea acuatica*, *Typha latifolia*, *Acorus calamus* y *Canna indica*) se han incorporado con éxito en la construcción y operación de los sistemas con CCMs para diversas aplicaciones (Nitisoravut y Regmi, 2017). En general se ha observado la utilización de tres grupos de plantas, incluyendo plantas vasculares, macrófitas (hidrófitas) y humedales o pastos pantanosos en la construcción de los sistemas de celda de combustible microbianas plantadas o humedales construidos con celdas de combustible microbianas. En la Tabla 1 se muestra un resumen de todas las especies de plantas reportadas en los sistemas HC-CCM y, la energía generada de acuerdo a condiciones de operación (carga orgánica) y de configuración (posición de las raíces). En muchos de los estudios reportados la selección y el uso de las plantas se han realizado de manera casual. Sin embargo, la selección de la especie correcta puede aumentar el tratamiento deseado y la generación de bioelectricidad. Como la selección y el uso de una planta dependen del lugar donde se lleva a cabo el estudio, se prefieren especies locales disponibles para evitar la introducción de especies invasoras. Lo ideal sería que la selección de la planta dependa del propósito del estudio. Si el objetivo es netamente obtener el máximo de energía, las plantas de humedales se usan comúnmente para la construcción de biocátodos porque son tolerantes al agua y poseen tejidos de aerénquima, permitiendo que el O<sub>2</sub> de la atmósfera se transporte hacia las raíces fácilmente (Li et al., 2019). También se debe considerar la cantidad de exudados de raíz producidos y disponibles en la rizosfera, la especie de planta que secreta gran cantidad de rizodepósitos se selecciona preferentemente. En el caso de los sistemas Planta-CCM que no utilizan agua servida, las especies de plantas con vías fotosintéticas C4 (monocotiledóneas / plantas de césped) se prefieren porque tienen altas tasas de conversión de energía solar. Estas plantas han exhibido una alta eficiencia fotosintética, lo que conduce a una mayor rizodeposición para servir como sustrato en la oxidación microbiana. Por

ejemplo, la *Spartina anglica* ha registrado la mayor generación de energía en este tipo de sistemas con una potencia de 679 mW/m<sup>2</sup> (Wetser et al., 2015).

De acuerdo a un estudio de Helder et al. (2010) quedó demostrado que las especies *Spartina anglica*, *Arundinella anomala* y *Arundo donax* poseen diferencias significativas en su rendimiento electrogénico al ser usadas en Planta-CCM bajo las mismas condiciones operacionales y de configuración. La CCM con *S. anglica* obtuvo la densidad de potencia más alta (222 mW/m<sup>2</sup>), siendo 10 veces mayor que la de la CCM con *A. anómala*. Esto indica claramente que las plantas seleccionadas parecen tener un gran efecto en el rendimiento de la bioelectricidad.

Por el contrario, para sistemas HC-CCM los estudios sobre las plantas utilizadas son limitados, especialmente lo relacionado con la selección y/o adaptabilidad de ellas. Los resultados de la Tabla 1 muestran la poca variedad de plantas utilizadas en los sistemas HC-CCM, donde *Phragmites australis* y *Canna indica* son las especies más reportadas en la mayoría de los trabajos. Al analizar la Tabla 1 se deduce que el desempeño eléctrico y eficiencias de tratamiento de la misma especie son muy diferentes entre un estudio y otro. No es posible hacer comparaciones ya que, a pesar de ocupar la misma planta, cada estudio trabajó bajo diferentes configuraciones y/o modos de alimentación. Tampoco es posible afirmar que una especie es mejor que otra aun cuando la concentración del influente y la posición de las raíces es la misma ya que nuevamente se repite el no ser realizados bajo las mismas condiciones de trabajo. En base a la literatura encontrada solo el trabajo de Zhou et al. (2018) compara el desempeño eléctrico y los cambios fisiológicos durante temporadas de no crecimiento de cuatro plantas de humedales de uso común (*Canna indica*, *Cyperus alternifolius* L., *Acorus calamus* y *Arundo donax*). Los resultados mostraron que la densidad de potencia máxima fue 18,56 mW/m<sup>2</sup> en el sistema HC-CCM plantado con *C. indica*. El valor más bajo lo obtuvo *Acorus calamus* con 2,26 mW/m<sup>2</sup>. Mientras que para *Cyperus alternifolius* L. y *Arundo donax* los valores obtenidos fueron 6.92, y 17,41 mW/m<sup>2</sup>, respectivamente. De la investigación de Zhou et al. (2018) se deduce que las plantas en los sistemas HC-CCM juegan un papel importante tanto en la purificación de aguas residuales como en la producción de energía. En consecuencia, la selección de la planta aparentemente es importante para el buen desempeño de estos sistemas.

En humedales construidos está comprobado que aquellas plantas con raíces bien desarrolladas, son seleccionadas debido a su capacidad de purificar aguas residuales (Stottmeister et al., 2003). Sin embargo, del trabajo realizado en esta tesis con la especie *Schoenoplectus californicus* no se puede

ocupar el mismo criterio de selección en sistemas integrados HC-CCM ya que se observaron diferencias en el desempeño eléctrico entre el sistema plantado y no plantado bajo las mismas condiciones de operación. La densidad de potencia generada por P/HC-CCM fue 10,32 mW/m<sup>2</sup>, mientras que para NP/HC-CCM el valor obtenido fue 2,16 veces mayor (22,28 mW/m<sup>2</sup>). Este comportamiento coincide con el aumento del crecimiento excesivo del sistema radicular de *Schoenoplectus californicus* que invade la zona anódica penetrando completamente el ánodo y la malla de acero. A partir de los anterior, los resultados mostraron una mayor resistencia interna para el sistema P/HC-CCM (200,77 ohm) comparado con el sistema NP/HC-CCM (133, 48 ohm).

Finalmente, es necesario más investigación respecto a la fisiología vegetal y su comportamiento en sistemas HC-CCM. De esta forma será posible encontrar plantas adecuadas para llevar a cabo la depuración de las aguas servidas logrando simultáneamente la máxima generación de electricidad. Además, confirmar el tiempo de vida útil de las plantas utilizadas. Es decir que crezcan bien sin daño fisiológico durante un largo período o al menos un ciclo de vida.



Tabla 1. Especies de plantas usadas en HC-CCM y desempeño eléctrico obtenido.

Vegetación		Desempeño eléctrico					Eficiencias de eliminación (%)		Ref.
Especie	Posición de las raíces	DQO <sub>i</sub> (mg/L)	V (mV)	j (mA/m <sup>2</sup> )	P <sub>max</sub> (mW/m <sup>2</sup> )	R <sub>int</sub> (ohms)	DQO	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	
<i>Schoenoplectus californicus</i>	cátodo	250	250	27,39	8,55	251	87	98	Este estudio
	ánodo	1000	350	53,26	10,32	200,8	95,2	98	
<i>Phragmites australis</i>	cátodo	560	700	22,3	43,0	120	90-95	NR	Villaseñor et al., 2013
	ánodo	323-254	NR	45,5-138,8	7,9-14,5	567	61	60	Corbella et al., 2016
	ánodo	200	550	2,04	35,96	339,8	90,4	NR	Song et al., 2017
	cátodo	NR	266	16,63	3714	373	82,3	82,5 (NT)	Xu et al., 2018
<i>Typha latifolia</i>	cátodo	624	435	NR	93 mW/m <sup>3</sup>	430	99	96	Oon et al., 2016
	cátodo	450	520	16,10	26,12	NR	92	93	Yakar et al., 2018
<i>Canna indica</i>	ánodo	NR	NR	105	18	NR	NR	NR	Lu et al., 2015
	ánodo	215	117	24,68	3,02	190	57,4	NR	Wang et al., 2016
	ánodo	215	97,7	17,3	1,78	168	52	NR	Wang et al., 2017
	cátodo	350	NR	0,45	0,05	NR	72	NR	Srivastava et al., 2017
	ánodo	27,6	329	NR	10,77	NR	NR	NR	Xu et al., 2017
	cátodo	gDQO/m <sup>2</sup> d	0,00		0,000				
	cátodo	700	600	22,5	0,456 W/m <sup>3</sup>	463,7	79,6	77,5	Liu et al., 2019
<i>Ipomoea aquatica</i>	ánodo	300	610	0,848 A/m <sup>3</sup>	0,302 W/m <sup>3</sup>	217,7	85,6	NR	Fang et al., 2013
	ánodo	200	600-700	NR	12,42	156	94,8	96,5	Liu et al., 2013
<i>Spartina alterniflora</i>	ánodo	NR	NR	187	76,70	NR	NR	NR	Wu et al., 2016
<i>Elodea nuttallii</i>	cátodo	643	300	NR	18,50	430	98	47	Oon et al., 2017
<i>Hydrilla verticillata</i>	cátodo	51.35	558.5	NR	NR	NR	64	89	Shen et al., 2018
<i>Jacinto de agua</i>	cátodo	350	NR	8,52	1,53	488,5	78	NR	Xie et al., 2018
<i>Cyperus alternifolius L.</i>	ánodo	NR	704	NR	6,92	1000	NR	NR	Zhou et al., 2018
<i>Acorus calamus</i>	ánodo	NR	269	NR	2,26	5000	NR	NR	
<i>Arundo donax</i>	ánodo	NR	486	NR	17,41	399	NR	NR	
<i>Canna indica</i>	ánodo	NR	489	NR	18,56	400	NR	NR	

NR: no reportado

#### **4. Relación entre inóculo, material electródico y la generación de electricidad**

La actividad bioelectrogénica de una celda combustible microbiana se encuentra regida por varios factores de tipo físicos, biológicos y operativos que influyen esencialmente en las capacidades de generación de energía. Esto es igual para los sistemas integrados ya que el humedal construido se está comportando como una CCM al tener un ánodo y cátodo conectados por una resistencia eléctrica externa. Dentro de los factores físicos se encuentra el material electródico. El material del cual está constituido el ánodo es importante en el rendimiento energético general de una CCM debido a que sus características influyen en la formación de biopelículas, la transferencia de electrones y la oxidación del sustrato. El crecimiento de bacterias electroquímicamente activas depende de la superficie activa del ánodo que acepta los electrones del metabolismo del sustrato. La asociación sinérgica del ánodo con el biocatalizador juega un papel importante en la generación de electrones, así como en su transferencia hacia el TEA disponible. Por lo tanto, es imprescindible seleccionar un material adecuado para minimizar las pérdidas de electrones y aumentar la eficiencia de generación de energía. Para esto el material utilizado como ánodo debe ser eléctricamente conductor, biocompatible, químicamente estable en el anolito y debe tener un área de superficie alta con factibilidad para aplicaciones a gran escala. La Tabla 2 muestra los materiales que han sido reportados como ánodo y cátodo para los sistemas HC-CCM. Queda claro que los materiales basados en carbono como grafito en forma de varilla, placa o granular son los más usados. Esto se debe principalmente a su estabilidad cuando se hacen crecer comunidades microbianas (biocompatibilidad) en su superficie y también se garantizan costos más económicos. A pesar de la rentabilidad de los electrodos de grafito, la resistencia óhmica que poseen es 1000 veces mayor que la de los metales, lo que se presenta como una desventaja a la hora de querer mejorar el rendimiento eléctrico de estos sistemas, sobre todo pensando en un escalamiento mayor (Wanatabe, 2008). Existe una relación directa entre las propiedades de los materiales anódicos (área superficial, tamaño de poros, hidrofilia) y la formación de biopelículas anódicas electroactivas lo cual pudo ser comprobado en esta tesis (González et al., 2019). A partir de un inóculo mixto (lodo primario+ lodo activado) se formó una biopelícula sobre un electrodo de grafito modificado con zeolita dopada con Fe que presentó actividad bioelectrocatalítica para la oxidación de acetato. Por lo tanto, es posible afirmar que existe una relación entre el inóculo utilizado y el material electródico ya que la biopelícula que se requiere formar proviene de esa fuente pura o mixta. En la Tabla 2 se muestra el trabajo realizado por Wang et al. (2017), quienes evaluaron el efecto de 4 materiales electródicos sobre la densidad de potencia generada. Se inocularon todos



los electrodos con lodo activado y los resultados mostraron diferencias significativas en la distribución de la comunidad microbiana sobre cada material. La abundancia relativa de *Proteobacteria* fue mayor en un ánodo de níquel (71,3%) y fieltro de carbono (69,7%) que en grafito (63,1%) y acero inoxidable (50,7%) lo que coincide con el orden creciente de potencia generada (acero inoxidable < grafito < fieltro de carbono < níquel).

El papel de las diferentes fuentes de inóculo en las comunidades que se desarrollan y los rendimientos asociados en condiciones experimentales idénticas ya han sido bien estudiadas en CCMs, donde se sabe que los cultivos puros no son prácticos para la operación de estos sistemas en el mundo real debido a su alto costo. Los cultivos mixtos (es decir, suelo, aguas residuales, etc) contienen cantidades significativas de bacterias electrogénicas pudiendo ser utilizadas como un inóculo rentable para las CCM. Sin embargo, las bacterias no electrogénicas como bacterias metanogénicas o bacterias desnitrificantes presentes en cultivos mixtos consumen sustratos orgánicos sin generar electricidad. Aun así, las comunidades microbianas en biopelículas de cultivos mixtos a menudo exhiben mejores desempeños en la densidad de potencia que aquellos de cultivos puros (Sun et al., 2009). Esto se debe a la cooperación metabólica entre diferentes microorganismos lo que permite a una CCM tener alta tolerancia y poder metabolizar sustratos complejos (Sherafatmand y Ng, 2015). Holmes et al. (2004) analizaron las comunidades anódicas y compararon el rendimiento de una CCM inoculada con muestras de marismas de agua salada, agua dulce y sedimentos marinos. Descubrieron que todas las comunidades anódicas se encontraban dominadas por diferentes órdenes de Delta proteobacterias y que esta clase de bacteria estaba vinculada a la actividad electrogénica. También se sabe que en algunos casos los inóculos de aguas residuales han producido más energía que un inóculo de ambiente natural, pero en otros no. Leropoulos et al. (2010) compararon los inóculos anaeróbicos y aeróbicos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales con un inóculo de agua de río en una CCM de flujo continuo alimentado con acetato. El efluente aeróbico (1,16 mW/m<sup>2</sup>) y el inóculo de agua de río (1,14 mW/m<sup>2</sup>) produjeron una potencia máxima más alta que el inóculo de efluente anaeróbico (0,89 mW/m<sup>2</sup>).

De lo anterior se deduce que la selección de un consorcio microbiano con alto rendimiento es de vital importancia. Dado que todas las bacterias en una biopelícula no pueden participar en la transferencia directa de electrones al electrodo (Debabov, 2008); es posible que las bacterias no electroquímicamente activas puedan ocupar espacio y aumentar la resistencia en el electrodo durante el paso de inoculación inicial, evitando la generación eficiente de energía en la CCM. La electrogénesis



ocurre cuando los aceptores de electrones solubles, por ejemplo, oxígeno, nitrato y sulfato, no están presentes, y potencialmente puede competir con la metanogénesis en tales condiciones. Además, se ha observado que la metanogénesis activa se encuentra presente en varias CCMs inoculadas con comunidades microbianas naturales. La forma más efectiva de mejorar el crecimiento microbiano electrogénico del cultivo mixto es restringir o suprimir el proceso de metanogénesis alentando la electrogénesis como el proceso final en la ruta metabólica. Para que esto suceda, el lodo del inóculo mixto debe tratarse previamente antes de la aclimatación para suprimir los metanógenos. Este pretratamiento del inóculo debería permitir el enriquecimiento selectivo de un grupo específico de bacterias. Varios métodos de pretratamiento se han empleado en una variedad de cultivos mixtos para inhibir las bacterias metanogénicas. Se han reportado tratamientos con calor, químico (ácido o alcalino), infrarrojos y ultrasonificación, entre otros (More y Ghangrekar, 2010; Chae et al., 2010).

En sistemas HC-CCM se han empleado varios tipos de inóculos mixtos provenientes de lodos de PTAS como la misma agua residual (ver Tabla 2). El inóculo utilizado en el estudio de esta tesis doctoral no ha sido reportado en ningún otro sistema integrado y la densidad de potencia obtenida con una DQO inicial de 250 mg/L fue 57 mayor que lo informado por Villaseñor et al. (2013) con inóculo similar e igual sustrato (glucosa+acetato). La densidad de potencia obtenida también fue dos veces mayor que lo reportando por Wang et al. (2017) incluso bajo exactamente las mismas condiciones operacionales. Estos resultados podrían estar asociados con el pretratamiento que fue realizado al inóculo de este estudio. Para potenciar el desarrollo de bacterias electroactivas la mezcla de lodo primario y lodo activado se ultrasonificó por 2 min a 100 W. Por otra parte, en la etapa de inoculación se alimentó con una solución de enriquecimiento para *Geobacter* que contenía nutrientes esenciales y acetato como fuente de carbono para su desarrollo manteniendo además las condiciones anaeróbicas burbujeando constantemente N<sub>2</sub> gaseoso.

La ultrasonificación consiste en un fenómeno de cavitación donde hay una formación, crecimiento y posterior colapso de microburbujas o cavidades que ocurren en intervalos de tiempo extremadamente pequeños (milisegundos). Se liberan grandes magnitudes de energía en una ubicación muy pequeña que produce un gradiente extremo de temperatura y presión lo que impacta la estructura celular de bacterias provocando su rompimiento (Zhang et al., 2007). Al ultrasonificar el lodo en cuestión lo que está ocurriendo es que bacterias del tipo Gram-positivas como la gran mayoría de las metanogénicas se rompan y mueran suprimiendo su actividad microbiana. De esta forma sobreviven a este pretratamiento las bacterias Gram-negativas como *Geobacter metallireducens*, *Shewanella*

*oneidensis*, *Shewanella putrefaciens*, *Desulfuromonas acetoxidans* y *Geobacter sulfurreducens* (Min et al., 2005; Kesari y Behari, 2008) las cuales son todas del tipo electroactivas favoreciendo la electrogénesis lo que se traduce en un mejor rendimiento de la CCM.



Tabla 2. Diferente material electrodico e inculo utilizados y la densidad de potencia obtenida en sistemas HC-CCM.

Material electrodico	Fuente inculo	Humedal Construido	Modo alimentacion	Sustrato	DQO influente (mg/L)	Densidad potencia maxima (mW/m <sup>2</sup> )	Ref.
An: CAG Cat: CAG	Lodo clarificador primario + lodo activado	Vertical	Fed-Batch	Glucosa + acetato	250 1000	8,55 10,32	Este estudio
An: placa grafito Cat: placa grafito	Lodo activado	Vertical	Continuo	Glucosa+ acetato	250	0,15	Villaseñor et al., 2013
	Sobrenadante de digestato anaerobico	Vertical ascendente	Continuo	Digestato anaerobico diluido	1178	112	Wu et al., 2017
	Agua residual Porcina	Vertical ascendente	continuo	Agua residual Porcina	1058	9,40	Zhao et al., 2013
	Sedimento marino	Vertical	Batch	Sacarosa+ colorante	1500	15,7	Yadav et al., 2012
An: varilla grafito Cat: varilla grafito	Agua servida	Horizontal	Continuo	Agua servida	323	36,0	Corbella et al., 2015
An: carbon activado Cat: grafito granular	Agua residual Porcina	Vertical ascendente	Continuo	Agua residual Porcina	500	87,8	Xu et al., 2016
An: CAG Cat: CAG	Lodo anaerobico	Vertical ascendente	Continuo	Glucosa	180	12,4	Liu et al., 2013
An: fieltro carbono Cat: fieltro carbono	Lodo de cultivo mixto	Vertical ascendente	Continuo	Glucosa	315	6,12	Oon et al., 2015
An: malla acero inoxidable Cat: malla acero inoxidable An: varilla grafito Cat: varilla grafito	Lodo activado	Vertical	Fed-Batch	Glucosa + acetato	813	2,30	Wang et al., 2017
An: fieltro fibra carbono Cat: fieltro fibra carbono						3,35	
An: esponja de niquel Cat: esponja de niquel						4,80	
An: CAG Cat: CAG						5,11	
An: CAG Cat: CAG	Lodo anaerobico	Vertical ascendente	Continuo	Glucosa	200	200 mW/m <sup>3</sup>	Song et al., 2017
An: grafito en grava Cat: grafito en grava	Lodo activado	Vertical descendente	Continuo	Glucosa	300	2000 mW/m <sup>3</sup>	Xu et al., 2017
An: grafito granular Cat: grafito granular	Lodo digerido de una CCM en funcionamiento	Vertical	Batch	Glucosa + peptona	770-887	0,10 mW/m <sup>3</sup>	Srivastava et al., 2015
An: CAG Cat: CAG						43,6 mW/m <sup>3</sup>	
An: CAG Cat: Pt recubierto de tela de carbono						92,5 mW/m <sup>3</sup>	
An: grafito granular Cat: Pt recubierto de tela de carbono						321 mW/m <sup>3</sup>	

An: ánodo; Cat: cátodo; CAG: carbono activado granular.

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES



## CONCLUSIONES

La caracterización electroquímica evidenció que el nuevo material basado en grafito modificado con zeolita (GC/gr-Zy) posee una buena biocompatibilidad al ser inoculado con una mezcla de lodo primario y lodo activado. En este estudio fue posible desarrollar una biopelícula electroactiva sobre un ánodo de (GC/gr-Zy) inclusive después de 4 días de la etapa de inoculación. Mediante la cronoamperometría realizada en una solución de 10 mM acetato en buffer fosfato, la respuesta del bioánodo fue una densidad de corriente entre 0.14-0.15 mA/cm<sup>2</sup> respecto a una corriente nula para el ánodo sin biopelícula. Adicionalmente, la voltametría cíclica mostró un pico anódico (170 μA/cm<sup>2</sup>) correspondiente a la oxidación de acetato, mientras que el electrodo sin biopelícula solo presentó un pico catódico asociado a la reducción de oxígeno. El bajo costo y la abundancia de zeolitas tanto sintéticas como naturales facilitan el desarrollo de una investigación a mayor escala. Por ejemplo, su aplicación en sistemas integrados HC-CCM es factible debido a que los materiales utilizados como matriz de soporte en humedales construidos son comunes con los materiales utilizados para los electrodos en las CCMs.

La evaluación del efecto de integrar una celda combustible microbiana en el rendimiento del humedal construido para la depuración de aguas servidas demostró mejoras en las eficiencias de eliminación de materia orgánica y nitrógeno (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la operación de sistemas integrados HC-CCM aumentaría el rendimiento del tratamiento de aguas servidas. Más precisamente, la concentración de materia orgánica en el efluente de HC fue estadísticamente mayor que en HC-CCM, lo que indica una estimulación de la oxidación de la materia orgánica en los sistemas que integran una celda combustible microbiana. Las concentraciones de efluentes en los sistemas que integraron una CCM fueron entre 12-18% y 15% más bajas que los sistemas sin CCM para DQO y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, respectivamente. Por lo tanto, la integración de una celda combustible microbiana en un humedal construido se plantea como una estrategia prometedora para mejorar la eficiencia del tratamiento de aguas servidas, ya sea en términos de eliminación de materia orgánica como de amonio.

Al evaluar la generación de electricidad del sistema integrado HC-CCM se evidenció una diferencia de potencial entre cátodo y ánodo termodinámicamente favorable a partir de la oxidación de distintas cargas de materia orgánica y también bajo la configuración del sistema plantado (P/HC-

CCM) y no plantado (NP/HC-CCM). Cuando la carga orgánica superficial aumentó de 4,8 a 7,9 g DQO/m<sup>2</sup> d, la densidad de potencia máxima también aumentó desde 5,3 hasta 8,6 mW/m<sup>2</sup> para P/HC-CCM y desde 1,4 hasta 2,5 mW/m<sup>2</sup> para NP/HC-CCM. Por su parte, el sistema integrado plantado generó 30 % más electricidad que el sistema integrado no plantado debido a que mejora la actividad electroquímica disminuyendo la resistencia interna del sistema en 1,4 veces.

Finalmente se concluye que efectivamente está ocurriendo una conversión de materia orgánica en electricidad catalizada por microorganismos, la cual se ve afectada por variables de tipo operacional y también de configuración del sistema.

Dadas las conclusiones anteriores, puede indicarse que se acepta completamente la hipótesis de trabajo propuesta, puesto que la integración de una celda combustible microbiana en un humedal construido si es capaz de generar energía en forma de electricidad mediante la biodegradación de la materia orgánica contenida en las aguas servidas y de forma simultánea mejorar el rendimiento del humedal construido como sistema de tratamiento.



## RECOMENDACIONES FINALES

Considerando que la generación de electricidad en sistemas integrados todavía es baja respecto a lo obtenido en celdas combustibles microbianas convencionales debido principalmente al resultado de grandes pérdidas óhmicas (incremento de la resistencia interna) y pérdidas en el potencial del electrodo (pérdidas de activación). Se recomienda seguir experimentando en el desarrollo de materiales electródicos que sean afines al medio de soporte utilizado en humedales construidos sin tener efectos adversos sobre su capacidad para cumplir con el principal objetivo de dar un tratamiento eficiente a las aguas servidas. Por lo tanto, es sugerible evaluar como se comporta la integración de un ánodo y cátodo constituido por grafito-zeolita en un humedal construido a escala de laboratorio. De forma paralela, continuando con lo planteado en el objetivo 1 de esta tesis sería provechoso investigar otro tipo de modificaciones electródicas para mejorar la generación de energía. En términos del ánodo, se recomienda la reducción de pérdidas globales de energía mediante métodos simples de modificación. Para esto debería considerarse el uso de ánodos modificados con Fe/óxido férrico como también oxihidróxido de hierro coloidal junto con zeolitas de mayor hidrofiliidad.

Otro factor importante de ser considerado para estudios posteriores es analizar las comunidades microbianas existentes en las biopelículas formadas tanto en el medio de soporte como del ánodo y cátodo en los sistemas integrados. Así se puede lograr un entendimiento mayor sobre el contacto eléctrico entre bacterias y ánodo que muchas veces es insuficiente. Además, saber las interacciones de competencia que están ocurriendo entre microorganismos electroquímicamente activos y otros microorganismos (bacterias metanogénicas) por electrones o sustratos que provocan bajas eficiencias coulombicas. Para esto se recomienda primero un estudio de la composición de las comunidades de bacterias y arqueas sobre el ánodo mediante el uso de una técnica de biología molecular conocida como polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (sigla en inglés T-RFLP) y luego una clonación / secuenciación de 16S rRNA. Obtener conocimiento sobre la estructuración y funcionamiento de las diferentes comunidades microbianas dentro de una CCM son uno de los factores clave para maximizar la producción de energía en aplicaciones prácticas. A través de diversas técnicas para estudios microbiológicos en las CCM se pretende comprender las funciones y el potencial de los microorganismos involucrados en la mejora de la potencia

eléctrica. Se han hecho avances significativos con una variedad de técnicas microbiológicas y electroquímicas para entender su morfología, potencial genético y su capacidad metabólica que está relacionada con la generación de electricidad en un CCM. Por ejemplo, con técnicas pre-genómicas y genómicas como la filogenia y metagenómica basada en 16S rRNA han proporcionado información importante sobre la estructura y potencial genético de las comunidades microbianas que colonizan los electrodos. Técnicas post-genómicas como metatranscriptómica permitiría caracterizar las funciones de las comunidades presentes en las biopelículas de los electrodos mediante la cuantificación de los niveles de expresión génica.

Finalmente debido al potencial uso de las celdas combustibles microbianas en la disminución de gases de efecto invernadero se recomienda evaluar la producción y emisión de metano en sistemas HC-CCM y comparar con humedales construidos tradicionales. Sería de gran importancia poder en futuras investigaciones hacer determinaciones de metano *In situ* (cámara estática), de manera de corroborar y comparar con las emisiones de metano estimadas mediante la actividad metanogénica específica y los balances de masa correspondientes.

La mayoría de los estudios hasta ahora reportados se realizaron con aguas residuales sintéticas con un enfoque sobre la validación de la tecnología integrada HC-CCM para la generación de bioelectricidad. Por ese motivo se propone intentar tratamientos de aguas residuales industriales de distinto tipo (cervecera, alimentaria, minera, láctea) ya que existe una gran posibilidad que el tratamiento de aguas residuales industriales con la tecnología HC-CCM se vea mejorado debido al flujo de electrones desde la zona anaeróbica a las zonas aeróbicas que promueve la eliminación de contaminantes más complejos o recalcitrantes.



## CAPITULO VI



- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Pollution Control Federation (WPCF). 1985. Standard methods for examination of water and wastewater 16th ed. Washington.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D., Plugge, C. M., Stams, A. 2011. Biomethanation and its potential. *Methods in Enzymology* 494, 327-351.
- Araya, F., Pesante, S., Vera, I., Vidal, G. (2014). Las aguas servidas en zonas rurales. En: Las aguas servidas y su depuración en zonas rurales: situación actual y desafíos. Eds. Vidal, G. y Araya, F. Universidad de Concepción, Chile. 118 pp.
- Babauta, J.T., Beyenal, H. 2014. Mass transfer studies of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on rotating disk electrodes. *Biotechnology and Bioengineering* 11, 285-294.
- Balkema, A. J., Preisig, H. A., Otterpohl, R., & Lambert, F. J. 2002. Indicators for the sustainability assessment of wastewater treatment systems. *Urban water*, 4(2), 153-161.
- Bastian, R. 1993. Constructed Wetlands for Wastewater Treatment and Wildlife Habitat: 17 Case Studies. In EPA 832-R-93-005. US Environmental Protection Agency, Municipal Technology Branch Washington, DC.
- Becroft, N.J., Zhao, F., Varcoe, J., Slade, C., Thumser, A., Avignone-Rossa, C. 2012. Dynamic changes in the microbial community composition in microbial fuel cells fed with sucrose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 423–437.
- Belmonte, M. 2012. Reducción de materia orgánica y nutrientes contenidos en purines de cerdo a través de tecnologías combinadas y su efecto en bioindicadores acuáticos. Tesis para optar al título Doctorado en ciencias ambientales, Universidad de Concepción, 250 pp.
- Berdegué, J. Jara, E. Modrego, F. Sanclemente, X. Schejtman, A. 2010. Comunas Rurales de Chile. Documento de Trabajo N° 60. Programa Dinámicas Territoriales Rurales. Rimisp, Santiago, Chile. 43 pp.
- Bitton, G. 2011. *Wastewater microbiology*. 4<sup>th</sup> ed. John Wiley Sons. Unites States. 781 pp.
- Borole, A. P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z. W., Feng, Y., Kim, B. H. 2011. Electroactive biofilms: current status and future research needs. *Energy and Environmental Science* 4, 4813-4834.

- Boursier, H., Béline, F., Paul, E. 2005. Piggery wastewater characterization for biological nitrogen removal process design. *Bioresource Technol.* 96: 351–358.
- Březinová, T., Vymazal, J. 2015. Nitrogen standing stock in *Phragmites australis* growing in constructed wetlands—Do we evaluate it correctly? *Ecol. Eng.* 74, 286-289.
- Brix, H., Arias, C., Del Bubba, M. 2001. Media selection for sustainable phosphorus removal in subsurface flow constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 44, 47-54.
- Brown, R., Harnisch, F., Dockhorn, T., Schröder, U. (2015). Examining sludge production in bioelectrochemical systems treating domestic wastewater. *Bioresource Technology* 198: 913–917.
- Buck, S., Denton, G., Dodds, W., Fisher, J., Flemer, D., Hart, D., Welsh, E. 2000. Nutrient criteria technical guidance manual: rivers and streams. Washington, DC: USEPA. 253 pp.
- Call, F., Logan, B. (2011). Lactate Oxidation Coupled to Iron or Electrode Reduction by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 8791–8794.
- Caselles-Osorio, A., Porta, A., Porras, M., García, J. 2007. Effect of high organic loading rates of particulate and dissolved organic matter on the efficiency of shallow experimental horizontal subsurface-flow constructed wetlands. *Water Air Soil Poll.* 183, 367-375.
- Chae, K. J., Choi, M. J., Kim, K. Y., Ajayi, F. F., Park, W., Kim, C. W., & Kim, I. S. (2010). Methanogenesis control by employing various environmental stress conditions in two-chambered microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 101(14), 5350-5357.
- Chambers, P., Allard, M., Walker, S.L., Marsalek, J., Lawrence, J., Servos, M., Busnarda, J., Munger, K., Adare, K., Jefferson, C., Kent, R., Wong, M. 1997. Impacts of municipal effluents on Canadian waters: a review. *Water Qual. Res. J. Can.* 32, 659-713.
- Chang, I.S., Moon, H., Bretschger, O., Jang, J.K., Park, H.I., Nealson, K.H., Kim, B.H. (2006). Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 163-177.
- Chen, C.Y., Chen, T.Y., Chung, Y.C. 2014. A comparison of bioelectricity in microbial fuel cells with aerobic and anaerobic anodes. *Environmental Technology* 35, 286–93.

- Chen, S., Patil, S. A., Brown, R. K., Schröder, U. 2019. Strategies for optimizing the power output of microbial fuel cells: transitioning from fundamental studies to practical implementation. *Applied energy* 233, 15-28.
- Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology* 99, 4044-4064.
- Chen, Y., Wen, Y., Zhou, Q., Vymazal, J. 2014. Effects of plant biomass on nitrogen transformation in subsurface-batch constructed wetlands: A stable isotope and mass balance assessment. *Water Research* 63, 158-167.
- Christy, P., Gopinath, L., Divya, D. 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 34, 167-173.
- Chung K, Okabe S. 2009. Continuous power generation and microbial community structure of the anode biofilms in a three-stage microbial fuel cell system. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:965–977
- Clarke, E., Baldwin, A. 2002. Responses of wetland plants to ammonia and water level. *Ecol. Eng.* 18, 257-264.
- Cooper, P. 2005. The performance of vertical flow constructed wetland systems with special reference to the significance of oxygen transfer and hydraulic loading rates. *Water Science and Technology* 5, 81-90.
- Corbella, C., Garfi, M., Puigagut, J. 2014. Vertical redox profiles in treatment wetlands as function of hydraulic regime and macrophytes presence: surveying the optimal scenario for microbial fuel cell implementation. *Science Total Environmental* 470-471, 754-758.
- Corbella, C., Guivernau, M., Viñas, M., Puigagut, J. 2015. Operational, design and microbial aspects related to power production with microbial fuel cells implemented in constructed wetlands. *Water Research* 84, 232-242.
- Doherty, L., Zhao, X., Zhao, Y., Wang, W. (2015a). The effects of electrode spacing and flow direction on the performance of microbial fuel cell constructed wetland. *Ecological Engineering* 79, 8–14.
- Corbella, C., Puigagut, J., Garfi, M. 2017. Life cycle assessment of constructed wetland systems for wastewater treatment coupled with microbial fuel cells. *Science of the total environment*, 584, 355-362.

- Cui, L., Zhu, X., Ma, M., Ouyang, Y., Dong, M., Zhu, W., Luo, S. 2008. Phosphorus sorption capacities and physicochemical properties of nine substrate materials for constructed wetland. *Arch. Environ. Con. Tox.* 55, 210-217.
- Czepiel, P. M., Crill, P. M., Harriss, R. C. 1993. Methane emissions from municipal wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2472-2477.
- da Rosa, A. C. 2010. Diversity and function of the microbial community on anodes of sediment microbial fuel cells fueled by root exudates. Doctor Dissertation of Philipps-Universitit.
- de Klein, J., van der Werf, A. 2014. Balancing carbon sequestration and GHG emissions in a constructed wetland. *Ecol. Eng.* 66, 36-42.
- Ding, Y., Song, X., Wang, Y., Yan, D. 2012. Effects of dissolved oxygen and influent COD/N ratios nitrogen removal horizontal subsurface flow constructed wetland. *Ecol. Eng.* 46, 107-111.
- Dirección General de Aguas (DGA). 2012. Estrategia Nacional de Recursos Hídricos 2012-2025. 40 pp.
- Dirección Obras Hidráulicas (DOH) y Dirección de Planeamiento (DPL). (2014). Identificación de brechas para la disponibilidad de agua potable rural, Chile: todos con agua; Regiones piloto Atacama y Los Ríos. Programa agua potable rural, Chile. 29 pp.
- Do, M. H., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Ni, B. J. 2018. Challenges in the application of microbial fuel cells to wastewater treatment and energy production: a mini review. *Science of The Total Environment* 639, 910-920.
- Doherty, L., Zhao, Y., Zhao, X., Wang, W. (2015b). Nutrient and organics removal from swine slurry with simultaneous electricity generation in an alum sludge-based constructed wetland incorporating microbial fuel cell technology, *Chemical Engineering Journal* 266, 74-81.
- Dong, X., Reddy, G. B. 2010. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. *Bioresource Technol.* 101, 1175-1182.
- Doyle, L., Marsil, E. (2015). Methods for enrichment of novel electrochemically active microorganisms. *Bioresource Technology* 195, 273–282.
- Du, X., Xu, Z., Li, J., Zheng, L. 2014. Characterization and removal of dissolved organic matter in a vertical flow constructed wetland. *Ecol. Eng.* 73, 610-615.
- Du, Z., Li, H., Gu, T. (2007). A state of art review on microbial fuel cells: A promising technology

for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances* 25: 464-482.

- Dulekgurgen, E., Doğruel, S., Karahan, Ö., Orhon, D. 2006. Size distribution of wastewater COD fractions as an index for biodegradability. *Water Res.* 40, 273-282.
- Dünner, I., 2004. Evaluación Integral de Plantas de tratamiento de Aguas Servidas y alternativas de tratamiento en localidades rurales concentradas. Aplicaciones en las regiones RM y VII. Memoria para optar al título de Ingeniero civil. Universidad de Chile. 175 pp.
- Dyer, S., Peng, C., McAvoy, D., Fendinger, N., Masscheleyn, P., Castillo, L., Lim, J. 2003. The influence of untreated wastewater to aquatic communities in the Balatuin River, The Philippines. *Chemosphere*, 52, 43–53.
- Fang, R.J., Tan, M.L., 2011. Control efecto of floating plants constructed wetland to nitrogen and phosphorous pollution from raice field drainage. *J. Anhui Agric. Scie.* 11, 70-72.
- Fang, Z., Song, H., Cang, N., Li, X. 2013. Performance of microbial fuel cell coupled constructed wetland system for decolorization of azo dye and bioelectricity generation. *Bioresource Technology* 144, 165–171.
- Fang, Z., Song, H., Cang, N., Li, X. 2015. Performance of microbial fuel cell coupled constructed wetland system for decolorization of azo dye and bioelectricity generation, *Bioresource Technology* 144, 165-171.
- Fang, Z., Song, H., Yu, R., Li, X. 2016. A microbial fuel cell-coupled constructed wetland promotes Degradation of azo dye decolorization products. *Ecological Engineering* 94, 455–463.
- Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J. 2008. Syntrophic processes drive the conversion of glucose in microbial fuel cell anodes. *Environmental science and technology*, 42(21), 7937-7943.
- Frêne, C., Ojeda, G., Santibáñez, J., Donoso, C., Sanzana, J., Molina, C., Andrade. P., Núñez-Ávila. M. 2014. Agua en Chile: diagnósticos territoriales y propuestas para enfrentar la crisis hídrica. Eds. Cristián Frêne y Pedro Andrade. Chile, 58 pp.
- Friedman, E. S., McPhillips, L. E., Werner, J. J., Poole, A. C., Ley, R. E., Walter, M. T., Angenent, L. T. 2016. Methane emission in a specific riparian-zone sediment decreased with bioelectrochemical manipulation and corresponded to the microbial community dynamics. *Frontiers in microbiology*, 6, 1523.

- García, J., Aguirre, P., Barragán, J., Mujeriego, R., Matamoros, V., Bayona, J. M. 2005. Effect of key design parameters on the efficiency of horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecol. Eng.* 25, 405-418.
- García, J., Aguirre, P., Mujeriego, R., Huang, Y., Ortiz, L., Bayona, J. M. 2004. Initial contaminant removal performance factors in horizontal flow reed beds used for treating urban wastewater. *Water Res.*38, 1669-1678.
- García, J., Capel, V., Castro, A., Ruiz, I., Soto, M. 2007. Anaerobic biodegradation tests and gas emissions from subsurface flow constructed wetlands. *Bioresource Technol.*98, 3044-3052.
- García, J., Corzo, A. 2008. Depuración con humedales construidos. Guía práctica de diseño, construcción y explotación de sistemas de humedales de flujo subsuperficial. Universidad Politécnica de Catalunya, España, 108 pp.
- García, J., Corzo, A. 2008. Depuración con Humedales Construidos: guía práctica de diseño, construcción y explotación de sistemas de humedales de flujo subsuperficial. Editorial UPC, Barcelona, España, 108 pp.
- García, J., Morató, J., Bayona, J. 2004. Nuevos criterios para el diseño y operación de humedales construidos, Ediciones CPET, Centro de Publicaciones, Campus Nord, Barcelona, España, 100 pp.
- García, J., Rousseau, D., Morato, J., Lesage, E., Matamoros, V., Bayona, J. 2010. Contaminant removal processes in subsurface-flow constructed wetlands: a review. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*40, 561-661.
- García, J., Rousseau, D., Morato, J., Lesage, E., Matamoros, V., Bayona, J. 2010. Contaminant removal processes in subsurface-flow constructed wetlands: a review. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*40, 561-661.
- Ge, Z., Zhang, F., Grimaud, J., Hurst, J., He, Z. 2013. Long-term investigation of microbial fuel cells treating primary sludge or digested sludge. *Bioresource Technology* 136:509-514.
- Gerardi, M. 2003. *The microbiology of Anaerobic Digesters*. Wiley-Interscience. A John Wiley Sons, Inc., Publication. New Jersey, United States. 177 pp.
- Gerardi, M. 2006. *Wastewater bacteria*. Wiley-Interscience. A John Wiley Sons, Inc., Publication. Pennsylvania, United States. 255 pp.

- Goud, R.K., Venkata Mohan, S. 2013. Prolonged applied potential to anode facilitate selective enrichment of bio-electrochemically active Proteobacteria for mediating electron transfer: microbial dynamics and bio-catalytic analysis. *Bioresource Technology* 137, 160-170.
- Grady, C., Daigger, G., Lim, H., 1999. *Biological wastewater treatment*. ed. marcel dekker (New York). p. 48-161.
- Grünfeld, S., Brix, H. 1999. Methanogenesis and methane emissions: effects of water table, substrate type and presence of *Phragmites australis*. *Aquat. Bot.* 641, 63-75.
- Gude, V.G. 2015. Energy and water autarky of wastewater treatment and power generation systems. *Renewable and Sustainable Energy Review* 45, 52-68.
- Gude, V.G. 2016. Wastewater treatment in microbial fuel cells- and overview. *Journal of Cleaner Production* 122, 287-307.
- Guerrero, M. 2014. Estudio del impacto ambiental y plan de manejo ambiental de la planta de tratamiento de aguas servidas de la junta administradora de agua potable y alcantarillado de la parroquia Quinchicoto. Tesis para optar al título de Magister en Agroecología y Ambiente. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. 138 pp.
- Habit, E., Parra, O., Valdovinos, C. 2005. Ictiofauna de un sistema fluvial receptor de aguas servidas: respuestas a una nueva planta de tratamiento (Río Quilque, Chile Central). *Gayana*, 69, 94-103.
- Halverson, N. 2004. Review of constructed subsurface flow vs. surface flow wetlands. Aiken: Westinghouse Savanna River Company, U.S. 42 pp.
- Hanjra, M., Blackwell, J., Carr, G., Zhang, F., Jackson, T. 2012. Wastewater irrigation and environmental health: Implications for water governance and public policy. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 215, 255-269.
- Henze, M. Harremoës, P., LaCour-Jansen, J., Arvin, E. 2002. *Wastewater treatment: biological and chemical processes*. Springer Science, Heidelberg, Germany. 430 pp.
- Hernández-Fernández, F., Pérez de los Ríos, A., Salar-García, M., Ortiz-Martínez, V., Lozano-Blanco, L., Godínez, C., Tomás-Alonso, F., Quesada-Medina, J. 2015. Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. *Fuel Processing Technology* 138, 284-297.



- Holeyton, C., Chambers, P., Grace, L., Kidd, K. 2011. Wastewater release and its impacts on Canadian waters. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 68, 1836-1859.
- Holmes, D.E., Bond, D.R., O'Neil, R.A., Reimers, C., Tender, L., Lovley, D. 2004. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microbial Ecology* 48, 178-190.
- Hussain, A., Mehta, P., Raghavan, V., Wang, H., Guiot, S. R., Tartakovsky, B. 2012. The performance of a thermophilic microbial fuel cell fed with synthesis gas. *Enzyme and microbial technology*, 51(3), 163-170.
- Ieropoulos I, Winfield J, Greenman J. 2010. Effects of flow-rate, inoculum and time on the internal resistance of microbial fuel cells. *Bioresource Technol* 101, 3520–3525.
- Instituto Nacional de estadística (INE). 2002. Glosario de términos de demografía y estadísticas vitales. Revisión febrero del 2019. <http://palma.ine.cl/demografia/menu/glosario.pdf>
- Ishii, S., Watanabe, K., Yabuki, S., Logan, B.E., Sekiguchi, Y. 2008. Characterization of electrode reducing rates of *Geobacter sulfurreducens* and an enriched electricity-generating mixed consortium in a microbial fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7348–7355.
- Jiang, H., Luo, S., Shi, X., Dai, M., Guo, R. 2013. A system combining microbial fuel cell with photobioreactor for continuous domestic wastewater treatment and bioelectricity generation. *Journal of Central South University* 20, 488–494.
- Johansson, A., Gustavsson, A., Öquist, M., Svensson, B. 2004. Methane emissions from a constructed wetland treating wastewater—seasonal and spatial distribution and dependence on edaphic factors. *Water Res.*38, 3960-3970.
- Jung, S., Regan, J. M. 2007. Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(2), 393-402.
- Jung, S., Regan, J. M. 2011. Influence of external resistance on electrogenesis, methanogenesis, and anode prokaryotic communities in microbial fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 564-571.
- Kabutey, F. T., Zhao, Q., Wei, L., Ding, J., Antwi, P., Quashie, F. K., Wang, W. 2019. An overview of plant microbial fuel cells (PMFCs): Configurations and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 110, 402-414.

- Kadlec, R. 2003. Effects of pollutant speciation treatment wetlands design. *Ecol. Eng.*201, 1-16.
- Kadlec, R., Knight, R. 1996. Treatment Wetlands, Lewis Publishers, CRC Press, 893 pp.
- Kadlec, R., Tanner, C., Hally, V., Gibbs, M. 2005. Nitrogen spiraling in subsurface-flow constructed wetlands: implications for treatment response. *Ecol. Eng.*25, 365-381.
- Kadlec, R., Wallace, S. (2009). Treatment Wetlands, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 1016 pp.
- Kang, C.S., Eaktasang, N., Kwon, D.Y., Kim, H.S. 2014. Enhanced current production by *Desulfovibrio desulfuricans* biofilm in a mediator-less microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 165, 27–30.
- Kantawanichkul, S., Kladprasert, S., Brix, H. 2009. Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucratus*. *Ecol. Eng.*35, 238-247.
- Kesari, K.K., Behari, J., 2008. Ultrasonic impact on bacterial population in sewage sample. *International Journal of Environment and Waste Management* 2 (3), 233–244.
- Kiely, P. D., Rader, G., Regan, J. M., Logan, B. E. 2011. Long-term cathode performance and the microbial communities that develop in microbial fuel cells fed different fermentation endproducts. *Bioresource technology*, 102(1), 361-366.
- Kiely, P., Regan, J., Logan, B. 2011. The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. *Current opinion in Biotechnology* 22,378-385.
- Kim, B.H., Chang, I.S., Gadd, G.M., 2007. Challenges in microbial fuel cell development and operation. *Applied microbiology and biotechnology* 76, 485-494.
- Kim, B.H., Park, H.S., Kim, H.J., Kim, G.T., Chang, I.S., Lee, J., Phung, N.T., 2004. Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 672–681.
- Kim, J. R., Dec, J., Bruns, M.A., Logan, B.E. 2008. Removal of Odors from Swine Wastewater by Using Microbial Fuel Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2540-2543.
- Kimura, Z., Okabe, S. 2013. Acetate oxidation by syntrophic association between *Geobacter sulfurreducens* and a hydrogen-utilizing exoelectrogen. *The ISME Journal* 7:1472–1482.
- Koch, C., Aulenta, F., Shöder, U., Harnisch, F. (2016). *Microbial Electrochemical Technologies:*

Industrial and Environmental Biotechnologies Based on Interactions of Microorganisms with Electrodes. Reference Module in Earth and Environmental Sciences Elsevier, Amsterdam, 1-19 pp.

- Kumar, R., Singh, L., Zularisam, A.W. 2016. Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renewable and Sustainable Energy Review* 56, 1322-1336.
- Lee, C., Kim, J., Hwang, K., O'Flaherty, V., Hwang, S. 2009. Quantitative analysis of methanogenic community dynamics in three anaerobic batch digesters treating different wastewaters. *Water Res.*43, 157-165.
- Li, H., Qu, Y., Tian, Y., Feng, Y., 2019. The plant-enhanced bio-cathode: root exudates and microbial community for nitrogen removal. *J Environ Sci.* 77, 97-103.
- Li, L., He, C., Ji, G., Zhi, W., Sheng, L. 2015. Nitrogen removal pathways in a tidal flow constructed wetland under flooded time constraints. *Ecological Engineering* 81, 266-271.
- Li, M., Zhou, M., Tian, X., Tan, C., McDaniel, C. T., Hassett, D. J., Gu, T. 2018. Microbial fuel cell (MFC) power performance improvement through enhanced microbial electrogenicity. *Biotechnology advances* 36, 1316-1327.
- Libralato, G., Volpi, A., Avezzi, F. 2012. To centralise or to decentralise: an overview of the most recent trends in wastewater treatment management, *Journal of Environmental Management* 94: 61–68.
- Liu, C., Xu, K., Inamori, R., Ebie, Y., Liao, J., Inamori, Y. 2009. Pilot-scale studies of domestic wastewater treatment by typical constructed wetlands and their greenhouse gas emissions. *Front. Envir. Sci Eng. China*,3, 477-482.
- Liu, D. Y., Ding, W. X., Jia, Z. J., Cai, Z. C. 2011. Relation between methanogenic archaea and methane production potential in selected natural wetland ecosystems across China. *Biogeosciences*, 8, 329-338.
- Liu, H., Logan, B.E. 2004. Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane. *Environmental Science and Technology* 38, 4040-4046.
- Liu, J., Qiao, Y., Lu, Z.S., Song, H., Li, C.M. 2012. Enhance electron transfer and performance of microbial fuel cells by perforating the cell membrane. *Electrochem. Commun.* 15, 50–53.

- Liu, R., Zhao, Y., Doherty, L., Hu, Y., Hao, X. 2015. A review of incorporation of constructed wetland with other treatment processes. *Chemical Engineering Journal* 279, 220-230.
- Liu, S., Song, H., Wei, S., Yang, F., Li, X. 2014. Bio-cathode materials evaluation and configuration optimization for power output of vertical subsurface flow constructed wetland-microbial fuel cell systems, *Bioresource Technology* 166, 575-583.
- Liu, Y., Bond, D.R. (2012). Long-distance electron transfer by *G. sulfurreducens* biofilms results in accumulation of reduced c-type cytochromes. *ChemSusChem COMMUNICATIONS* 5,1047–1053.
- Logan, B. E. 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology* 7 (5), 375-381.
- Logan, E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K. 2006. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science and Technology* 40, 5181-5192.
- López, D., Fuenzalida, D., Vera, I., Rojas, K., Vidal, G. 2015. Relationship between the removal of organic matter and the production of methane in subsurface flow constructed wetlands designed for wastewater treatment. *Ecol. Eng.* 83, 296-304.
- Lovley, D. R. 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4 (7), 497-508.
- Lovley, D.R. 2008. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 564-571.
- Lu, L., Huggins, T., Jin, S., Zuo, Y., Ren, Z.J. 2014. Microbial metabolism and community structure in response to bioelectrochemically enhanced remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environmental Science and Technology* 48, 4021–4029.
- Lu, L., Xing, D., Ren, N. 2012. Pyrosequencing reveals highly diverse microbial communities in microbial electrolysis cells involved in enhanced H<sub>2</sub> production from waste activated sludge. *Water Research* 46, 2425–2434.
- Luederitz, V., Eckert, E., Lange-Weber, M., Lange, A., Gersberg, R. M. 2001. Nutrient removal efficiency and resource economics of vertical flow and horizontal flow constructed wetlands. *Ecol. Eng.* 18, 157-171.

- Luo, H., Liu, G., Zhang, R., Jin, S. 2009. Phenol degradation in microbial fuel cells. *Chemical Engineering Journal* 147: 259-264.
- Luo, J.M., Li, M., Zhou, M.H., Hu, Y.S. 2015. Characterization of a novel strain phylogenetically related to *Kocuria rhizophila* and its chemical modification to improve performance of microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 69, 113–120.
- Maddison, M., Mairing, T., Remm, K., Lesta, M., Mander, Ü. 2009. Dynamics of *Typha latifolia* L. Populations in treatment wetlands in Estonia. *Ecol. Eng.* 35, 258-264.
- Malecki-Brown, L. M., White, J. R., Brix, H. 2010. Alum application to improve water quality in a municipal wastewater treatment wetland: Effects on macrophyte growth and nutrient uptake. *Chemosphere*, 79, 186-192.
- Mara, D. 2004. Domestic wastewater. Treatment in developing countries. Routledge, Earthscan. London, Sterling, UK, 293 pp.
- Metcalf y Eddy. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment, and Reuse*. McGraw-Hill, New York, USA, 1820 pp.
- Min, B., Kim, J., Oh, S., Regan, J.M., Logan, B.E., 2005. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. *Water Research* 39 (20), 4961–4968.
- Mohan, S. V., Velvizhi, G., Modestra, J. A., Srikanth, S. 2014. Microbial fuel cell: critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 40, 779-797.
- Molinos-Senante, M., Gómez, T., Caballero, R., Hernández-Sancho, F., Sala-Garrido, R. 2015. Assessment of wastewater treatment alternatives for small communities: An analytic network process approach. *Science of the Total Environment* 532, 676-687.
- Molinos-Senante, M., Gómez, T., Garrido-Baserba, M., Caballero, R., Sala-Garrido, R. 2014. Assessing the sustainability of small wastewater treatment systems: a composite indicator approach. *Science of the total environment* 497, 607-617.
- More, T. T., Ghangrekar, M. M. 2010. Improving performance of microbial fuel cell with ultrasonication pre-treatment of mixed anaerobic inoculum sludge. *Bioresource technology*, 101(2), 562-567.

- Moreno, J., Moral, R., García, J. Valero, J. Bernal, M. 2007. Aspectos biológicos de la digestión anaeróbica. En: De residuo a recurso. El camino hacia la sostenibilidad. Ed. Mundi-prensa. España, 319 pp.
- Muga, H. E., Mihelcic, J. R. 2008. Sustainability of wastewater treatment technologies. *Journal of environmental management* 88, 437-447.
- Neubauer, M., Plaza de los Reyes, C., Pozo, G., Villamar, C. A., Vidal, G. 2012. Growth and nutrient uptake by *Schoenoplectus californicus* (CA Méyer) Sójak in a constructed wetland fed with swine slurry. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 12, 421-430.
- Nguyen, L. M. 2000. Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters. *Ecol. Eng.* 16, 199-221.
- Nimje, V., Chen, C., Chen, H., Huang, Y., Tseng, M., Cheng, K., Chang, Y. (2012). Comparative bioelectricity production from various wastewaters in microbial fuel cells using mixed cultures and a pure strain of *Shewanella oneidensis*. *Bioresource Technology* 104, 315–323.
- Nitisoravut, R., & Regmi, R. 2017. Plant microbial fuel cells: A promising biosystems engineering. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 81-89.
- Oon, Y., Ong, S., Ho, L., Wong, Y., Dahalan, F., Lehl, k., Thung, W. 2016. Synergistic effect of up-flow constructed wetland and microbial fuel cell for simultaneous wastewater treatment and energy recovery. *Bioresource Technology* 203:190–197.
- Oon, Y., Ong, S., Ho, L., Wong, Y., H, Y., Kaur, W. 2015. Hybrid system up–flow constructed wetland integrated with microbial fuel cell for simultaneous wastewater treatment and electricity generation, *Bioresource Technology* 186: 270–275.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). 2006. The New Rural Paradigm: Policies and Governance. *OECD Rural Policy Reviews*. Organisation for Economic Co-Operation and Development. Paris.168 pp.
- Pandey, P., Shinde, V., Deopurkar, R., Kale, S., Patil, S., Pant, D. 2016. Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Applied Energy* 168, 706-723.
- Pant D., Van Bogaert, L., Vanbroekhoven, K. 2010. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology* 101, 1533-1543.

- Plaza de los Reyes, C., Vera, L., Vidal, G., Salvato, M., Borin, M. 2011. Consideraciones para la eliminación del nitrógeno en humedales artificiales. *Tecnología del agua*, 31, 40-49.
- Poggi, H., Carmona, A., Vazquez, L., Solorza, O. (2009). Effect of Inoculum Type on the Performance of a Microbial Fuel Cell Fed with Spent Organic Extracts from Hydrogenogenic Fermentation of Organic Solid Wastes. *Journal of New Materials for Electrochemical Systems* 12:49-54.
- Prasad, D., Arun, S., Murugesan, A., Padmanaban, S., Satyanarayanan, R.S., Berchamans, S., Yegnaraman, V. (2007). Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 2604-2610.
- Premier, G.C., Kim, J.R., Massanet-Nicolau, J., Kyazze, G., Esteves, S.R.R., Penumathsa, B.K.V., Rodríguez, J., Maddy, J., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. 2013. Integration of biohydrogen, biomethane and bioelectrochemical systems. *Renewable Energy* 49, 188–192.
- Puigagut, J., Villaseñor, J., Salas, J. J., Bécares, E., García, J. 2007. Subsurface-flow constructed wetlands in Spain for the sanitation of small communities: a comparative study. *Ecol. Eng.* 30, 312-319.
- Rabaey K., Rodriguez J., Blackall.LL., Keller J., Gross P., Batstone D., Verstraete W., Neelson K.N. 2007. Microbial ecology meets electrochemistry: Electricity-driven and driving communities. *ISME Journal* 1, 9-18.
- Rabaey, K., Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology* 23, 291-298.
- Ramalho, R. 1996. Tratamiento de Aguas Residuales. Editorial Reverté, Barcelona, España, 707 pp.
- Reddy, K., Patrick, W. 1984. Nitrogen transformations and loss in flooded soils and sediments. *Crit. Rev. Environ. Control.* 13, 273–309.
- Revelo, D., Hurtado, N., Ruiz, J. 2013. Celdas de combustible microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. *Revista Información Tecnológica* 24: 17–28.
- Reynolds, K. 2002. Tratamiento de aguas residuales en Latinoamérica. *Latinoamérica.* 12, 1-4.



- Rismani-Yazdi, H., Carver, S.M., Christy, A.D., Yu, Z., Bibby, K., Peccia, J., Tuovinen, O.H. 2013. Suppression of methanogenesis in cellulose-fed microbial fuel cells in relation to performance, metabolite formation, and microbial population. *Bioresour. Technol.* 129, 281-288.
- Rivett, M., Buss, S., Morgan, P., Smith, J. Bemment, C. 2008. Nitrate attenuation in groundwater: a review of biogeochemical controlling processes. *Water Res.* 42, 4215-4232.
- Rodríguez, P. 2012. Saneamiento en el sector rural: En busca de opciones sostenibles. Agua Potable Rural. Revista AIDIS.
- Rodríguez, P. 2011. Análisis de la situación de las aguas servidas en zonas Rurales de la IV, VI y RM y proposición de un Sistema Sustentable para su Tratamiento. Memoria ingeniero civil, Universidad de Chile.
- Rojas, K., Vera, I., Vidal, G. 2013. Influencia de la estación y de las especies *Phragmites australis* y *Schoenoplectus californicus* en la eliminación de materia orgánica y nutrientes contenidos en aguas servidas durante la operación de puesta en marcha de humedales construidos de flujo horizontal. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* (69), 289.
- Rousseau, D., Santa, S. 2007. Quantification of oxygen transfer pathways in horizontal subsurface-flow constructed wetlands. In Mander, Ü., Koiv, M., Vohla, C. eds. 2nd International Symposium on Wetland Pollutant Dynamics and Control WETPOL 2007, Tartu, Estonia, 260 pp.
- Rousseau, D., Vanrolleghem, P., De Pauw, N. 2004. Model-based design of horizontal subsurface-flow constructed treatment wetlands: A review. *Water Res.* 38, 1484-1493.
- Ruiz, I., Díaz, M., Crujeiras, B., García, J., Soto, M. 2010. Solids hydrolysis and accumulation in a hybrid anaerobic digester-constructed wetlands system. *Ecol. Eng.* 36, 1007-1016.
- Ryu, J.H., Lee, H.L., Lee, Y.P., Kim, T.S., Kim, M.K., Anh, D.T. 2013. Simultaneous carbón and nitrogen removal from piggery wastewater using loop configuration microbial fuel cell. *Process Biochemistry* 48, 1080–5.
- Schröder, U. 2007. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Physical Chemistry Chemical Physics* 9, 2619–2629.
- Saeed, T., Sun, G. 2012. A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *J. Environ. Manage.* 112, 429-448.



- Sciarria, T., Tenca, A., D'Epifanio, A., Mecheri, B., Merlino, J., Barbato, M., Borin, S., Licoccia, S., Garavaglia, V., Adani, F. (2013). Using olive mill wastewater to improve performance in producing electricity from domestic wastewater by using single-chamber microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 147, 246–253.
- Scott, K., Yu, E.H. 2015. *Microbial Electrochemical and Fuel Cells, Fundamentals and Applications*. Woodhead Publishing, Elsevier Science. Energy and Power, 247-254 pp. - SISS. (2015). Informe de Gestión Del Sector Sanitario 2014. Retrieved ([http://www.siss.gob.cl/577/articles-11831\\_recurso\\_1.pdf](http://www.siss.gob.cl/577/articles-11831_recurso_1.pdf))
- Singh, S., Tiwari, S. 2019. Climate Change, Water and Wastewater Treatment: Interrelationship and Consequences. In *Water Conservation, Recycling and Reuse: Issues and Challenges* (pp. 203-214). Springer, Singapore.
- Speece, R. 2008. *Anaerobic Biotechnology and Odor/Corrosion Control for Municipalities and Industries*. J. M. Speece, Ed: Archae Press. Nashville, Unites States, 586 pp.
- Srivastava, P., Yadav, A. K., Garaniya, V., Abbassi, R. 2019. Constructed wetland coupled microbial fuel cell technology: development and potential applications. In *Microbial Electrochemical Technology* (pp. 1021-1036). Elsevier.
- Srivastava, P., Yadav, A.K., Mishra, B. 2015. The effects of microbial fuel cell integration into constructed wetland on the performance of constructed wetland. *Bioresource Technology* 195:223–230.
- Stefanakis, A., Tsihrintzis, V. 2009. Performance of pilot-scale vertical flow constructed wetlands treating simulated municipal wastewater: effect of various design parameters. *Desalination*. 248, 753-770.
- Stottmeister, U., Wießner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., Moormann, H. 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22, 93-117.
- Subsecretaría de Desarrollo Regional y Administrativo (SUBDERE). 2009. Manual de soluciones de saneamiento sanitario para zonas rurales. Centro de Documentación y Publicación CEDOC. Chile, 202 pp.
- Subsecretaría de Desarrollo Regional y Administrativo (SUBDERE). 2014. Taller sobre estrategia para las plantas de tratamiento de las aguas servidas rurales en Chile. Noticia disponible:

<http://www.subdere.cl/sala-de-prensa/subdere-y-bid-desarrollan-taller-sobre-estrategia-para-las-plantas-de-tratamiento-de->. Extraído: agosto 2019.

- Sun, J., Hu, Y., Bi, Z., Cao, Y., 2009. Improved performance of air-cathode single-chamber microbial fuel cell for wastewater treatment using microfiltration membranes and multiple sludge inoculation. *Journal of Power Sources* 187 (2),471–479.
- Sundaravadivel, M., Vigneswaran, S. 2001. Constructed wetlands for wastewater treatment. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 31, 351-409.
- Súper Intendencia de Servicios Sanitarios (SISS). 2014. Informe anual de coberturas urbanas de servicios sanitarios. Santiago, Chile, 24 pp.
- Tanner, C. 1996. Plants for constructed wetland treatment systems—a comparison of the growth and nutrient uptake of eight emergent species. *Ecol. Eng.* 7, 59-83.
- Tanner, C. 2001. Plants as ecosystem engineers in subsurface-flow treatment wetlands. *Water Sci. Technol.*44, 11-12.
- Tanner, C., Clayton, J., Upsdell, M. 1995. Effect of loading rate and planting on treatment of dairy farm wastewaters in constructed wetlands—II. Removal of nitrogen and phosphorus. *Water Res.*29, 27-34.
- Thygesen, A., Poulsen, F.W., Angelidaki, I., Min, B., Bjerre, A.B. 2011. Electricity generation by microbial fuel cells fuelled with wheat straw hydrolysate. *Biomass Bioenergy* 35, 4732–9.
- Timmers, R.A., Strik, D.P.B.T.B., Arampatzoglou, C., Buisman, C.J.N., Hamelers, H.V.M. 2011. Rhizosphere anode model explains high oxygen levels during operation of *Glyceria maxima* PMFC. *Bioresource Technology* 108, 60-67.
- UNICEF, WHO. Progress on drinking water and sanitation: 2012 update; 2012 [Available from: <http://www.unicef.org/media/files/JMPReport2012.pdf>].
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) 1992. Manual Wastewater Treatment/Disposal for Small Communities. Cincinnati, Ohio, USA, 120 pp.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) 2000. Manual: Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters. Cincinnati, Ohio, USA, 166 pp.
- Velvizhi, G., Mohan, S.V. 2011. Biocatalyst behavior under self-induced electrogenic microenvironment in comparison with anaerobic treatment: evaluation with pharmaceutical

wastewater for multi-pollutant removal. *Bioresource Technolgy* 102, 10784-10793.

- Vera, I. 2012. Análisis de funcionamiento y patrones asociativos de sistemas de tratamiento convencionales y naturales de aguas servidas para la eliminación de materia orgánica y nutrientes. Trabajo de grado, Doctorado Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción, Chile. 236 pp.
- Vera, I., Araya, F., Andrés, E., Sáez, K., Vidal, G. 2014. Enhanced phosphorus removal from sewage in mesocosm-scale constructed wetland using zeolite as medium and artificial aeration. *Environ. Technol.* 35, 1639-1649.
- Vera, I., García, J., Sáez, K., Moragas, L., Vidal, G. 2011. Performance evaluation of eight years experience of constructed wetland systems in Catalonia as alternative treatment for small communities, *Ecological Engineering*, 37: 364–371.
- Villasenor, J., Capilla, P., Rodrigo, M.A., Canizares, P., Fernandez, F.J. 2013. Operation of a horizontal subsurface flow constructed wetland e microbial fuel cell treating wastewater under different organic loading rates. *Water Resource* 47:6731-6738.
- Viridis, B, Freguia, S., Rozendal, R., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J. 2011. Microbial fuel cells. In: Wilderer, P. (Ed.) *Treatise on water science*, Elsevier, Oxford, UK, 641-645 pp. –
- Viridis, B., Rabaey, K., Juan, Z., Keller, J. 2008. Microbial fuel cells for simultaneous carbon and nitrogen removal. *Water research* 42, 3013-3024.
- Vohla, C., Alas, R., Nurk, K., Baatz, S., Mander, Ü. 2007. Dynamics of phosphorus, nitrogen and carbon removal a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Sci. Total Environ.* 380, 66-74.
- von Sperling, M. 1996. Comparison among the most frequently used systems for wastewater treatment in developing countries. *Water Sci. Technol.* 33, 59-72.
- von Sperling, M. 2007. *Biological Wastewater Treatment. Volume 1: Wastewater characteristics, treatment and disposal.* IWA Publishing, London, England, 292 pp.
- Vymazal y Kröpfelová. 2009. Removal of organics in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: A review of the field experience, *Science of the total environmental* 407, 3911-3922.
- Vymazal, J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 380, 48-65.

- Vymazal, J. 2011. Long-term performance of constructed wetlands with horizontal sub-surface flow: Ten case studies from the Czech Republic. *Ecol. Eng.* 37, 54-63.
- Vymazal, J. 2013. Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: a review. *Ecol. Eng.* 61, 582-592.
- Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P. F., Haberl, R., Perfler, R., Laber, J. 1998. Removal mechanisms and types of constructed wetlands. *Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe*, 17-66.
- Vymazal, J., Kröpfelová, L. 2011. A three-stage experimental constructed wetland for treatment of domestic sewage: first 2 years of operation. *Ecol. Eng.* 37, 90-98.
- Wallace, S., Knight, R. 2006. *Small-scale Constructed Wetland Treatment Systems: Feasibility, Design Criteria and OM Requirements*. IWA Publishing. R-21 pp.
- Wang, H., Ren, Z.J. 2013a. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances* 31, 1796–1807.
- Wang, X., Feng, Y. J., Lee, H. 2008. Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell. *Water Science and Technology* 57, 1117-1121.
- Wang, X., Feng, Y., Liu, J., Lee, H., Li, C., Li, N., Ren, N. (2010). Sequestration of CO<sub>2</sub> discharged from anode by algal cathode in microbial carbon capture cells (MCCs). *Biosensors and Bioelectronics* 25, 2639-2643.
- Wang, Y., Yang, H., Ye, C., Chen, X., Xie, B., Huang, C., Xu, M. 2013b. Effects of plant species on soil microbial processes and CH<sub>4</sub> emission from constructed wetlands. *Environmental Pollution* 174:273-278. - Wang, X., Feng, Y. J., Lee, H. (2008). Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell. *Water Science and Technology* 57, 1117-1121.
- Wang, Y., Zhao, Y., Xu, L., Wang, W., Doherty, L., Tang, C., Zhao, J. 2017. Constructed wetland integrated microbial fuel cell system: looking back, moving forward. *Water Science and Technology* 76, 471-477.
- Watanabe, K. 2008. Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy. *J Biosci Bioeng* 106:528–36.

- Wei, M., Rakoczy, J., Vogt, C., Harnisch, F., Schumann, R., Richnow, H. (2015). Enhancement and monitoring of pollutant removal in a constructed wetland by microbial electrochemical technology, *Bioresource Technology* 196: 490–499.
- Wu, X. Y., Tong, F., Song, T. S., Gao, X. Y., Xie, J. J., Zhou, C. C., Wei, P. 2015. Effect of zeolite-coated anode on the performance of microbial fuel cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90, 87-92.
- Xie, T.; Jing, Z.; Hu, J.; Yuan, P.; Liu, Y.; Cao, S. Degradation of nitrobenzene-containing wastewater by a microbial-fuel-cell-coupled constructed wetland. *Ecol. Eng.* 2018, 112, 65–71.
- Xing, D., Cheng, S., Regan, J. M., Logan, B. E., 2009. Change in microbial communities in acetate- and glucose-fed microbial fuel cells in the presence of light. *Biosensors and Bioelectronics* 25, 105-111.
- Xu, D., Xiao, E. R., Xu, P., Zhou, Y., Zhou, Q. H., Xu, D., Wu, Z. B. 2017. Effects of influent organic loading rates and electrode locations on the electrogenesis capacity of constructed wetland-microbial fuel cell systems. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 36(2), 435-441.
- Xu, L., Yu, W., Graham, N., Zhao, Y., Qu, J. 2019. Application of Integrated Bioelectrochemical-Wetland Systems for Future Sustainable Wastewater Treatment. *Environmental Science and Technology*, 53, 1741-1743.
- Yadav, A. K., Srivastava, P., Kumar, N., Abbassi, R., & Mishra, B. K. 2018. Constructed Wetland-Microbial Fuel Cell: An Emerging Integrated Technology for Potential Industrial Wastewater Treatment and Bio-Electricity Generation. *Constructed Wetlands for Industrial Wastewater Treatment*, 493-510.
- Yadav, A.K., Dash, P., Mohanty, A., Abbassi, R., Mishra B.K. 2012. Performance assessment of innovative constructed wetland-microbial fuel cell for electricity production and dye removal. *Ecological Engineering* 47, 126-131.
- Yang, Y., Xu, M., Guo, J., Sun, G. 2012. Review Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Process Biochemistry* 47, 1707-1714.
- Yuan, Y., Zhou, S., Xu, N., Zhuang, L., 2011. Electrochemical characterization of anodic biofilms enriched with glucose and acetate in single-chamber microbial fuel cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 82, 641-646.

- Zhang, B., Wang, Z., Zhou, X., Shi, C., Guo, H., Geng, C. 2015. Electrochemical decolorization of methyl orange powered by bioelectricity from single-chamber microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 181, 360–362.
- Zhang, F., Ge, Z., Grimaud, J., Hurst, J., He, Z. 2013a. Long-term performance of liter scale microbial fuel cells treating primary effluent installed in a municipal wastewater treatment facility. *Environmental Science and Technology* 47, 4941-4948.
- Zhang, F., Ge, Z., Grimaud, J., Hurst, J., He, Z. 2013b. In situ investigation of tubular microbial fuel cells deployed in an aeration tank at a municipal wastewater treatment plant. *Bioresource Technology* 136, 316-321.
- Zhang, P., Zhang, G., Wang, W., 2007. Ultrasonic treatment of biological sludge: floc disintegration, cell lysis and inactivation. *Bioresource Technology* 98, 207–210.
- Zhang, S.; Song, H.L.; Yang, X.L.; Yang, Y.L.; Yang, K.Y.; Wang, X.Y. 2016. Fate of tetracycline and sulfamethoxazole and their corresponding resistance genes in microbial fuel cell coupled constructed wetlands. *RSC Adv.* 6, 95999–96005.
- Zhang, Y. C., Jiang, Z. H., Ying, L. 2015. Application of electrochemically active bacteria as anodic biocatalyst in microbial fuel cells. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 43 (1), 155-163.
- Zhang, Y., Mo, G., Li, X., Zhang, W., Zhang, J., Ye, J. 2011. A graphene modified anode to improve the performance of microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 196, 5402–5407.
- Zhao, F., Slade, R.C.T., Varcoe, J.R., 2009. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. *Chemical Society Review* 38, 1926–1939.
- Zhao, Y., Collum, S., Phelan, M., Goodbody, T., Doherty, L., Hu, Y. 2013. Preliminary investigation of constructed wetland incorporating microbial fuel cell: Batch and continuous flow trials. *Chemical Engineering Journal* 229, 364–370.
- Zhao, Y., Liu, B., Zhang, W., Ouyang, Y., An, S. 2010. Performance of pilot-scale vertical-flow constructed wetlands in responding to variation in influent C/N ratios of simulated urban sewage. *Bioresource Technol.* 101, 1693-1700.
- Zhao, Y., Xia, X., Yang, Z. 2013. Growth and nutrient accumulation of *Phragmites australis* in relation to water level variation and nutrient loadings in a shallow lake. *J. Environ. Sci.* 25, 16-25.

- Zhi, W., Ge, Z., He, Z., Zhang, H. 2014. Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: a review. *Bioresource technology* 171, 461-468.
- Zouboulis, A., Tolkou, A. 2015. Effect of climate change in wastewater treatment plants: reviewing the problems and solutions. In *Managing water resources under climate uncertainty* (pp. 197-220). Springer, Cham.



## ANEXO I

### HITOS Y PRODUCTOS DE LA TESIS





### **Publicaciones en revistas indexadas**

1. **González, T.**, Ureta-Zañartu, M.S., Marco, J.F. and Vidal, G. 2019. Effect of Zeolite-Fe on graphite anode in electroactive biofilm development for application in microbial fuel cells. *Applied Surface Science* 467-468: 851-859.
2. **González, T.**, Vidal, G. 2019. Behavior of the integrated wetland system microbial fuel cell for the treatment of sewage and generation of electricity. *Environmental Science and Technology* (enviada).

### **Presentaciones a congresos internacionales**

- 1- **González, T.**, Peña, L. and Vidal, G., 2017. Assess of the bioelectricity generation from organic matter degradation by Constructed Wetland-Microbial Fuel Cell. The 14th IWA leading edge conference on water and wastewater technology. Florianopolis, Brazil.
- 2- **González, T.**, Ureta-Zañartu M.S. and Vidal, G. 2017. Electrochemical characterization of graphite-zeolite electrodes for their use of as bioanodes in microbial fuel cells. *International Society for Microbial Electrochemistry and Technology (ISMET6)*. Lisbon, Portugal.
- 3- **González, T.** and Vidal, G. 2018. Recuperación de energía a partir de aguas servidas mediante una celda combustible microbiana integrada a un humedal construido. *Water Congress 2018. 6° Congreso Internacional en Gestión del Agua en Minería y 2° Congreso Internacional de Agua en Procesos Industriales*. Santiago, Chile.
- 4- **González, T.** and Vidal, G. 2018. Comportamiento del sistema integrado humedal construido-celda combustible microbiana para el tratamiento de aguas servidas y generación de electricidad. *IV Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua*. Lima, Perú.
- 5- **Gonzalez, T.**, Miranda, J.P., Vidal, G. 2019. Influence of microbial fuel cell integration on nitrification process in a vertical subsurface flow constructed wetland for domestic wastewater treatment. *8th International Symposium on Wetland Pollutans Dynamics and Control (WETPOL)*. Aarhus, Denmark.

## ANEXO II

**PORTADA DE LOS ARTICULOS PUBLICADOS**





Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/apsusc](http://www.elsevier.com/locate/apsusc)

Full Length Article

## Effect of Zeolite-Fe on graphite anode in electroactive biofilm development for application in microbial fuel cells

Thaís González<sup>a</sup>, M.S. Ureta-Zañartu<sup>b</sup>, J.F. Marco<sup>c</sup>, Gladys Vidal<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Environmental Engineering & Biotechnology Group, Environmental Science Faculty & EULA-CHILE Center, Universidad de Concepción, Concepción, Chile<sup>b</sup> Departamento de Ciencias del Ambiente, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 3363, Santiago, Chile<sup>c</sup> Instituto de Química Física "Rozasolano", CSIC, C. Serrano, 119, 28006 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Microbial fuel cell  
Anode modification  
Zeolite Y  
Biofilm growth  
Electrochemical characterization

## ABSTRACT

The performance of microbial fuel cells (MFCs) is highly dependent on the electrode materials. The electrode surface can be modified to provide a favorable environment for biofilms to enhance electron transfer from the bacteria to the anode. In this work, Faujasite zeolite-Y (ZY) was exchanged with iron (Fe) and was used to modify glassy carbon/graphite electrodes (GC/gr-ZY<sub>Fe</sub>) evaluating its effect in electroactive biofilm development for application in microbial fuel cells. The novel material was evaluated as an anode in MFCs by comparing its performance with GC/gr and GC/gr-ZY electrodes. The results show that when using a GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> electrode, an electroactive biofilm with good electrochemical activity for acetate degradation can be generated on the electrode surface. The maximum current density obtained with a GC/gr-ZY<sub>Fe</sub>-BF electrode (where BF is biofilm) was 7.7 times higher than that of a GC/gr anode. The modification generates a less hydrophobic electrode surface that facilitates microbial cell attachment, thereby improving bioelectricity production. By using scanning electron microscopy, a homogeneous microbial community with bacteria that had a similar short rod-shaped morphology was observed. Furthermore, electrochemical impedance spectroscopy demonstrated that the charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) decreased as the biofilm grew, revealing that the presence of the biofilm facilitated the electrochemical reaction. After 7 days of MFC operation, the GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> bioanode showed a reduction in  $R_{ct}$  from  $212.9 \pm 1.81 \Omega$  to  $151.5 \pm 1.46 \Omega$ , which was 2.4 times lower than that achieved with GC/gr. The biofilm on GC/gr-ZY<sub>Fe</sub> was characterized using cyclic voltammetry, and the results showed a larger oxidation peak ( $169.8 \mu\text{A cm}^{-2}$ ) than that of the GC/gr electrode ( $36.5 \mu\text{A cm}^{-2}$ ), further supporting the better electron-transfer properties of the modified electrode. Additionally, this result confirms the capability of biofilms to act as bioelectrocatalysts under acetate-oxidizing conditions.

## 1. Introduction

Microbial fuel cells (MFCs) are bioelectrochemical devices that convert inorganic and organic waste into electricity using microorganisms as catalysts [1]. The anode is the site where a biocatalyst grows in the form of a biofilm, which promotes the decomposition of biomass to produce electrons and protons. For this reason, the characteristics of the electrode surface crucially affect the bacterial attachment and electrical connection between the bacteria and the electrode surface.

An ideal anodic material must be stable and biocompatible to promote microbial adhesion and biofilm formation; the material must also be conductive to facilitate the transfer and flow of electrons, thus promoting the electron transfer reaction rate on the electrode surface [2,3]. Materials commonly used as anodes include commercial carbon-

based electrodes, such as graphite rods, granular activated carbon, graphite felt and carbon cloth [4,5]. To improve the anode performance, other types of non-conventional carbonaceous materials such as graphene, carbon nanotubes, conducting polymers, composites and metal oxides have also been developed as electrodes [6–9].

The electrode surface can be modified to become favorable environments for biofilm growth, taking advantage of the film's ability to enhance electron transfer (ET) from the bacteria to the anode surface, thus achieving more efficient anodes. Different surface modification technologies have been developed, such as doping, coating and functionalizing the electrode surface with different materials [10]. An important aspect to consider regarding the electrode surface is its degree of hydrophobicity or hydrophilicity. An increase in hydrophilicity can be expected if the electrode surface is modified with transition metal oxides due to the presence of OH groups and adsorbed water or a

\* Corresponding author.

E-mail address: [gvidal@udec.cl](mailto:gvidal@udec.cl) (G. Vidal).<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.10.120>

Received 11 March 2018; Received in revised form 7 October 2018; Accepted 15 October 2018

Available online 30 October 2018

0169-4332/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.