



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Celda microbiana de biocátodos para el tratamiento de efluentes  
contaminados con compuestos alifáticos clorados**

**T E S I S**

Que presenta

**Jaime Eleazar Borbolla Gaxiola**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de Tesis

**Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo**

**Ciudad de México**

**Diciembre, 2016**

## **CRÉDITOS**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables (GBAER) del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional unidad Zacatenco (CINVESTAV-Zacantenco), con la dirección del Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo. El proyecto se realizó con el presupuesto institucional del CINVESTAV.

De este trabajo de tesis se obtuvieron dos trabajos que se presentaron en el congreso: una presentación oral con título “Enrichment of microbial cultures for using in the cathodic and anodic chambers of a biocathode microbial fuel cell” y una presentación de cartel con título “A very low-cost method for monitoring electric potential in microbial fuel cells”. Que se presentaron en el “The Fifth International Symposium of Environmental Biotechnology and Engineering” (5ISEBE) en Buenos Aires, Argentina del 25 al 29 de Julio del 2016.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CINVESTAV, donde pude realizar mi proyecto de tesis teniendo todo lo necesario. Además de los apoyos para congreso y titulación sin los cuales no hubiera sido todo posible.

Al Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo, que dirigió este proyecto, por la dirección adecuada y su vocación a transferir conocimientos en todos los aspectos que engloba la investigación.

Al GBAER donde realicé mi trabajo de tesis y a su personal: M en C Rafael Hernández Vera, por su disposición a ayudar cuando fuera necesario y al Lic. David Portilla y la Ing. María Teresa Sánchez por su ayuda y mantener operacional el laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial, que sus aportes forman parte de este proyecto.

Al laboratorio de Genética microbiana y sus miembros por permitirme realizar parte del trabajo experimental en él.

Al laboratorio de Hidrógeno y Celdas de combustible, y a su auxiliar I.Q Sebastián Citalán Cigarroa por su ayuda en cuestiones electroquímicas.

A mi familia y a Jessica, que sin su amor y apoyo incondicional probablemente esto no hubiera sido posible, y su respaldo siempre inspira a seguir adelante.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda, y que hicieron mi estancia más placentera.

A mis compañeros de generación por compartir de manera amena esta etapa.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pag</b>
ÍNDICE .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
NOTACIÓN .....	x
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
I INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
1.1 Sistemas bioelectroquímicos .....	4
1.2 Celda microbiana de combustible .....	4
1.3 Biocátodo .....	6
1.4 Reducción de compuestos orgánicos clorados en el biocátodo .....	8
1.5 Tetracloruro de carbono.....	13
1.6 Nitrato .....	17
II JUSTIFICACIÓN .....	19
III HIPÓTESIS .....	20
3.1 Hipótesis general .....	20
3.2 Hipótesis específicas .....	20
IV OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos específicos .....	21
V METODOLOGÍA .....	22
5.1 Plan de trabajo.....	22
5.2 ETAPA 1 .....	25
5.2.1 Actividad 1. Diseño y construcción de una CCM equipada con biocátodo y un electrodo de referencia.....	25
5.2.1.2 Diseño experimental .....	25
5.3 ETAPA 2 .....	26
5.3.1 Actividad 2a. Obtención de cultivos frescos y preparación de cultivos mixtos .....	26
5.3.2 Actividad 2b. Reactores inoculadores.....	27
5.3.2.1b Nitratos .....	31

5.3.2.1c Demanda Química de Oxígeno (DQO) .....	33
5.3.3 Actividad 3. Enriquecimiento de los cultivos electroquímicamente activos .	35
5.3.3.1 Enriquecimiento del cultivo del bioánodo.....	36
5.3.3.2 Enriquecimiento del cultivo del biocátodo .....	38
5.3.3.3 Lectura de Fe <sup>+2</sup> con técnica de FerroZine .....	40
5.3.4 Actividad 4. Ensayo bioelectroquímico de cultivos enriquecidos en-celda .	42
5.3.4.1 Monitoreo de voltaje .....	43
5.4 Actividad 5. Aclimatación de los cultivos a tetracloruro de carbono .....	46
5.5 ETAPA 3.....	47
5.5.1 Elección de inóculos .....	47
5.5.2 Actividad 5. Operación, monitoreo y evaluación de las CCM con las diferentes configuraciones de operación en la remoción de tetracloruro de carbono en celda. ....	49
5.5.3a Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 1.....	51
5.5.3b Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 2.....	52
5.5.3c Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 3.....	52
5.5.3d Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 4.....	52
5.5.3e Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 5.....	52
5.5.3f Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 6.....	52
5.5.3.1 Técnicas .....	53
5.5.3.1a Curva de Polarización.....	53
5.5.3.1b Cromatografía de gases .....	53
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	55
6.1 Actividad 1. Diseño y construcción de una CCM equipada con biocátodo y un electrodo de referencia. ....	55
6.1.1 Construcción del electrodo de referencia .....	56
6.2 Actividad 2a. Obtención de inóculos y preparación de cultivos mixtos. ....	57
6.3 Actividad 2b. Reactores inoculadores.....	57

6.3.1 pH y alcalinidad .....	59
6.3.2 Nitratos .....	60
6.3.4 Demanda química de oxígeno .....	62
6.4 Actividad 3. Enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas .....	63
6.5 Actividad 4. Operación en celda con cultivos enriquecidos .....	68
6.5.1 Validación de monitoreo de voltaje con Arduino UNO .....	68
6.5.2 Ensayo bioelectroquímico de cultivos enriquecidos en-celda.....	69
6.6 Actividad 5. Aclimatación de los cultivos enriquecidos BEA a tetracloruro de carbono.....	72
6.7 Actividad 6. Operación de celdas en presencia de tetracloruro de carbono .....	75
6.6.1 Desempeño electroquímico de las celdas en presencia de tetracloruro de carbono.....	75
6.6.2 Remoción de tetracloruro de carbono con las diferentes configuraciones de operación.....	76
Tabla 12. Resumen de remoción de TC y producción de otros compuestos. ....	81
VII CONCLUSIÓN.....	82
VIII PERSPECTIVAS .....	84
IX REFERENCIAS .....	85

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Pag</b>
<b>Figura 1.</b> Diagrama general de trabajo.....	22
<b>Figura 2.</b> Línea de vida del cultivo anódico. ....	23
<b>Figura 3.</b> Línea de vida del cultivo catódico.....	24
<b>Figura 4.</b> Estructura de FerroZine. ....	41
<b>Figura 5.</b> Esquema de las configuraciones de celda utilizadas en el ensayo bioelectroquímico de los cultivos enriquecidos, junto a la resistencia externa utilizada durante el periodo III. ....	43
<b>Figura 6.</b> Monitoreo de voltaje al momento de la re-inoculación. ....	48
<b>Figura 7.</b> Diferentes configuraciones de operación.. ....	50
<b>Figura 8.</b> Esquema de forma y dimensión de la celda.....	55
<b>Figura 9.</b> Celda de doble cámara finalizada. ....	56
<b>Figura 10.</b> Electrodo de referencia Ag/AgCl. ....	57
<b>Figura 11.</b> Reactores inoculadores.....	58
<b>Figura 12.</b> Seguimiento del pH y la alcalinidad para ambos reactores inoculadores.	59
<b>Figura 13.</b> Monitoreo de eficiencia de remoción de nitratos en reactor inoculador desnitrificante. ....	61
<b>Figura 14.</b> Eficiencia de remoción de sulfatos en reactor inoculador SR.. ....	61
<b>Figura 15.</b> Eficiencia de remoción de DQO en ambos reactores inoculadores. ....	62
<b>Figura 16.</b> Resumen de pases de enriquecimiento anódico.....	64
<b>Figura 17.</b> Resumen de pases de enriquecimiento catódico sin fuente de carbono..	66
<b>Figura 18.</b> Resumen de pases de enriquecimiento catódico con fuente de carbono.	67
<b>Figura 19.</b> Voltaje medido con Arduino UNO vs multímetro ESCORT 3146A.....	68
<b>Figura 20.</b> Voltaje durante los tres periodos.....	69

<b>Figura 21.</b> Seguimiento de remoción de TC y evolución de Fe (II) en el pase 3 de aclimatación de BA. ....	73
<b>Figura 22.</b> Seguimiento de remoción de TC y evolución de Fe (II) en el pase 3 de la aclimatación de BC. ....	74
<b>Figura 23.</b> Voltaje de las configuraciones 1, 2, 3 y 4 en la operación en presencia de TC. ....	76

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>Pag</b>
<b>Tabla 1.</b> Antecedentes biocátodos en la remoción de compuestos orgánicos clorados.	10
<b>Tabla 2.</b> Antecedentes de biotratamientos utilizados en la remediación de tetracloruro de carbono.	15
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio de alimentación para el reactor inoculador sulfato reductor.	28
<b>Tabla 4.</b> Plan de monitoreo para el reactor sulfato reductor.	28
<b>Tabla 5.</b> Composición de la alimentación del reactor inoculador desnitrificante	28
<b>Tabla 6.</b> Plan de monitoreo para el reactor inoculador desnitrificante.	29
<b>Tabla 7.</b> Composición de medio base para la operación en celda	51
<b>Tabla 8.</b> Índice de enriquecimiento en cada pase en enriquecimiento catódico y anódico.	63
<b>Tabla 9.</b> Parámetros eléctricos de las tres celdas durante los tres periodos	70
<b>Tabla 10.</b> Resumen de la remoción de TC durante todos los pases de viales.	75
<b>Tabla 11.</b> Concentración de tetracloruro de carbono y cloroformo durante seis días de operación para las diferentes configuraciones de operación, en mg/L.	78
<b>Tabla 12.</b> Resumen de remoción de TC y producción de otros compuestos	81

## NOTACIÓN

<b>BA</b>	Cultivo anódico enriquecido
<b>BATC</b>	Cultivo anódico enriquecido y aclimatado a TC
<b>BC</b>	Cultivo catódico enriquecido
<b>BCTC</b>	Cultivo catódico enriquecido y aclimatado a TC
<b>BEA</b>	Bacteria electroquímicamente activa
<b>BES</b>	Sistema bioelectroquímica (por sus siglas en inglés)
<b>BEA</b>	Celda bioelectroquímica (por sus siglas en inglés)
<b>CCM</b>	Celda de combustible microbiana
<b>CEM</b>	Celda de electrólisis microbiana
<b>COC</b>	Compuesto orgánico clorado
<b>CV</b>	Voltamperometría Cíclica
<b>CF</b>	Cloroformo
<b>DN</b>	Cultivo desnitrificante
<b>SR</b>	Cultivo sulfato-reductor
<b>TC</b>	Tetracloruro de carbono
<b>TEE</b>	Transferencia extracelular de electrones

## RESUMEN

La celda microbiana de combustible (*CCM*) es una tecnología versátil que ha sido ampliamente estudiada en los últimos años debido a su capacidad de utilizar el metabolismo microbiano para el tratamiento de efluentes contaminados y la generación de electricidad simultáneamente. A pesar de su amplio estudio, la implementación de los biocátodos en las *CCM* ha sido poco abordada.

En el tratamiento de efluentes contaminados, los biocátodos han sido utilizados en la remoción de compuestos organoclorados, entre los cuales se encuentran contaminantes xenobióticos importantes.

El tetracloruro de carbono (TC) es un compuesto que a pesar de que su uso fue discontinuado hace décadas por sus propiedades tóxicas, en los últimos años se le ha incluido en numerosas patentes que pueden indicar un resurgimiento del compuesto.

En este trabajo se utilizó una *CCM* de doble cámara con cultivos enriquecidos electroquímicamente y aclimatados a TC para evaluar su remoción en condiciones reductivas electroquímicamente asistidas. Pese a que los cultivos se vieron afectados por la etapa de aclimatación a TC, en las pruebas en celda con una concentración inicial de TC de 10 mg/L se alcanzó una  $\eta_{TC}$  en biocátodo aclimatado de 65% / d con poca producción de cloroformo, mientras que el bioánodo logró un 62% / d con 76% de transformación a cloroformo. Con los resultados obtenidos, la aplicación de biocátodos en *CCM* para la remoción de TC supera desempeño tecnologías tradicionales como la digestión anaerobia. Sin embargo, una mejoría del biocátodo por las etapas de enriquecimiento y aclimatación del no fue definitiva.

## ABSTRACT

The Microbial fuel cell is versatile technologies widely studied in past years due to its capacity to utilize the microbial metabolism for the treatment of contaminated effluents and electricity generation simultaneously.

Even with the wide study on MFC, the implementation of biocathode in microbial fuel cells has been less approached.

On the treatment of contaminated effluents, biocathodes were used in the removal of organochlorides, some of them being important xenobiotic contaminants.

Carbon tetrachloride is an organochloride that, although it was banned some decades ago, numerous patents have been reported in recent years so the reappearance is possible.

This work consisted in the use of a double chamber MFC with bioelectrochemically enriched and acclimated cultures to evaluate the removal of TC in electrochemically assisted reductive conditions. Even with the bad performance in the acclimation stage, in the in-cell test with 10 mg/L as initial *TC* concentration, the biocathode achieved a  $\eta_{TC}$  of 65% / d with minor chloroform production, while the bioanode chamber achieved 62% / d  $\eta_{TC}$  with 76% of transformation to chloroform. With these results, the application of biocathode in *MFC* for the removal of *TC* surpass the performance of traditional technologies like anaerobic digestion. Nevertheless, the improvement of the biocathode performance with the enrichment and acclimation stages was not definitive.

## I INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Pese a que los combustibles fósiles han tenido un papel importante en el desarrollo de la civilización en el último siglo, su sobreexplotación ha generado problemas en las últimas décadas, como lo son la escasez de su suministro, la dependencia energética y económica global, así como las consecuencias ambientales de su uso excesivo. Estos problemas hacen patente que la implementación de energías alternativas es urgente (Du et al., 2007). En este tema el consenso general es que el suministro de energía alternativa no será por solo una fuente, y múltiples tecnologías tales como solar, eólica, nuclear o bioenergías jugarán un papel importante (Zhou et al., 2013).

Entre las diferentes tecnologías de bioenergía, la celda de combustible microbiana (CCM) ha llamado la atención debido a su capacidad de producir electricidad a partir de desechos y biomasa renovable (Franks & Nevin, 2010). El descubrimiento de que las bacterias pueden producir electricidad mientras degradan biomasa y compuestos orgánicos, ha llevado a un creciente interés en el campo de las celdas de combustible microbianas (Revelo et al., 2013). El utilizar el metabolismo microbiano como catalizador de reacciones electroquímicas permite que estos sistemas bioelectroquímicos sean altamente versátiles en la diversidad de sustratos que pueden aprovechar en la generación de energía (Franks & Nevin 2010). El aspecto de sustentabilidad es otra ventaja de la tecnología, ya que al utilizar materia orgánica de desecho aportan doble funcionalidad: la generación de energía eléctrica y disminuir el impacto ambiental de materia orgánica dispuesta en distintos cuerpos de agua. Esto se ha aprovechado en estudios para tratar

efluentes de desecho industriales o municipales (Ma *et al.*, 2014; Vázquez-Larios *et al.*, 2014)

### **1.1 Sistemas bioelectroquímicos**

Los sistemas bioelectroquímicos (*BES*) son dispositivos que utilizan un agente biológico (microbiano o enzimático) para catalizar una reacción electroquímica (Sharma & Kundu, 2010). Dichos sistemas han sido ampliamente estudiados en los últimos años debido a su diversidad de aplicaciones potenciales, como el tratamiento de agua, desalinización y la bioelectrosíntesis (Zhen *et al.*, 2015; Kokabian & Gude, 2015; Saeed *et al.*, 2015; Kalathil *et al.*, 2013). Las distintas configuraciones de los sistemas bioelectroquímicos pueden ser clasificados en dos tipos: (i) celda de combustible microbiana (*CCM*), donde el objetivo es la producción de electricidad, utilizando los potenciales obtenidos espontáneamente entre ánodo y cátodo; y (ii) celda de electrólisis microbiana (*CEM*), en la cual las reacciones se llevan a cabo con la aplicación de una corriente o un voltaje inducido artificialmente (Liu *et al.*, 2013).

### **1.2 Celda microbiana de combustible**

El *BES* más estudiado con propósito de remediación es la celda de combustible microbiana. La tecnología de la *CCM* ha atraído considerable investigación y atención pública debido a su doble funcionalidad, que permite la remediación de efluentes contaminados al mismo tiempo que se obtiene una producción de energía eléctrica (Pant *et al.*, 2010). Durante la última década, se han logrado grandes avances en cuanto al entendimiento de las reacciones biológicas en estos sistemas y en la ingeniería y arquitectura de la celda, materiales y química de las soluciones. Se

ha logrado, en la década de intenso estudio, un incremento en la producción de energía de 5 a 6 órdenes de magnitud, con diseños produciendo más de 1 kW/m<sup>3</sup> (Huang *et al.*, 2011).

La mayoría de los estudios sobre la tecnología de *CCM* se realizaron con celda típica o convencional. En estas celdas, la materia orgánica se degrada u oxida en la cámara anódica por medio del metabolismo de los microorganismos del bioánodo, en este proceso se obtienen o “cosechan” electrones y al no contar con un aceptor de electrones final en la cámara anódica, los electrones dejan la célula por una serie de sistemas enzimáticos y son transferidos extracelularmente al ánodo sólido, de esta manera los electrones colectados en el ánodo se transportan de manera externa hacia la cámara catódica, donde los electrones junto con los protones transferidos a través de la membrana de intercambio protónico completan la reacción con la reducción del oxígeno, esta reacciones catalizada por un catalizador metálico nanométrico, comúnmente platino, produciendo agua (Logan, 2007). Las *CCM* convencionales han sido estudiadas con una amplia variedad de sustratos, utilizando tanto compuestos puros como aguas de desecho con alta cantidad de materia orgánica (Pant *et al.*, 2010).

Una alternativa a las *CCM* convencionales son las celdas equipadas con biocátodo. La implementación de un biocátodo aporta varias ventajas a una *CCM*: primero, reduce los costos de construcción y mantenimiento de la celda, al eliminar la necesidad de un catalizador metálico altamente costoso, y lo sustituye por materiales de bajo costo, como el grafito, y por un cultivo biocatalítico (Rozendal *et al.*, 2008); y segundo, el biocátodo aporta una capacidad reductiva que puede ser aprovechada

para reducir distintos aceptores de electrones, con esto se abren distintas oportunidades en el tratamiento de efluentes (He & Angenent, 2006).

### 1.3 Biocátodo

El cátodo microbiano, llamado biocátodo, utiliza bacterias como biocatalizadores para aceptar electrones del sustrato, proporciona una alternativa a los típicos catalizadores abióticos de reducción de oxígeno que incrementa la viabilidad económica y sustentabilidad de la CCM. Además, los biocátodos permiten el uso de diversos aceptores de electrones, lo que puede ampliar las utilidades de las CCM reducción de compuestos oxidados y las posibilidades de aprovechar la corriente eléctrica para la conversión biocatalizada de productos de valor agregado (Huang *et al.*, 2011).

Entre los aceptores finales de electrones, se pueden incluir xenobióticos biodegradables como los compuestos orgánicos clorados (COC) como tratamiento para su bioremediación. Se ha demostrado que en los sistemas BES, tanto el ánodo como el cátodo tienen capacidad de reducir los compuestos clorados (Kong *et al.*, 2014). Los estudios sobre la tecnología de biocátodo iniciaron con la premisa de que si cultivos microbianos eran capaces de utilizar electrodos sólidos como aceptores de electrones mediante la transferencia extracelular de electrones, análogamente, poseían de igual manera la capacidad de tomar electrones provenientes de un electrodo sólido. Liu *et al.*, (2005), en uno de los primeros trabajos reportados con biocátodo, utilizaron un voltaje aplicado para asistir la bioelectrosíntesis de hidrógeno. Clauwaert *et al.*, (2007) reportaron por primera vez el funcionamiento de una CCM con ánodo y cátodo catalizados biológicamente, utilizando nitrato como

aceptor de electrones del biocátodo. En el mismo año, se empezaron a realizar estudios utilizando el biocátodo en la reducción de compuestos orgánicos clorados como el percloroetileno (Aulenta *et al.*, 2007) y el perclorato (Thrash *et al.*, 2007). Recientemente se ha visto el potencial de los sistemas bioelectroquímicos (*BES*) para ser aplicados en la biorremediación de suelos y agua. La idea de utilizar electrodos y sistemas electroquímicos para la reducción biológica es que la transferencia de electrones puede ser continuamente monitoreada/controlada en términos de corriente y potencial sin la necesidad de adición de químicos lo que elimina el transporte, almacenamiento, dosificación y post-tratamiento, además, como los microorganismos responsables de la biodegradación pueden crecer sobre el electrodo o en su cercanía, se espera un uso efectivo de los electrones suministrados (Aulenta *et al.*, 2010).

En estudios realizados hasta la fecha, se ha reportado que la degradación de compuestos clorados por biocátodo supera a los tratamientos con cátodo abiótico (Aulenta *et al.*, 2008).

En comparación con el bioánodo, los estudios con biocátodos son limitados, aun así, ya se han reportado estudios sobre los mecanismos de transferencia de electrones (Huang *et al.*, 2011; Rosenbaum *et al.*, 2011) y distintas aplicaciones con *CCM* y *CEM* (Jafary *et al.*, 2015; Gurung & Oh, 2012). Se han reportado varios contaminantes tratados con biocátodo, entre ellos se pueden mencionar el nitrato (Clauwaert *et al.*, 2007; Pous *et al.*, 2013), y diversos compuestos orgánicos clorados como el tricloroetileno (Aulenta *et al.*, 2010) y diferentes clorofenoles (Huang *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2014).

#### 1.4 Reducción de compuestos orgánicos clorados en el biocátodo

Pese a que ambas cámaras tienen capacidad de reducir compuestos clorados, debido al papel de la cámara anódica de producir electrones, los estudios se han enfocado en la reducción por parte del biocátodo, donde la reacción lenta ha sido el cuello de botella para el desarrollo de los *BES* (Liu et al. 2014).

La biorremediación de los compuestos orgánicos clorados ha sido material de estudio debido principalmente a sus propiedades cancerígenas y su persistencia en el ambiente. Entre las dificultades que presentan sus biotratamientos se encuentra el hecho que la presencia de cloro incrementa la toxicidad para los microorganismos, por lo que el desafío principal en su biorremediación es la descloración. Los sistemas bioelectroquímicos son una opción prometedora para una exitosa descloración de *COC* (Kong et al., 2014).

La descloración llevada a cabo en el cátodo de un sistema bioelectroquímico, a veces llamada *BEARD* (descloración reductiva bioelectroquímicamente asistida, por sus siglas en ingles), es un tipo de respiración anaerobia donde el compuesto clorado es utilizado como aceptor final de electrones por un cultivo microbiano y los electrones son suministrados por un cátodo para una reacción electroquímica biocatalizada (Aulenta et al., 2007).

En la Tabla 1 se muestra el resumen de los trabajos que involucran la tecnología de biocátodo en la remoción de compuestos clorados de efluentes contaminados. Podemos apreciar en la Tabla 1 el abanico de *COC* tratados hasta el momento, que incluye compuestos como el percloroetileno (Strycharz et al., 2008), el perclorato (Butler et al., 2010; Shea et al., 2008; Thrash et al., 2007), distintos clorofenoles (Liu et al., 2013; Zhang et al., 2014; Kong et al., 2014),

cloronitrobenzeno (Zhu et al. 2014; Guo et al. 2015), cloranfenicol (Liang et al. 2013), entre otros.

La mayoría de los estudios de descloración reductiva realizado en operación de (*CEM*), donde si bien han obtenido buenos resultados de eficiencia de remoción de *COC* en tiempos cortos. Sin embargo, todavía se trabaja para obtener mejores eficiencias energéticas, ya que, aunque el biocátodo reduce de gran manera el sobrepotencial de las reacciones, se promueven también reacciones secundarias como la reacción de evolución de hidrógeno y la metanogénesis (Clauwaert & Verstraete, 2009; Aulenta *et al.*, 2008; Jafary *et al.*, 2015).

Al contrario de *CEM*, los estudios de deshalogenación en operación *CCM* son limitados. El primer biocátodo utilizado para la descloración en *CCM* fue reportado por Shea *et al.* (2008), quienes trataron un efluente con 20 mg/L perclorato como aceptor de electrones, logrando una eficiencia de remoción de perclorato de 50% con 1 mg/L de nitrato. Butler *et al.* (2010) observaron que la remoción de perclorato se ve favorecida a pH ligeramente alcalinos al aumentar la eficiencia de remoción de 39 % con pH 7 a 97 % con pH de 8.5. Mieseler *et al.* (2013) utilizaron un cultivo aclimatado a perclorato para tratar una concentración de 203 mg/L de perclorato, logrando una eficiencia de remoción de 37 % en 21 días. Son necesarios más estudios para tener más información sobre la interacción entre diferentes contaminantes y los electrones. Además, son pocos los estudios en los que se aproveche simultáneamente la capacidad de reducción del bioánodo y se implemente una biodegradación en ambas cámaras.

**Tabla 1.** Antecedentes sobre el uso de biocátodos en la remoción de compuestos orgánicos clorados.

BES	Cultivo de biocátodo	Mediador	Potencial de cátodo (mV)	Compuesto clorado	Concentración de COC	Eficiencia de remoción	Referencia
CEM	Cultivo mixto, 30 % <i>dehalococcoides spp.</i>	Metil viológeno	-500 (vs ESH)	tricloroetileno	8.76 mg/L	76 % en 13 d	Aulenta <i>et al.</i> , 2007
CEM	Cepa VDY, cercano a <i>dechlorospirillum</i>	2,6-antraquina disulfonato (AQDS)	-500 (vs ESH)	Perclorato	275 mg/L	100% en 6 d	Thrash <i>et al.</i> , 2007
CEM	Cultivo mixto. <i>Dehalococcoides spp.</i> Y <i>Desulfitobacterium</i>	Metil viológeno	-450 (vs ESH)	tricloroetileno	65.7 mg/L (0.5 mM)	127 $\mu\text{mol/d}$	Aulenta, Canosa, <i>et al.</i> , 2008
CEM	<i>Dehalococcoides spp.</i> Aclimatado a contaminante	-	-850 (vs Ag/AgCl)	tricloroetileno	20.5 mg/L	3.73 $\pm$ 0.02 $\mu\text{eq/h}$ vs 0.33 $\pm$ 0.01 $\mu\text{eq/h}$ abiótico	Aulenta <i>et al.</i> , 2008
CCM	Cultivo mixto desnitrificante	-	-	Perclorato	20 mg/L	12 mg/L d	Shea <i>et al.</i> , 2008
CEM	<i>Geobacter lovleyi</i>	-	-300 (vs ESH)	percloroetileno	16.8 mg/L	90 % en 90 h	Strycharz <i>et al.</i> , 2008
CEM	<i>Desulfitobacterium spp.</i>	Metil viológeno	-450 (vs ESH)	tricloroetileno	19.71 mg/L (0.15 mM)	5.3 $\mu\text{eq/L h}$	Aulenta <i>et al.</i> , 2009
CCM	Cultivo mixto desnitrificante, aclimatado a contaminante	-	-	Perclorato	20 mg/L	24 mg d <sup>-1</sup>	Butler <i>et al.</i> , 2010
CEM	Cultivo mixto, aclimatado a contaminante	-	-550 (vs ESH)	tricloroetileno	31.15 mg/L	64 % en 4 d	Aulenta <i>et al.</i> , 2010

CEM	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	-	-300 (vs ESH)	2-Clorofenol	80 $\mu$ M	86 % en 6 d	Strycharz <i>et al.</i> , 2010
CEM	Cultivo mixto aclimatado a contaminante	-	-250 (vs ESH)	tricloroetileno	5.6 mg/L	60.3%, 15.5 $\mu$ M d <sup>-1</sup>	Aulenta <i>et al.</i> , 2011
CEM	<i>Pseudomonas, Dechloromonas denitrificans</i>	-	-500 (vs ESH)	Cloranfenicol	32 mg/L	87 % en 4 h	Liang <i>et al.</i> , 2013
CEM	Cultivo mixto, <i>Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes</i> phyla	-	-400 (vs ESH)	Pentaclorofenol	58 mg/L	86 % en 90 h	Liu <i>et al.</i> , 2013
CCM	Cultivo mixto	-	-	Perclorato	203 mg/L	37.3 % en 21 d	Mieseler <i>et al.</i> , 2013
CEM	Cultivo mixto aclimatado a contaminante <i>Dehalobacter, Geobacter y Sulfurospirillum</i>	-	-540 (vs ESH)	Ácido 2,4-diclorofenoxiacetico	80 mg/L	94.4 % en 10 h	Zhang <i>et al.</i> , 2013
CEM	Cultivo mixto	-	500 potencial de celda	4-clorofenol	100 mg/L	98.01 % en 144 h	Kong <i>et al.</i> , 2014
CEM	Cultivo mixto aclimatado a contaminante	-	-500 (vs ESH)	Perclorato	0.70 mM	100 % en 4.5 d	Xie <i>et al.</i> , 2014
CEM	Cultivo mixto aclimatado a contaminante, <i>Dehalobacter</i> and <i>Desulfovibrio</i>	Humín	-500 (vs ESH)	pentaclorofenol	20 $\mu$ M	100 % en 6 d	Zhang <i>et al.</i> , 2014
CEM	Cultivo mixto aclimatado a contaminante	-	500 (potencial de celda)	p-cloronitrobenzeno	60 mg/L d	0.328 h <sup>-1</sup>	Zhu <i>et al.</i> , 2014

CEM	Cultivo mixto aclimatado a contaminante	-	500 (potencial de celda)	4-cloronitrobenzeno	20 mg/L	not reported	Guo <i>et al.</i> , 2015
CEM	Cultivo mixto aclimatado a contaminante , <i>Azospiraoryzae</i>	-	-400 (vs ESH)	Perclorato	49 mg/L	90 % in 60 h	Li <i>et al.</i> , 2015

---

\*BES: sistema bioelectroquímico; CEM: celda de electrólisis microbiana; CCM: celda de combustible microbiana; COC: compuesto organoclorado; EEH: electrodo estándar de hidrógeno.

## 1.5 Tetracloruro de carbono

El tetracloruro de carbono (tetraclorometano,  $\text{CCl}_4$ , TC), es un solvente clorado volátil, con propiedades biocidas, que se ha usado ampliamente en el pasado como desengrasante industrial, pesticida, para lavado en seco y en extinguidores de fuego, también fue ampliamente usado como removedor de manchas doméstico y propelente de aerosoles (Faroon 2005). Debido a su toxicidad y potencial carcinogénico la producción y uso comercial ha sido restringido progresivamente. Su uso como pesticida y fumigante de granos se prohibió en 1986, y de acuerdo al protocolo de Montreal y sus cuatro enmiendas se implementó una eliminación total del uso de TC para países desarrollados en 1996 y para países en desarrollo en el 2010 (UNEP, 2006). Actualmente el TC sigue en producción, aunque su uso se ha limitado a intermediario en la producción de otros compuestos químicos.

Con una vida media para su hidrólisis abiótica de 7000 años en agua, el TC es más persistente en el ambiente comparado con otros compuestos alifáticos clorados. Además su baja solubilidad en agua hace que se acumule en acuíferos en forma de una densa fase líquida no acuosa (*DNAPL*) de baja biodisponibilidad, que se disuelve lentamente en el agua subterránea (Faris and Team, 2002) .

La toxicidad del TC afecta también a microorganismos. La exposición de bacterias a TC ha mostrado que causa inhibición de una variedad de procesos metabólicos, como la metanogénesis y autotrofía, aún a concentraciones bajas de 3 y 80  $\mu\text{M}$  respectivamente (Penny et al. 2010). Se cree que afecta la metanogénesis por inhibición competitiva de algunas reacciones enzimáticas o por interacción con cofactores de la ruta metabólica (Zhao et al., 2009). Por sus propiedades lipofílicas con coeficiente de partición octanol/agua alto, el TC puede alterar la permeabilidad

de la membrana celular eliminando funciones importantes, como la disipación del potencial de membrana y la pérdida de componentes celulares (Sikkema et al. 1995).

En la Tabla 2 se muestra una compilación de biotratamientos en la remoción de TC, se puede observar que la mayoría de estudios se ha llevado a cabo un digestión anaerobia. Hasta el momento, la degradación solo se ha reportado en condiciones reductoras, que concuerda con la naturaleza oxidada del carbono en la molécula. Las condiciones de cultivo reportadas cubren un amplio rango, incluyen sulfato-reductoras, nitrato-reductoras, fierro-reductoras, fermentativas y metanogénicas (Boopathy 2002).

Se ha reportado que la reducción de TC se puede llevar a cabo por varios mecanismos: en co-metabolismo, donde no está acoplada a la línea de generación de energía y ocurre de manera fortuita al interactuar con ciertas enzimas o coenzimas (Holliger & Schumacher 1994). De igual manera se ha reportado que la transformación cometabólica no ocurre cuando un aceptor de electrones principal no está presente (de Best et al. 1998). Otro mecanismo es la deshalorespiración, donde el compuesto clorado es utilizado directamente como el aceptor final de electrones, y solo es necesario un donador de electrones (Picardal et al. 1995). También se ha propuesto una deshalogenación fermentativa, que es un proceso que se lleva a cabo en ausencia de un aceptor de electrones agregado externamente y con reacciones de oxidación-reducción internas. Este mecanismo solo se ha reportado para diclorometano y clorometano (De Best et al. 1999).

**Tabla 2.** Antecedentes de biotratamientos utilizados en la remediación de tetracloruro de carbono.

Método	Cultivo microbiano	Concentración de TC inicial	Eficiencia de remoción	Referencia
Digestión anaerobia	Cultivo mixto desnitrificante	0.06 mg/L	99% en 6 semanas	(Bower et al. 1983)
Digestión anaerobia	<i>Pseudomonas sp.</i> , condiciones desnitrificantes	0.200 mg/L	99.2% en 2 d	(Criddle et al. 1990)
Digestión anaerobia	Cultivo mixto anaerobio	0.1 mg/L	99% en 70 d	(Doong et al. 1997)
Reactor de lecho empacado de flujo ascendente	Cultivo mixto en condiciones sulfato reductoras	4.55 mg/L	100 %	(de Best et al. 1998)
Digestión anaerobia	<i>Shewanella putrefaciens</i> con suelos altos en fuente de carbono	3 mg/L	64% en 33 h	(Collins & Picardal 1999)
Reactor de lecho empacado de flujo ascendente	Cultivo mixto anaerobio, sin donador de electrones	5.76 mg/L	80 %	(De Best et al. 1999)
Digestión anaerobia	Cultivo mixto con diferentes condiciones de cultivo, sulfato reductor, desnitrificante, hierro reductor, fermentativo, aceptores mixtos	0.3 mg/L	100% en 12 d para aceptores mixtos, 16 d metanogénico, 20 d para hierro reductor y fermentativo y 22 d para sulfato reductor, desnitrificante alcanzo 45 %	(Boopathy 2002)

## EF a 25 d

Reactor anaerobio de flujo ascendente	Cultivo metanogenico	15.4 mg/L	60 % EF en 12 d sin AQDS, y 100 % EF con 50 AQDS $\mu\text{M}$	(Cervantes et al. 2004)
Microcosmos	Cultivo mixto sulfato reductor	8.8 mg/L y 500 mg L CF	100% 500 d	(Shan et al. 2010)
Microcosmos	Batch con <i>D. vulgaris</i> con Fe(III) y vitamina B12	1.53 mg/L	100% en menos de 24 h con presencia de vitamina B12, 100% en 18 días sin B12	(Koenig et al. 2012)
Acuiferos simulados	Mesocosmo anaeróbico bioestimulado con distintas fuentes de carbono	2 mg/L	94 % en 4 días, 99% 12 días	(Santharam et al. 2014)

---

En la búsqueda bibliográfica realizada para este trabajo y con la recopilación reportada por Penny et al. (2010), hasta la fecha, no se ha reportado la remoción de tetracloruro de carbono por descloración reductiva bioelectroquímicamente asistida (*BEARD*), por lo que se necesitan estudios en sistemas bioelectroquímicos para evaluar el efecto de la *BEARD* en la remoción de tetracloruro de carbono.

## 1.6 Nitrato

El nitrato es un contaminante común en aguas subterráneas debido causas antropogénicas como la agricultura intensiva y diferentes efluentes industriales, debido a que la mayoría de la población depende del agua subterránea para su suministro, la contaminación por nitrato se ha convertido en un problema mayor, y su tratamiento es parte del proceso estándar en muchas plantas de tratamiento de agua (Pous et al. 2013).

Distintas tecnologías son aplicadas a la remoción de nitratos de aguas subterráneas. La agencia de protección del medio ambiente de EUA (EPA, por sus siglas en inglés) solo considera métodos de separación como el intercambio iónico, la osmosis inversa y la electrodiálisis inversa como métodos efectivos para reducir nitrato a niveles potables aceptables. Sin embargo, estas tecnologías presentan algunas desventajas como los requerimientos energéticos y el hecho de ser de separación, no tratamiento (Pous et al. 2015).

La desnitrificación biológica ha sido ampliamente estudiada y es capaz de reducir el nitrato y sus otras formas menos oxidadas a  $N_2$  inerte. En los últimos años se ha propuesto la tecnología de las *CCM* para el tratamiento de aguas

contaminadas con nitrato, donde puede fungir como el aceptor de electrones final (Clauwaert *et al.*, 2007; Pous *et al.*, 2013).

## II JUSTIFICACIÓN

La capacidad de las celdas de combustible microbianas para producir electricidad por medio del metabolismo de bacterias electroquímicamente activas, las vuelve una interesante alternativa de producción de energía y remediación de efluentes contaminados. La implementación de un biocátodo puede aumentar la sustentabilidad del proceso y permitir la reducción de compuestos oxidados, como los son diversos tipos de contaminantes en cuerpos de agua.

En los estudios realizados hasta el momento con la tecnología de los biocátodos se han enfocado la reducción de un solo contaminante. La degradación simultánea de más de un contaminante hará más atractiva la tecnología de CCMs para el tratamiento de aguas. Además, hace falta observar si se aprovecha la capacidad oxidativa de la cámara anódica para la degradación de contaminantes.

El tetracloruro de carbono es un contaminante que pese a su prohibición de uso comercial no se ha podido eliminar su presencia en cuerpos de agua. El nitrato es contaminante de presencia común en acuíferos debido a su amplio uso en la agricultura.

Debido a lo anterior, se decidió evaluar la degradación de tetracloruro de carbono y nitrato, junto con la producción eléctrica, por parte de una celda de combustible microbiana equipada con biocátodo, en donde se operará el dispositivo con diferentes puntos de alimentación de TC (ánodo, cátodo y ambas cámaras).

### **III HIPÓTESIS**

#### **3.1 Hipótesis general**

Una CCM equipada con biocátodo es capaz de remover tetracloruro de carbono y nitrato simultánea y eficientemente de un efluente contaminado.

#### **3.2 Hipótesis específicas**

1. La adición de TC a la cámara anódica afectará negativamente variables electroquímicas como intensidad de corriente y voltaje.
2. La presencia de TC disminuirá la biodegradación de  $\text{NO}_3^-$ .

## **IV OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Construir, operar y evaluar una celda de combustible microbiana de doble cámara equipada con biocátodo en la bioremediación de tetracloruro de carbono y nitrato en diferentes configuraciones de operación.

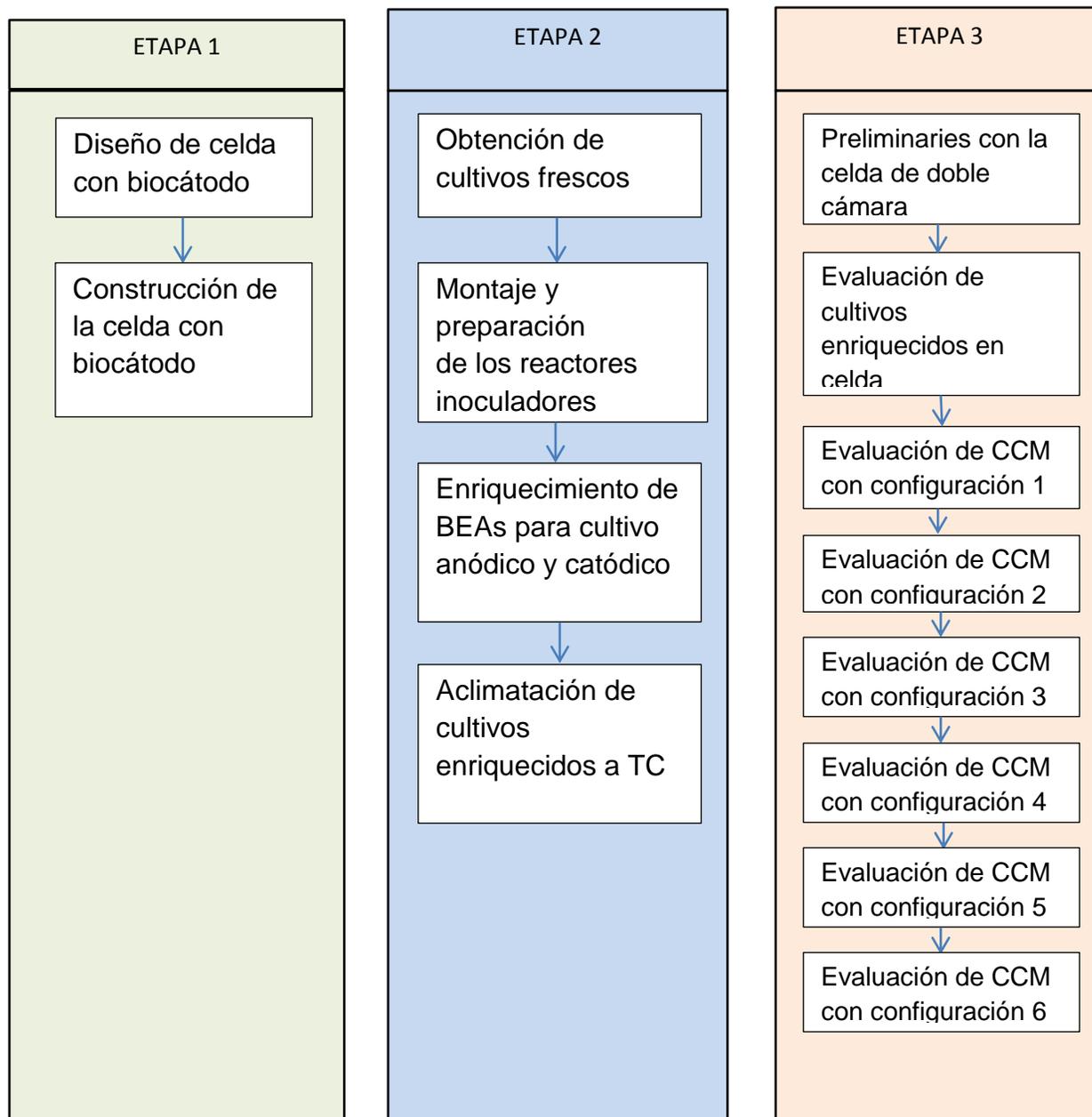
### **4.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar el desempeño electroquímico de la CCM al variar los puntos de alimentación de TC (ánodo, cátodo y ambas cámaras).
2. Analizar la remoción de nitrato (cátodo) y TC en sus diferentes puntos de alimentación (ánodo, cátodo y ambas cámaras).

## V METODOLOGÍA

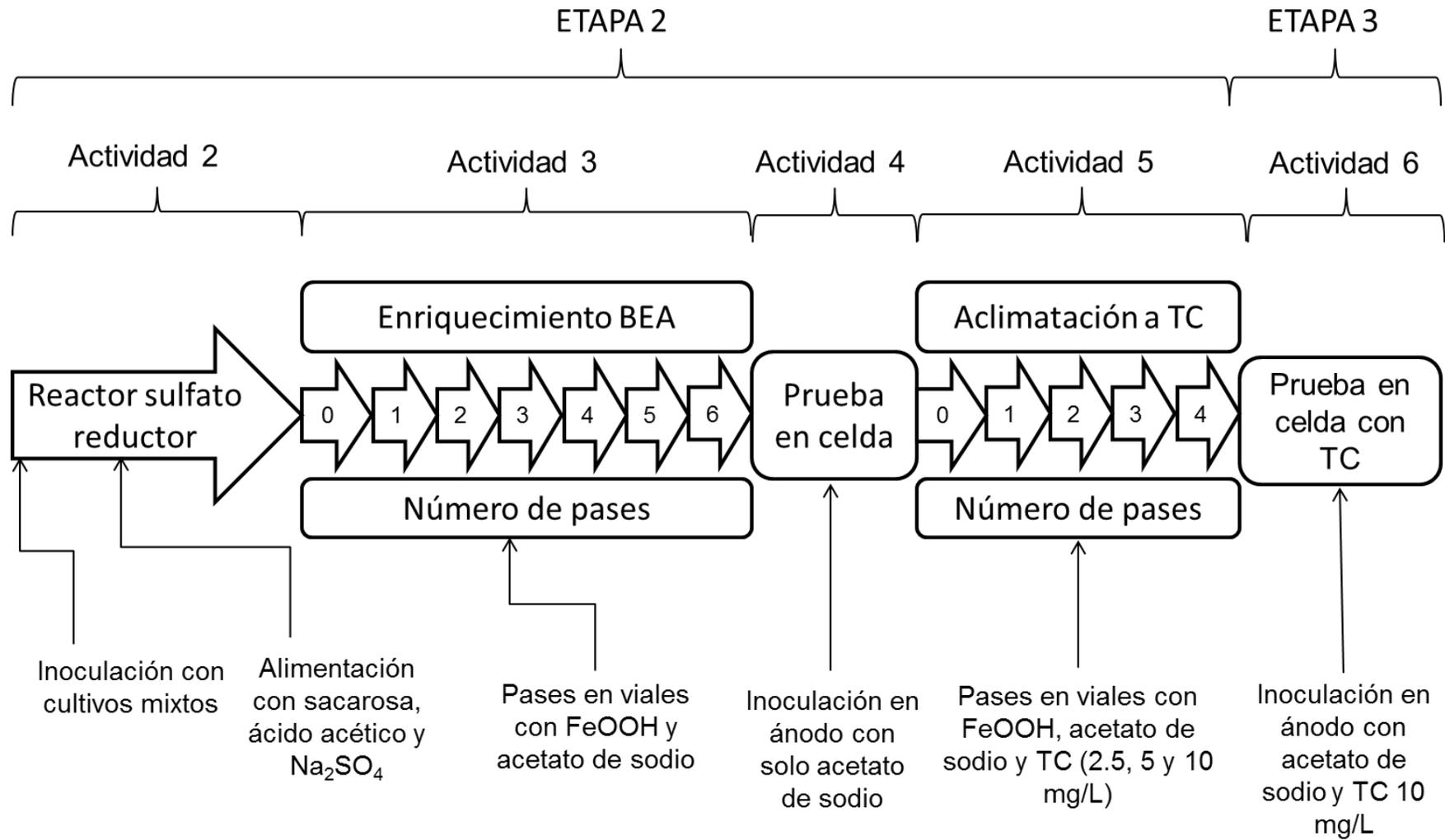
### 5.1 Plan de trabajo

El plan de trabajo se dividirá en tres etapas en las cuales se incluirán las diferentes actividades a realizar. Se ilustra en la Figura 1.

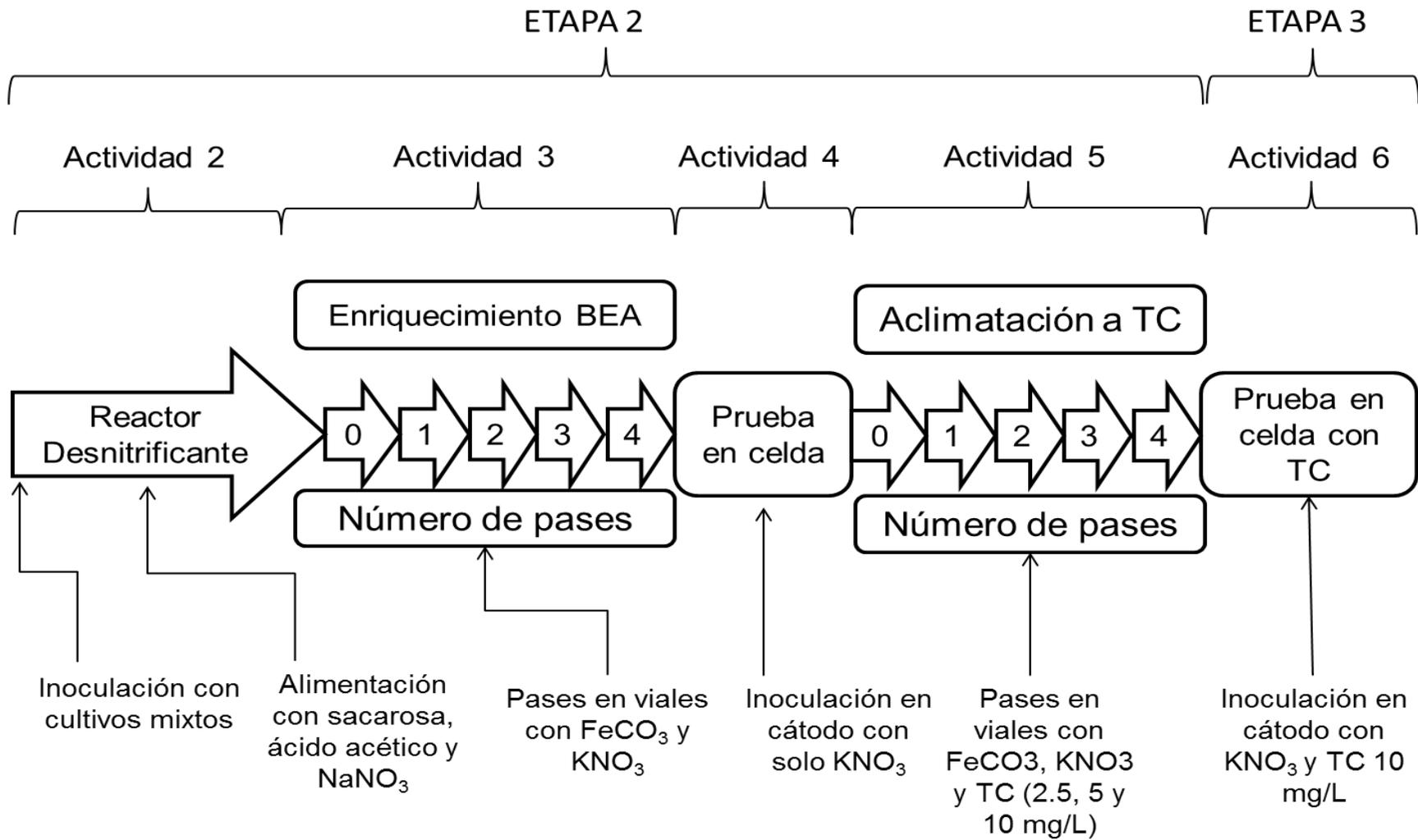


**Figura 1.** Diagrama general de trabajo

En las Figuras 2 y 3 se muestran las líneas de vida de los cultivos anódico y catódico.



**Figura 2.** Línea de vida del cultivo anódico.



**Figura 3.** Línea de vida del cultivo catódico.

## **5.2 ETAPA 1**

### **5.2.1 Actividad 1. Diseño y construcción de una CCM equipada con biocátodo y un electrodo de referencia.**

Diseñar y construir las CCM que se emplearán en el experimento con doble cámara para bioánodo y biocátodo. El electrodo de referencia servirá para hacer análisis de caracterización para electrodos independientes y no solo celda completa.

#### **5.2.1.2 Diseño experimental**

La celda que se construyó está basada en el diseño de Ortega-Martínez (2013) al que se le realizaron ciertas modificaciones. La celda fue construida en acrílico y consta de dos cámaras idénticas con las dimensiones de 3x3x3 cm (27 cm<sup>3</sup>). Se le adaptaron orificios en la parte superior para instalar barras de grafito de 5 mm de diámetro (Gioconda 6, KOH-I-NOOR®), entrada de alimentación con una conexión recta con una reducción 1/4" a 1/8", y un orificio para el electrodo de referencia, que será tapado con un tapón de hule cuando no esté instalado el electrodo de referencia. El interior de la celda se llenó con una cama de escamas de grafito con un volumen aproximado de 8 cm<sup>3</sup> un área de específica de 193 cm<sup>2</sup>. Las cámaras fueron separadas por una membrana de intercambio protónico (Nafion 117), evitando el contacto con el grafito por una placa perforada de acrílico.

La construcción de la celda se llevó a cabo en los talleres del CINVESTAV.

Se eligió el electrodo de referencia de Ag/AgCl. Para esto, se consiguió alambre de plata de pureza de 99.9% de 2 mm de diámetro. La estructura del electrodo de referencia se realizó de cristal, en el Taller de Vidrio ubicado en el Departamento de Química dentro del CINVESTAV. La cristalería del electrodo consta de dos cámaras, separadas por porcelana porosa, en la primera cámara se ubica el

alambre de plata con la parte del depósito de AgCl dentro de solución de KCl saturada, la parte de Ag sin depósito se encuentra fuera de solución. La segunda cámara se rellenó de la misma solución de KCl saturada, de esta manera se puede monitorear concentración constante mientras se haya presencia de cristales de KCl sin disolver. El propósito de la cámara de amortiguación para que la transferencia que haya con la solución de la celda no contamine la cámara que contiene al electrodo de Ag/AgCl, en caso de lecturas de larga duración, llenar la cámara de amortiguación con el medio de la celda.

El depósito de AgCl se realizó con una electrolisis en solución de KCl. Se conectaron dos alambres de plata a cada electrodo de una batería de 9V y se sumergieron en una solución de KCl a 3M, la reacción se dejó de 30 a 60 s, el depósito debe cubrir toda el área designada pero que no forme un gran grosor. Pasar rápidamente a la cristalería conteniendo la solución de KCl sat' y sellar para evitar oxidación del depósito.

## **5.3 ETAPA 2**

En esta etapa se realizó una adaptación secuencial de los cultivos de ánodo y cátodo con el fin de aplicar una presión selectiva en la comunidad microbiana que dé como resultado una comunidad microbiana adaptada a las condiciones de operación.

### **5.3.1 Actividad 2a. Obtención de cultivos frescos y preparación de cultivos mixtos**

*Propósito:* El empleo de cultivos frescos permite emplear comunidades microbianas activas y el utilizar cultivos mixtos hace fácil el disponer de amplias comunidades

microbianas, funcionando en consorcio, que son capaces de adaptarse a las condiciones de operación que se designe para el experimento.

*Diseño experimental:* Los cultivos frescos que se emplearon en el experimento se obtuvieron de distintas fuentes de inóculo: de excreta vacuna (EV) del lienzo charro de La Villa, lodos activados (LD) de la planta de tratamiento de agua de San Juan de Ixhuatepec y suelos (SU) de los jardines del CINVESTAV a una profundidad no mayor de 20 cm.

Para la preparación del inóculo de cultivos mixtos se realizó de acuerdo al trabajo reportado por (Poggi-Varaldo & Valdéz-Ledezma 1995). Se tomó 1 kg de cada cultivo fresco (EV, LD y SU) y se le adicionaron 3 L de agua, la mezcla se agitó y se filtró con un tamiz de 2 mm y el sobrenadante (“extracto”) se utilizó para montar los reactores inoculadores.

### **5.3.2 Actividad 2b. Reactores inoculadores**

*Propósito:* Los reactores inoculadores son el primer paso en la serie de presiones selectivas sobre la comunidad microbiana. En esta actividad se varió la alimentación de los reactores para favorecer el cultivo mixto con cierto metabolismo: un cultivo sulfato reductor como inóculo para bioánodo, y un cultivo desnitrificante para el biocátodo. Los reactores inoculadores se operaron durante 6 meses antes de pasar a la etapa de enriquecimiento.

*Diseño experimental:* La composición del agua de alimentación para el reactor sulfato reductor se muestra en la Tabla 3 y su plan de monitoreo en la Tabla 4. La composición del agua de alimentación para el reactor desnitrificante se muestra en la Tabla 5 y el plan de monitoreo de dicho reactor en la Tabla 6.

**Tabla 3.** Composición del medio de alimentación para el reactor inoculador sulfato reductor.

Nutriente	Concentración (g/L)
CH <sub>3</sub> COOH	2
Sacarosa	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6
NaCl	0.5
NH <sub>4</sub> Cl	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.2
NaSO <sub>4</sub>	11.5

**Tabla 4.** Plan de monitoreo para el reactor sulfato reductor.

Parámetro	Alimentación	Purga	Método
pH	2/semana	2/semana	Standart methods 4500 H <sup>+</sup>
DQO	2/semana	2/semana	Standart methods 5220 C
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	2/semana	2/semana	Standart methods 4500 SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> E

**Tabla 5.** Composición de la alimentación del reactor inoculador desnitrificante

Nutriente	Concentración (g/L)
CH <sub>3</sub> COOH	2
Sacarosa	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6
NaCl	0.5
NH <sub>4</sub> Cl	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.2
NaNO <sub>3</sub>	10

**Tabla 6.** Plan de monitoreo para el reactor inoculador desnitrificante.

Parámetro	Alimentación	Purga	Método
pH	2/semana	2/semana	Standart methods 4500 H <sup>+</sup>
DQO	2/semana	2/semana	Standart methods 5220 C
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2/semana	2/semana	Standart methods 4500 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> B

### 5.3.2.1 Técnicas

#### 5.3.2.1a Sulfatos

##### 4500-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> E Standard methods

*Principio:* El ion sulfato precipita en medio de ácido acético en presencia de BaCl<sub>2</sub> para formar cristales de BaSO<sub>4</sub> de tamaño uniforme. La absorbancia de la suspensión de BaSO<sub>4</sub> es medida por un fotómetro y la concentración se determina con la comparación con una curva estándar.

*Consideraciones:* Grandes cantidades de color o materia orgánica pueden interferir.

Materia suspendida se debe filtrar.

*Concentración mínima detectable:* 1 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L

*Equipo:*

Agitador magnético

Espectrofotómetro, utilizar a 420 nm

Cronómetro

*Reactivos:*

-*Solución buffer A:* Disolver 30 g de cloruro de magnesio MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 g de acetato de sodio, CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O, 1.0 g de nitrato de potasio, KNO<sub>3</sub>, y 20 mL de ácido acético, CH<sub>3</sub>COOH (99%), en 500 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL.

-*Solución buffer B*: (requerida cuando la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  es menor de 10 mg/L) igual a solución A, pero agregar 0.111 g de sulfato de sodio,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y 20 mL de ácido acético (99%) en 500 mL y aforar a 1000 mL

-*Cloruro de Bario*: cristales, malla de 20 a 30.

-*Solución estándar de sulfato*: disolver 0.1479 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro en agua destilada y diluir a 1000 mL.

*Procedimiento:*

1. *Formación de la turbiedad de sulfato de bario*: medir 100 mL de muestra, o una cantidad suficiente llevada a 100 mL, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 20 mL de solución buffer y agitar en aparato. Mientras se mezcla, agregar una cucharada de cristales de  $\text{BaCl}_2$  y comenzar a medir el tiempo inmediatamente, agitar por  $60 \pm 2$  s a velocidad constante.
2. *Medición de la turbiedad de sulfato de bario*: después de agitar, agregar a celda del espectrofotómetro y medir la turbiedad a  $5 \pm 0.5$  min.
3. *Preparación de la curva de calibración*: Estimar  $\text{SO}_4^{2-}$  de la muestra comparando con la lectura de una curva estándar hecha con todo el proceso. Los estándares se harán con intervalos de 5 mg/L desde 0 a 40 mg/L. Valores mayores a 40 mg/L disminuyen la precisión y la suspensión de  $\text{BaCl}_2$  pierde estabilidad.
4. *Corrección por color de muestra y turbiedad*: correr blancos con  $\text{BaCl}_2$  no agregado.

### 5.3.2.1b Nitratos

#### 4500-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> B. Standard methods, método de espectrofotometría UV

*Principio:* La medición de absorción UV a 220 nm permite una rápida determinación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Debido a que la materia orgánica también absorbe a 220 nm, pero NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no absorbe a 275 nm, se utiliza la lectura a 275 nm para corregir el valor de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La filtración de la muestra se recomienda para reducir las interferencias de partículas suspendidas. La acidificación con HCl 1N se realiza para prevenir interferencias por hidróxidos o carbonatos hasta una concentración de 1000 mg CaCO<sub>3</sub>/L. El cloruro no tiene efecto en la determinación.

*Consideraciones:* sigue la curva de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sigue la ley de Beer hasta 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L.

#### *Reactivos*

-*Solución stock de nitrato:* secar KNO<sub>3</sub> en una estufa a 105°C por 24 h, disolver 0.7218 g en agua y diluir a 1000 mL; 1mL = 100 µg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. Preservar con 2 mL de cloroformo. Esta solución es estable mínimo 6 meses.

-*Solución intermedia de nitrato:* diluir 100 mL de la solución stock a 1000 mL de agua; 1 mL = 10 µg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. Preservar con 2 mL de cloroformo. Estable por 6 meses.

-*Solución de ácido clorhídrico:* HCl 1 N, su preparación requiere una valoración con un patrón primario, en este caso se hará con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 N, pesando 52.995 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro, diluir en agua destilada y aforar a 1 L. La valoración se llevará a cabo titulando 10 mL de la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con la solución de HCl, se agregan 2-3 gotas de rojo de metilo como indicador, el indicador se preparará pesando 0.02 g

de rojo de metilo, diluir en 60 mL de etanol y aforar a 100 mL con agua destilada. Los cálculos de la normalidad de la solución de HCl se realizan con la ecuación:

$$C_A = \frac{a}{v} \frac{C_v \times V_v}{V_A} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

$C_A$  = concentración molar analito (HCl)

$C_V$  = concentración molar valorante ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

$V_N$  = volumen de valorante

$V_A$  = volumen gastado de analito

$a/v$  = relación estequiométrica entre el analito y el valorante (1/2 para el par en cuestión).

*Procedimiento:*

1. *Tratamiento de muestra:* 50 mL de muestra, adicionar 1 mL de HCl y mezclar.
2. *Preparación de una curva estándar:* Preparar una calibración de 0 a 7 mg de  $\text{NO}_3^-$  /L diluyendo a 50 mL los siguientes volúmenes de la solución de nitratos intermedia. 0, 1, 2, 4, 7.....35 mL. Tratar los estándares de la misma manera que la muestra.
3. *Medición de espectrometría:* leer la absorbancia utilizando agua como blanco. Utilizar longitud de onda de 220 nm para lectura y 275 nm para determinar interferencias.

*Cálculos:*

Para muestras y estándares, restar dos veces la absorbancia a 275 de la lectura a 220 nm para obtener la absorbancia de  $\text{NO}_3^-$ .

### 5.3.2.1c Demanda Química de Oxígeno (DQO)

#### 5220 standard methods

*Principio:* La demanda química de oxígeno es definida como la cantidad de un oxidante específico que reacciona con la muestra bajo condiciones específicas. La cantidad de oxidante consumido se expresa en su equivalencia en oxígeno. Debido a sus propiedades químicas únicas, se utiliza el ion dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), el cual se reduce a  $\text{Cr}^{3+}$  en las pruebas. Componentes tanto orgánicos como inorgánicos de las muestras son oxidados, pero en la mayoría de los casos es el componente orgánico predomina y es de mayor interés.

La DQO es usualmente utilizada como medida de contaminantes en aguas. En el análisis de DQO se generan residuos peligrosos, como ácido sulfúrico,  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ , cromo hexavalente y trivalente.

#### *Reactivos:*

-*Solución de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0.25 N:* Secar 15 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  en una estufa a 100-105°C durante 2 horas y dejar en desecador; pesar 12.15 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y agregar a 500 mL de agua destilada, adicionar 167 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado lentamente, dejar enfriar y aforar a 1 L con agua destilada.

-*Solución de Sulfato Ferroso Amoniacal (SFA):* Pesar 19.6 g de SFA hexahidratado y disolver en 500 mL de agua destilada; agregar lentamente 20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, dejar enfriar y aforar a 1 L con agua destilada.

La solución de SFA debe de ser valorada, esto se realiza preparando un blanco con 2.5 mL de agua destilada, 1.5 de la solución de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y 3.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$

concentrado y 2 gotas de fenantrolina, esto se hace por triplicado. El blanco se titula con SFA y se calcula la normalidad con la siguiente ecuación:

$$N_{SFA} = \frac{(N \text{ solución oxidante})(1.5 \text{ mL})}{\text{mL SFA gastados}} \quad \text{Ec. 2}$$

*Procedimiento:*

1. *Preparación de la muestra:* La muestra se centrifuga y se lleva a una dilución adecuada (de 20 a 500 mg/L de materia orgánica); se toman 2.5 mL de muestra en tubos de vidrio, se le adicionan 1.5 de la solución de  $K_2Cr_2O_7$  y 3.5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado. A cada tubo se le agregan tres perlas de vidrio.
2. *Digestión:* Las muestras preparadas se colocan en una parrilla de calentamiento y se les coloca el condensador de vidrio; se dejan en digestión a  $200^\circ C$  por 2 h.
3. *Titulación:* una vez pasado el tiempo de digestión, se retiran de la placa de calentamiento y se dejan enfriar. Una vez a temperatura ambiente se vierten en frascos de vidrio, se adicionan 2 gotas de fenantrolina y se titulan con SFA.

*Cálculos:*

Los resultados se expresan como equivalentes de oxígeno, y se calcula con la ecuación que se muestra a continuación:

$$DQO \text{ como } mg \frac{O_2}{L} = \frac{(A-B) \times N \times 8000}{\text{mL de la muestra}} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

A = mL de SFA gastados para el blanco

B = mL de SFA gastados para la muestra

N = Normalidad de SAF

### 5.3.3 Actividad 3. Enriquecimiento de los cultivos electroquímicamente activos

*Principio:* Siguiendo la adaptación de los cultivos inoculadores a sus respectivos metabolismos SR y DN, estos fueron posteriormente sometidos a la siguiente presión selectiva, en la cual se busca la proliferación de bacterias electroquímicamente activas (BEA), adaptándolas a que realicen la transferencia extracelular de electrones (TEE) a receptores de electrones insolubles en el caso del cultivo anódico y desde una fuente insoluble de electrones para el cultivo catódico, para favorecer a aquellos cultivos capaces de trabajar con un electrodo sólido.

La técnica de enriquecimiento del cultivo anódico que se utilizó fue la reportada por (Lovley & Phillips 1986; Lovley & Phillips 1987), en esta técnica se utiliza como aceptor de electrones el  $\text{Fe}^{+3}$  en una forma de  $\text{FeOOH}$ , la cual forma un precipitado insoluble, este precipitado es posteriormente reducido por la actividad TEE de las bacterias y se torna de un color negro con la aparición del  $\text{Fe}^{+2}$ . Esta técnica de ha sido utilizada varias veces en el grupo de trabajo (Vázquez-Larios et al. 2015; Hernandez-flores et al. 2013; Sathish-Kumar et al. 2013), siendo probado sus beneficios en CCM convencionales, sin embargo es la primera vez que se prueba en CCM con bioánodo y biocátodo, tanto en el grupo de trabajo como en literatura hasta nuestro conocimiento.

Por otro lado, el enriquecimiento del cultivo catódico está basado en la técnica reportada por (Gregoire et al. 2014), en esta técnica se trabaja de manera análoga a la anódica, realizando una incubación en viales con una fuente de electrones insoluble, en este caso el  $\text{Fe}^{+2}$  en forma de  $\text{FeCO}_3$ . Este precipitado blanco inicialmente se torna rojizo una vez que se oxida y forma  $\text{Fe}^{+3}$ . Hasta nuestro conocimiento es la primera vez que se emplea esta técnica para el enriquecimiento

de un biocátodo en CCM, además es la primera vez que se cuantifica la evolución de  $\text{Fe}^{+2}$  durante el tiempo de incubación.

*Diseño experimental:* El enriquecimiento de BEA de los cultivos se realizó en botellas serológicas con el medio específico para cada cultivo, cada vial contó con su duplicado y como control se tomaron viales sin inocular. El seguimiento del enriquecimiento se realizó tomando lecturas de la evolución de  $[\text{Fe}^{+2}]$ , mediante una técnica espectrofotométrica con FerroZine. En la técnica catódica se agregó también un tratamiento de viales con una fuente de carbono secundaria, en este caso el acetato de sodio, para evaluar la dependencia a una fuente de carbono heterotrófica y como se refleja en la evolución de  $[\text{Fe}^{+2}]$ .

Una vez montados los viales se tomaron lecturas de  $[\text{Fe}^{+2}]$  cada uno o dos días. Para evaluar una evolución en el enriquecimiento, se calculó el índice de enriquecimiento, con la siguiente ecuación:

$$\varepsilon = \frac{\Delta[\text{Fe}^{+2}]}{t_{lag}} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde  $\Delta[\text{Fe}^{+2}]$  corresponde a el cambio de concentración de  $\text{Fe}^{+2}$  desde el tiempo 0 hasta la fase estacionaria, y  $t_{lag}$  el tiempo que tarda en comenzar la actividad de aparición/desaparición de  $\text{Fe}^{+2}$ .

### 5.3.3.1 Enriquecimiento del cultivo del bioánodo

*Principio:* Favorecer la presencia y proliferación de BEAs, las cuales tienen la capacidad de transferir electrones extracelularmente a aceptor de electrones

insoluble. Con esta técnica se busca favorecer los microorganismos de transferir electrones a un electrodo sólido.

*Reactivos y materiales:*

-Síntesis de FeOOH: Neutralizar una solución de FeCl<sub>3</sub> 0.4 M a pH 7.0 con NaOH. De acuerdo a las modificaciones por Hernández-Flores, neutralizar 150 mL de FeCl<sub>3</sub> 0.4 M, dejar sedimentar y decantar, lavar con agua destilada. Realizar 3 lavados y aforar el sedimento a 1 L (solución de FeOOH).

-Solución de vitaminas: en 800 mL de agua desionizada, agregar biotina 0.002 g, ácido pantoténico 0.005 g, vitamina B-12 0.001 g, ácido benzoico 0.005 g, ácido tioctico ( $\alpha$ -lipóico) 0.005 g, ácido nicotínico 0.005 g, tiamina 0.005 g, riboflavina 0.005 g, HCl piridoxina 0.01 g, ácido fólico 0.002 g. Aforar 1 L.

-Solución de minerales: En 800 mL de agua desionizada, adicionar EDTA 2.14 g, MgSO<sub>4</sub> 0.3 g, MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 0.5 g, NaCl 1 g, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.1 g, CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.1 g, ZnCl<sub>2</sub> 0.13 g, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.01, AlK(SO<sub>4</sub>) 12H<sub>2</sub>O 0.01 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 g, NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.025 g, NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.024 g, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.025 g. Agregar NTA pH 8-8.5 con NaOH para disolver NTA y formar NTA sal trisódica libre de ácido. Aforar a 1L.

*Procedimiento:*

- 1) Llenar viales con 50 mL de solución de FeOOH cada uno, adicionar 0.5 mL de solución de minerales.
- 2) Gasear cada frasco durante 1.5 min con N<sub>2</sub> y sellar
- 3) Esterilizar las botellas a 121 °C durante 15 min.
- 4) Adicionar 0.5 mL de vitaminas.

- 5) Inocular 3 viales con 20% v/v de cultivo planctónico, e incubar a 37 °C en la oscuridad a 100 rpm.
- 6) Tomar muestra cada 1 o 2 días de acuerdo a la técnica de Ferrozine (sección 5.3.3.3).
- 7) Realizar el pase a un vial nuevo cuando el aumento de  $[Fe^{+2}]$  llegue a una fase estacionaria, de no presentarse una fase estacionaria definir pase por días transcurridos.

### **5.3.3.2 Enriquecimiento del cultivo del biocátodo**

#### **Principio:**

Favorecer las bacterias que son capaces de tomar electrones de una fuente insoluble por TEE, en este caso la oxidación de una forma insoluble de  $Fe^{+2}$ , con esta técnica se busca la adaptación del cultivo a tomar electrones de un electrodo sólido.

#### **Equipo, materiales y reactivos**

##### ***Equipo y materiales:***

- Botellas serológicas
- Gas  $N_2$
- Cabina anóxica
- Jeringas de 1 mL y 20 mL

#### **Reactivos**

##### **Solución de medio:**

Por cada litro de medio, agregar:  $NaHCO_3$  2.52 g,  $NH_4Cl$  0.3 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.4 g,  $KH_2PO_4$  0.6 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 g, 1 mL de medio mineral SL9.

**Solución mineral SL9:**

Para prepara un litro de solución, en 500 mL de agua desionizada, agregar:  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.19 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{ZnCl}_2$  0.07 g,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0.024 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0.036 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.006 g,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.002 g, NTA 12.8 g. Antes de aforar a 1 L, ajustar el pH a 6.

**Solución de vitaminas:**

Para preparar 1 L de solución, en 500 mL de agua desionizada, agregar: biotina 0.002 g, ácido pantoténico 0.005 g, vitamina B-12 0.001 g, ácido benzoico 0.005 g, ácido tioctico ( $\alpha$ -lipóico) 0.005 g, ácido nicotínico 0.005 g, tiamina 0.005 g, riboflavina 0.005 g, HCl piridoxina 0.01 g, Ácido fólico 0.002 g. Aforar 1 L, utilizar agua desionizada, hervida y gaseada con  $\text{N}_2$ .

**Solución stock de  $\text{FeCl}_2$  0.45 M:**

Para 1 L de solución, agregar 89.4645 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y aforar a 1 L con agua desionizada. Trabajar en condiciones anóxicas, porque el oxígeno puede oxidar rápidamente el  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ . El agua para la solución, hervirla y gasearla con  $\text{N}_2$  para eliminar oxígeno. La preparación de la solución se realizó en cabina anóxica.

**Solución de nitrato 0.75 M:**

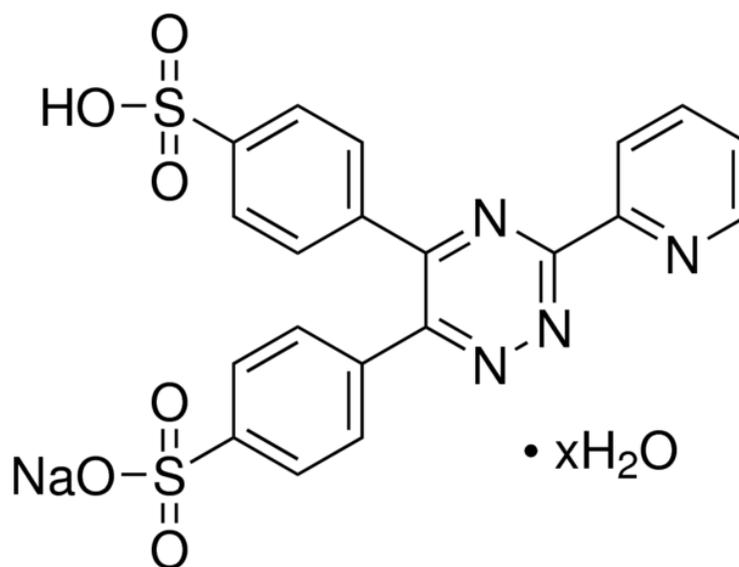
Para 1 L de solución, agregar: 75.8272 g de  $\text{KNO}_3$  a 500 mL de agua desionizada, aforar a 1 L.

**Procedimiento:**

- 1) Preparar solución de medio, agregando 1 mL de solución de minerales por cada litro de medio.
- 2) Agregar en viales (botellas serológicas de 120 mL) 60.70 mL de medio preparado y 1 mL de solución de nitratos, gasear para eliminar O<sub>2</sub> disuelto y adicionar 1 mL de solución de FeCl<sub>2</sub>. Sellar el vial inmediatamente al terminar de gasear.
- 3) Una vez sellados, esterilizar los viales en autoclave a 121 °C y 15 psi por 20 min.
- 4) A los viales estériles, adicionarles 0.15 mL de solución de vitaminas, y 12.14 mL de inóculo.
- 5) Dejar incubar los viales en oscuridad a 37 °C, de preferencia en agitación a 30 rpm.
- 6) Dar seguimiento a la desaparición de FeCl<sub>2</sub>, con lectura por medio de la técnica con FerroZine.

**5.3.3.3 Lectura de Fe<sup>+2</sup> con técnica de FerroZine**

*Principio:* Dar seguimiento a la aparición (enriquecimiento bioánodo) y desaparición (enriquecimiento biocátodo) de Fe<sup>+2</sup> mediante una técnica de lectura de Fe<sup>+2</sup> determinado espectrofotométricamente con FerroZine como quelante que desarrolla color magenta. El quelante reacciona como un ligando bidentado a iones metálicos, donde el complejo con ión ferroso produce un color más intenso que con otros iones. El arreglo atómico de dicho complejo recibe el nombre de ferroína (Stookey, 1970). En la Figura 2 se muestra la estructura del complejo de Ferrozine.



**Figura 4.** Estructura de FerroZine (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid monosodium salt hydrate)(Sigmaaldrich, 2015).

*Materiales y reactivos:*

-Espectrómetro

-Celda de cuarzo

-FerroZine (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid monosodium salt hydrate)

-Ácido clorhídrico: HCl

*Soluciones:*

-Solución de HCl 0.5 N (preparada en agua desionizada).

-Solución de Ferrozina: pesar 11.96 g de HEPES y 1 g de ferrozina, disolver en 800 mL de agua desionizada, ajustar pH a 7 con HCl 0.5 N y aforar a 1 L.

*Procedimiento:*

- 1) Tomar 0.1 mL de muestra procurando no introducir O<sub>2</sub>, mezclar inmediatamente con 0.9 mL de HCl 0.5 N en un tubo eppendorf (las condiciones ácidas evitan la oxidación a Fe<sup>+3</sup>).
- 2) Tomar 0.1 mL del tubo anterior (parte soluble, sin sólidos) y mezclar con 4.9 mL de solución de ferrozina, realizar duplicado.
- 3) Dejar reposar durante 15 min y leer en espectrómetro a 562 nm. Como blanco, prepararlo con el procedimiento anterior pero utilizar 0.1 mL de HCl 0.5 N en lugar de muestra.

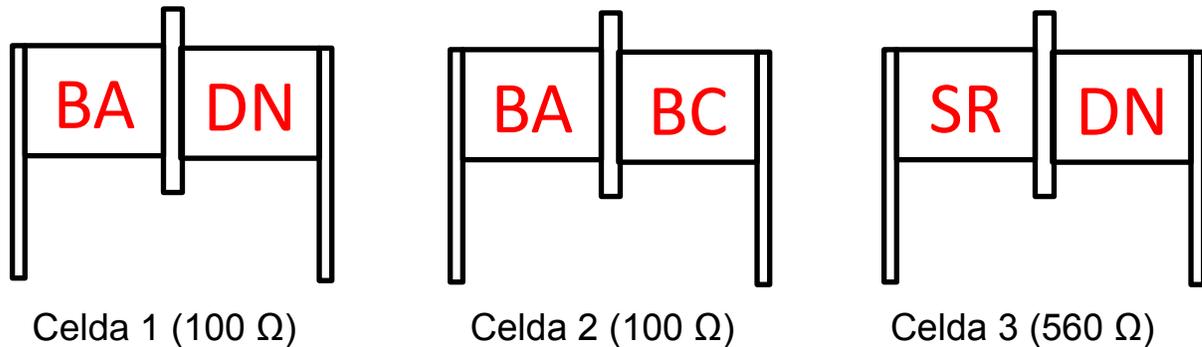
#### **5.3.4 Actividad 4. Ensayo bioelectroquímico de cultivos enriquecidos en-celda**

*Proposito:* Evaluar el desempeño en-celda de los cultivos enriquecidos BEA. Confirmar si la técnica de enriquecimiento mejora el desempeño de la celda en comparación con los cultivos no-enriquecidos.

*Diseño experimental:* Para evaluar el enriquecimiento reflejado en desempeño de celda, se montaron tres celdas idénticas con diferente configuración de inóculos, las configuraciones se muestran en la Figura 3. Las celdas utilizadas se componen de dos cámaras cúbicas idénticas de 27 cm<sup>3</sup>, fueron separadas por una membrana Nafion 117 con un área de 9 cm<sup>2</sup> y se llenaron con una cama de escamas de grafito de 8 cm<sup>3</sup>.

El experimento se llevó a cabo con una etapa de arranque de 2 semanas, cada semana se le denominó periodo (I y II) y el experimento se inició en la tercera semana de montaje de las celdas (periodo III). Los periodos iniciales sirvieron para adaptar los inóculos a trabajar directamente con los electrodos pero manteniendo su consorcio. Para ello, se limitó el caudal de corriente eléctrica con altas resistencias

externas, bajando la resistencia externa con cada alimentación para el siguiente periodo. Esto se intentó con la idea de que el inóculo continuara trabajando como consorcio. El periodo I inició con una resistencia externa de 5600  $\Omega$ , el periodo II con 1000  $\Omega$ , y para el experimento se utilizó la resistencia externa óptima de acuerdo con el análisis de una curva de polarización.



**Figura 5.** Esquema de las configuraciones de celda utilizadas en el ensayo bioelectroquímico de los cultivos enriquecidos, junto a la resistencia externa utilizada durante el periodo III (BA, bioánodo enriquecido; BC, biocátodo enriquecido; SR, bioánodo sulfato reductor; DN, biocátodo desnitrificante).

Al final de cada periodo la celda se realimento con medio de alimentación nuevo, la composición fue (en g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6,  $\text{NaHCO}_3$  0.2,  $\text{MgCl}_2$  0.2, 5 g de acetato de sodio para el anolito y 7.5 g de  $\text{KNO}_3$  para el catolito, más 10 %v/v de solución de minerales y 5 %v/v de solución de vitaminas.

#### 5.3.4.1 Monitoreo de voltaje

*Propósito:* Dar seguimiento a la lectura de voltaje durante el tiempo total de la operación del celdas, se utiliza la lectura de voltaje para seguir la actividad eléctrica

de la celda indirectamente, calculando la corriente eléctrica con la ley de Ohm y la resistencia externa (Logan et al. 2006).

*Diseño experimental:* La lectura del voltaje se realizó con una placa Arduino UNO, esta placa permitió de una manera fácil la programación del monitoreo de voltaje para tres celdas cada 10 min con la adquisición automática de datos en una planilla de Microsoft Excel.

Para poder utilizar el Arduino UNO para leer voltaje, fue necesario comparar su fidelidad contra un instrumento comercial de lectura de voltaje. Por lo anterior, se realizó un experimento en el cual se monitoreó el voltaje de una celda simultáneamente con un Arduino UNO y un multímetro (Escort 3146A).

*Procedimientos:* Para mejorar la resolución del Arduino UNO, se bajó el voltaje de referencia de 5 V (default) a 0.8 V, al contar con solo 10 bits de convertidor de analógico a digital, este fue un paso clave. El segundo paso fue un código con el cual se realicen lecturas promediadas para disminuir el ruido. Para esto se definió una toma de lectura cada 100 ms y un promedio de lectura cada 20 lecturas. El código utilizado se muestra a continuación:

```
const int NUM_LEC = 20;
const int NUM_PRINT = 450;
float voltage0 = 0;
float voltagePrint0 = 0;
float voltageAV0 = 0;
float voltage01 = 0;
float TOTAL_LEC = 0;
int Lec = 0;
int i;
int j = 0;
int Index = 0;
float totalLecturas = 0;
float promedioLecturas = 0;
int Index2 = 0;
int inputPin0 = A0;
```

```

void setup() {
  Serial.begin(9600);
  analogReference(EXTERNAL);
  Serial.println("CLEARDATA");
  Serial.println("LABEL,TIME,CELL 1 (V)");
  analogReference(EXTERNAL);
}
void loop() {
  while (j < NUM_PRINT){
    //las iteraciones se programan para una lectura cada 100 ms y un
    promedio cada 2 s
    for (int i = 0; i < NUM_LEC; i++){
      Lec = analogRead(inputPin0);
      float voltageLEC0 = Lec * (0.83 / 1023.000);
      totalLecturas = totalLecturas + voltageLEC0;
      delay(100);
    }
    TOTAL_LEC = totalLecturas;
    totalLecturas = 0;
    i = 0;
    j++;
  }
  voltageAV0 = TOTAL_LEC/NUM_LEC;
  if (voltageAV0 <= 0.100){
    voltagePrint0 = voltageAV0 + 0.00245;}
  else if (voltageAV0 > 0.100){
    voltagePrint0 = voltageAV0 + 0.0018;}
  Serial.print("DATA,TIME");
  Serial.print(",");Serial.print(voltagePrint0,5); Serial.print(",");
  Serial.println("ROW,SET,2");
  TOTAL_LEC = 0;
  voltageAV0 = 0;
  voltagePrint0= 0;
  j = 0;
  voltage01 = 0;
}

```

En seguida se muestran las ecuaciones con las que se analizaron los datos de la prueba.

Error absoluto:

$$e_{Abs} = V_{mult} - V_{Arduino} \quad \text{Ec. 5}$$

Error absoluto promedio:

$$\bar{e}_{Abs} = \frac{1}{N} \sum (V_{mult} - V_{Arduino}) \quad \text{Ec. 6}$$

Error relativo:

$$e_{Abs} = \frac{(V_{mult} - V_{Arduino})}{V_{mult}} \quad \text{Ec. 7}$$

Voltaje promedio:

$$\bar{V} = \frac{1}{N} \sum V_{Arduino} \quad \text{Ec. 8}$$

Varianza:

$$\sigma_e^2 = \frac{1}{N-1} \sum (E_{mult} - E_{Arduino})^2 \quad \text{Ec. 9}$$

Desviación estándar:

$$\sigma_e = \sqrt{\sigma_e^2} \quad \text{Ec.10}$$

#### **5.4 Actividad 5. Aclimatación de los cultivos a tetracloruro de carbono**

*Propósito:* adaptar los cultivos a trabajar en presencia de tetracloruro de carbono y se pueda mejorar la remoción una vez el experimento en celda, aumentando paulatinamente la concentración de TC presente en la incubación.

*Diseño experimental:* La aclimatación de los cultivos enriquecidos se abordó de dos maneras. En el primer ensayo se montaron reactores de 1 L, con un V de operación de 0.5 L, dichos reactores fueron inoculados con cultivos enriquecidos provenientes de viales. Una vez montados los reactores, se contaminaron con una concentración inicial de TC de 2 ppm, y a medida que se observaba su desaparición seguía con una concentración mayor. Después de cerca de 3 semanas de operación, se inocularon viales de enriquecimiento con cultivo de los reactores de aclimatación para observar si aún conservaban la actividad hierro reductora/oxidante, al no mostrar actividad de reducción/oxidación de hierro, se reinició la aclimatación utilizando viales de enriquecimiento y adicionando tetracloruro de carbono.

En el segundo ensayo, la contaminación se realizó en viales de enriquecimiento de BEAs. Inicialmente se contaminaron a la par viales con 2.5 y 5 ppm de TC para ambos cultivos (bioánodo BA 2.5 y BA 5; biocátodo BC 2.5 y BC 5). La concentración se aumentó hasta 10 mg/L para ambos cultivos. En ambos ensayos se les monitoreó la concentración de  $\text{Fe}^{+2}$  con la técnica de ferrozine de manera de evaluar su actividad.

Una vez terminada la etapa de enriquecimiento, secuencialmente se prosiguió por incubar los cultivos enriquecidos en presencia de TC, esto se realizó en el mismo medio de enriquecimiento para no perder actividad adquirida y se contaminaron los viales con concentraciones cada vez mayores, iniciando con una concentración de 2.5 mg/L, se prosiguió por aumentar la concentración a 5 y 10 mg/L. La concentración de TC y cloroformo se midieron cada 3 a 4 días por cromatografía de gases. El incremento de concentración de TC se hizo al hacer el pase a vial nuevo.

## **5.5 ETAPA 3**

En esta se etapa se operaron, monitorearon y caracterizaron las celdas microbianas con las distintas configuraciones de operación.

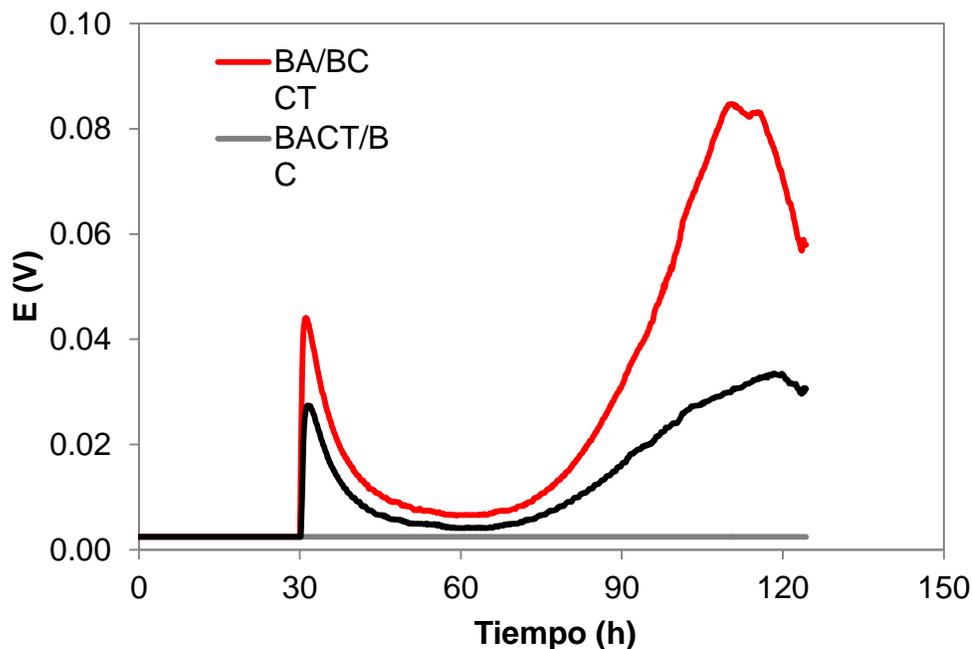
### **5.5.1 Elección de inóculos**

Como paso previo al experimento se eligieron los inóculos que serían utilizados en la celda. Esto debido a que al momento de inoculación de las celdas con los cultivos previamente enriquecidos y aclimatados no se obtuvo actividad eléctrica. Se re-inocularon las celdas con cultivos enriquecidos sin aclimatar para comprobar si los cultivos perdieron actividad durante el periodo de aclimatación, se realizó variando la

re-inoculación en diferentes cámaras para encontrar el cultivo problema: i) re-inoculación de ánodo, ii) re-inoculación de cátodo, iii) re-inoculación de ambas cámaras.

En la Figura 4 se muestra el monitoreo de voltaje durante la elección de inóculos. Se puede apreciar un inicio en la actividad eléctrica desde el momento de la inoculación en las celdas 1 y 3, las cuales recibieron una re-inoculación de bioánodo enriquecido previo a la aclimatación de TC. Por lo contrario, la celda 2 no mostró actividad aún después de la re-inoculación, esta celda solo recibió re-inóculo en el cátodo, por lo que se puede asumir que el cultivo del bioánodo perdió actividad en el periodo de larga duración en presencia de TC durante la actividad de aclimatación.

En base a los resultados, la combinación de inóculos que se eligió para el experimento de remoción de TC en celda fueron el BA (cultivo enriquecido) para el bioánodo y BCTC (cultivo enriquecido y aclimatado) para el biocátodo.



**Figura 6.** Monitoreo de voltaje al momento de la re-inoculación.

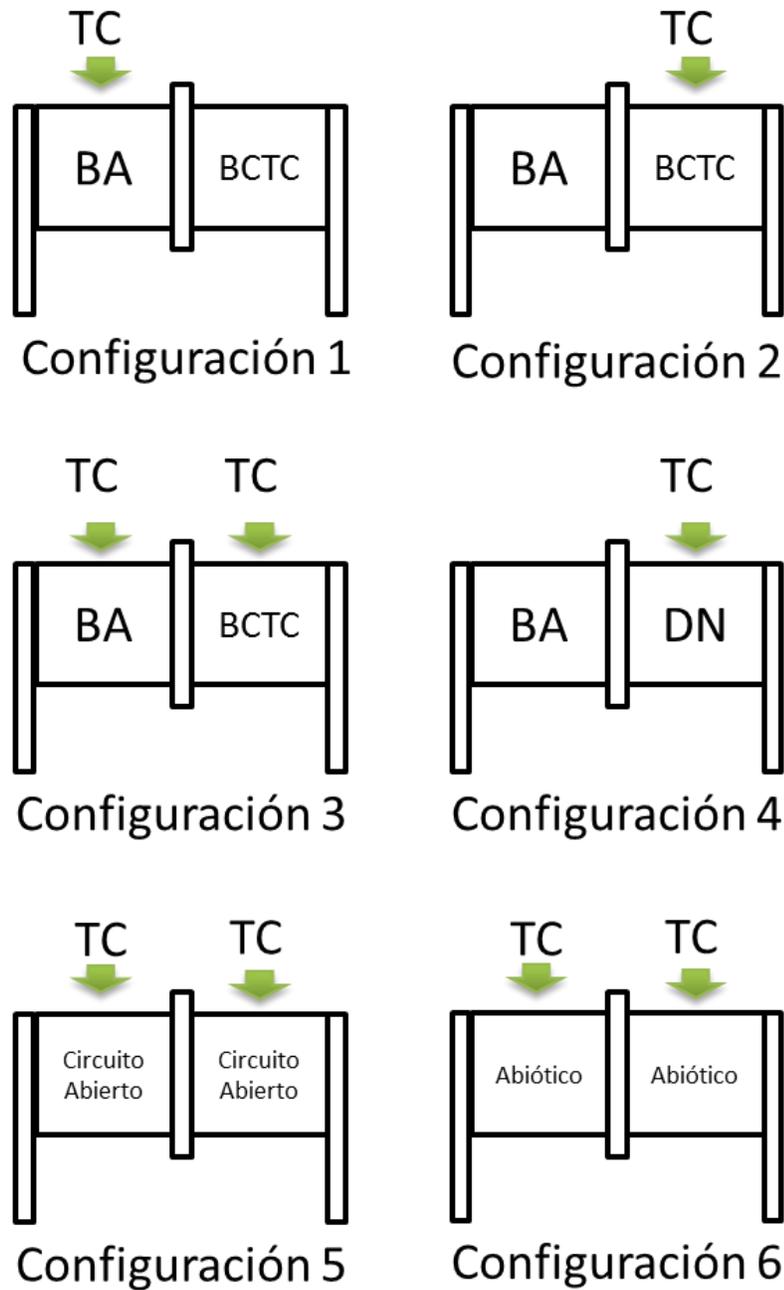
### **5.5.2 Actividad 5. Operación, monitoreo y evaluación de las CCM con las diferentes configuraciones de operación en la remoción de tetracloruro de carbono en celda.**

*Propósito:* En esta actividad se evaluaron los cultivos enriquecidos y aclimatados respecto a su capacidad de remover tetracloruro de carbono en celda.

*Diseño experimental:* El experimento consistió en evaluar distintas configuraciones de celda, variando la presencia de tetracloruro de carbono en las cámaras de la celda.

Se realizaron cinco configuraciones en celda y un control abiótico en botellas serológicas, las combinaciones fueron las siguientes: *i)* TC en ánodo, *ii)* TC en cátodo, *iii)* TC en ambas cámaras, *iv)* TC en cátodo no enriquecido, *v)* TC en ambas cámaras en circuito abierto y *vi)* control abiótico en celda. En la Figura 5 se muestra un esquema con las distintas configuraciones de operación.

*Procedimiento:* Para iniciar el experimento en celdas, se inocularon las celdas con BA para ánodo y BCTC para cátodo. La inoculación se realizó tomando 50 mL del vial correspondiente, centrifugarlo a 4000 x g durante 7 minutos. La pastilla después se re-suspendió en 10 ml de medio base, la composición del medio base se muestra en la Tabla 7. Se hicieron soluciones stock para adicionar el acetato de sodio (bioánodo), el nitrato de potasio (biocátodo) y el tetracloruro de carbono, de dichas soluciones se adicionan 1 mL a la celda para alcanzar la concentración deseada.



**Figura 7.** Diferentes configuraciones de operación. BA) bioánodo enriquecido, BCTC) biocátodo enriquecido y aclimatado, TC) Tetracloruro de carbono DN) biocátodo desnitrificante.

**Tabla 7.** Composición de medio base para la operación en celda

Componente	Concentración (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6
(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	0.6
NaHCO <sub>3</sub>	0.6
MgCl <sub>2</sub>	0.2
NaCl	0.2
Peptona de caseína	0.05
Solución de minerales	50 mL
Solución de vitaminas	50 mL

La composición de las soluciones de vitaminas y minerales fueron las mismas que las descritas en la sección 5.3.3.2.

Las concentraciones de las soluciones stock fueron las siguientes: acetato de sodio 6H<sub>2</sub>O 19 g/L para una concentración de 1 g/L en celda, KNO<sub>3</sub> 3.09 g/L para una concentración de 0.1628 g/L en celda, tetracloruro de carbono 0.19 g/L para una concentración de 10 mg/L en celda.

Después de la inoculación se llevó a cabo un periodo de adaptación en celda disminuyendo la  $R_{ext}$  poco a poco de manera similar a la sección 5.4.1. Se inició dejando a circuito abierto durante la noche después de la inoculación, al día siguiente se cerró el circuito con 5600  $\Omega$ , a los 4 días se bajó a 2200  $\Omega$  y 4 días después se cambió a 1000  $\Omega$ , con la cual se realizaron las corridas con el contaminante.

### **5.5.3a Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 1.**

*Propósito:* La operación y evaluación de la celda con TC en cámara anódica, permitirá observar el comportamiento electroquímico, además de evaluar la remoción de TC en el bioánodo.

### **5.5.3b Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 2.**

*Propósito:* La operación y evaluación de la celda con la configuración 2, TC en cámara catódica, permitirá observar el comportamiento de la celda en la bioremediación al tener dos aceptores finales de electrones en la misma cámara.

### **5.5.3c Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 3.**

*Propósito:* La operación y evaluación de la celda con la configuración 3, TC en ambas cámaras, permitirá observar el comportamiento electroquímico y evaluar la biodegradación de TC en ambas cámaras.

### **5.5.3d Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 4.**

*Propósito:* La operación y evaluación de la celda con la configuración 4, con cultivos no enriquecidos (sulfato reductor y desnitrificante), permite observar el efecto de las etapas de enriquecimiento y aclimatación en la remoción de TC.

### **5.5.3e Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 5.**

*Propósito:* La operación y evaluación de la celda con la configuración 5 sirve para observar el comportamiento de la concentración de TC en ambas cámaras cuando se opera en circuito abierto (OCV).

### **5.5.3f Operación, monitoreo y evaluación de una CCM con la configuración de operación 6.**

*Propósito:* En la configuración 6 se operó la celda abióticamente para determinar cuál es la pérdida por factores físicos, como absorción del grafito y la volatilidad en celda.

Además para corroborar se montó también un control abiótico en botellas serológicas.

Diseño experimental: Se realizaron dos controles abióticos, uno en celda y uno en botellas serológicas. Se montaron 4 viales con un volumen similar al volumen de cámara de celda y se agregó la misma cantidad de grafito.

### **5.5.3.1 Técnicas**

#### **5.5.3.1a Curva de Polarización**

La curva de polarización es una herramienta para caracterizar una CCM. Mediante esta curva se determinan los puntos máximos de potencia y voltaje. Para obtener dichos resultados se hacen las mediciones de la curva variando la resistencia externa  $R_{ext}$ .

Las lecturas se tomarán conectando la CCM a un multímetro, 1 operando a circuito abierto, leyendo los voltajes cada 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se comenzaran a variar las resistencias, las resistencias se cambiarán cada 5 minutos y se tomarán lecturas cada minuto en cada resistencia. Las resistencias que se utilizaron en la caracterización fueron: en  $\Omega$ : 100, 150, 180, 220, 270, 330, 390, 560, 680, 820, 1000, 1200, 1500, 1800, 2200, 5600 y 8200. La lectura se hizo cambiando las resistencias en forma descendente y ascendente.

#### **5.5.3.1b Cromatografía de gases**

El análisis de los compuestos clorados se hizo con un cromatógrafo de gases (Clarus 580 Perkin Elmer®) acoplado a un automuestreador de headspace. Se utilizó una columna Elite-5 (30 m x 0.25 mm). El método fue isotérmico con las siguientes

temperaturas: inyector 200 °C, horno 35 °C y detector 300 °C. El automuestreador headspace utilizó las siguientes temperaturas: vial 85 °C, jeringa 95 °C y línea de transferencia 105 °C.

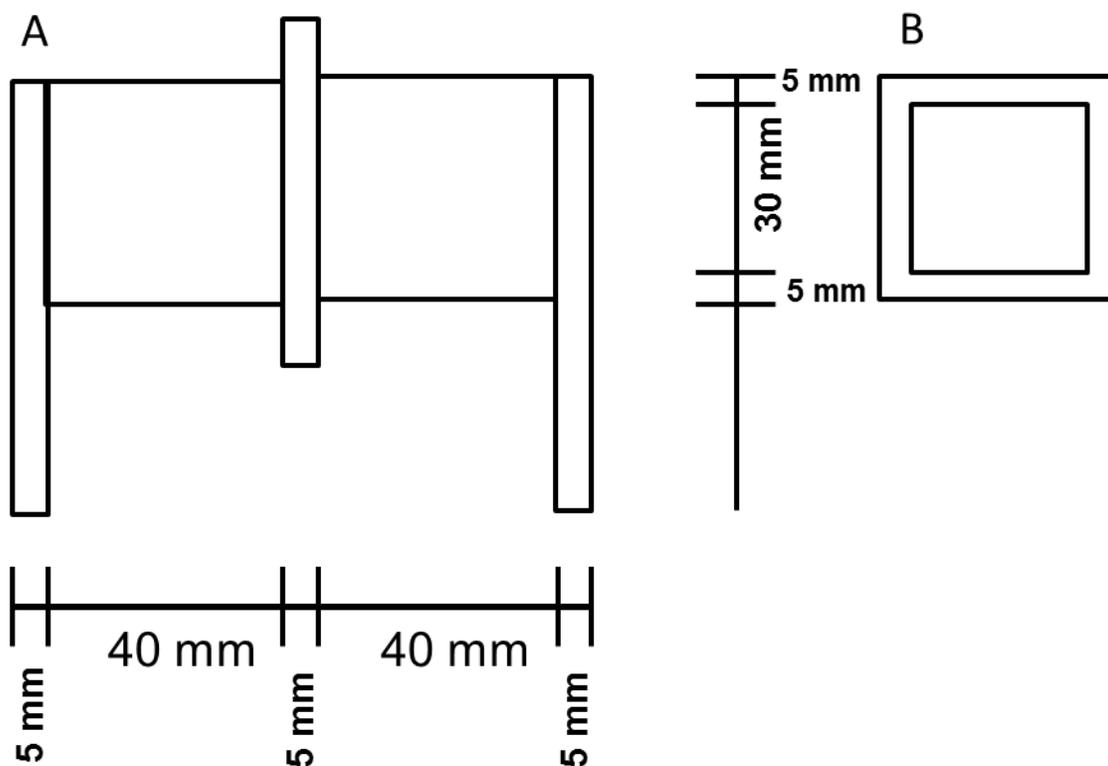
Las muestras fueron preparadas a 1 mL por vial, con este método se pudo leer tetracloruro de carbono desde 0.031 mg/L hasta 1 mg/L, así como cloroformo desde 0.036 mg/L hasta 1.47 mg/L.

Para el muestreo de las celdas con concentración inicial de 10 mg/L se tomó una dilución 1:20 para el tiempo cero, y se prosiguió subiendo la dilución a 1:10 y 1:5, 1:5 fue la máxima dilución para evitar vaciar la celda con múltiples muestras

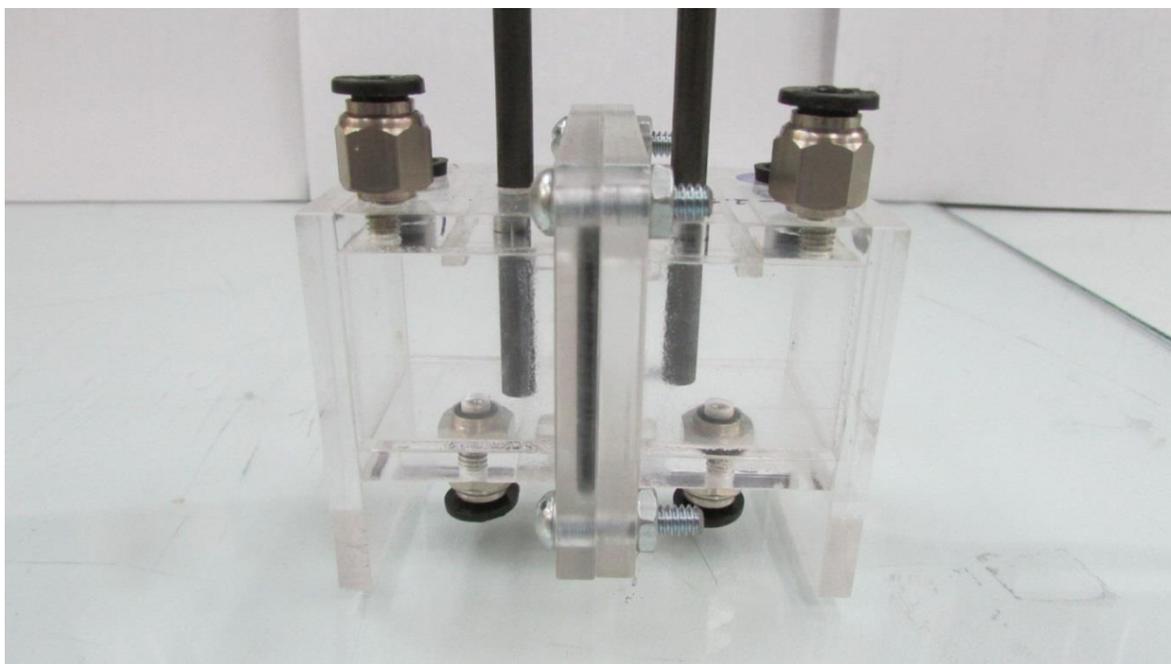
## VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Actividad 1. Diseño y construcción de una CCM equipada con biocátodo y un electrodo de referencia.

La celda se construyó en los talleres del CINVESTAV de acuerdo a las especificaciones detalladas en metodología. En la Figura 6 se muestra en detalle el diseño y la dimensión de la celda, con cámaras de 30 x 30 x 30 mm, de material acrílico de 5 mm de grosor. En la Figura 7 se muestra una imagen de la celda finalizada. En total se construyeron 3 celdas idénticas para realizar corridas simultáneas.



**Figura 8.** Esquema de forma y dimensión de la celda. A) corte longitudinal de la celda completa; B) corte transversal de una cámara.



**Figura 9.** Celda de doble cámara finalizada.

Los elementos agregados a la construcción de la celda fueron: conexiones rápidas 1/4" a 1/8" en la parte superior e inferior para purga y alimentación, dos barras de grafito como colector eléctrico, y tapones de goma de 8 mm de diámetro para adaptar e intercambiar un electrodo de referencia.

### **6.1.1 Construcción del electrodo de referencia**

La cristalería del electrodo se realizó en los talleres de vidrio ubicados en el Departamento de Química dentro del CINVESTAV. El electrodo Ag/AgCl se hizo en el laboratorio como se describió en la sección 5.2.1.2. En la Figura 8 se ilustra la forma final del electrodo de referencia, donde en la cámara superior se ubica el alambre de plata con el depósito y se acopla a una cámara de amortiguamiento.



**Figura 10.** Electrodo de referencia Ag/AgCl.

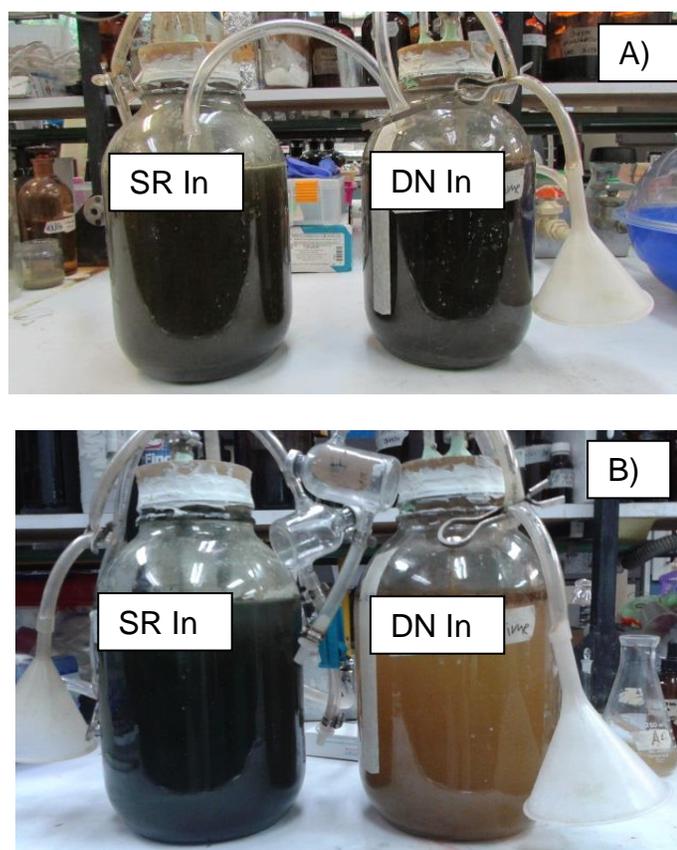
### **6.2 Actividad 2a. Obtención de inóculos y preparación de cultivos mixtos.**

La obtención de los inóculos y la preparación del extracto de cultivos mixto se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 5.3.1. Una vez obtenido el extracto de cultivo mixto, se llenaron dos reactores con el extracto a 3 L de volumen de operación, uno destinado a un cultivo mixto desnitrificante y otro a un cultivo mixto sulfato reductor.

### **6.3 Actividad 2b. Reactores inoculadores**

Después del montaje de los reactores, se aplicaron dos semanas de alimentación con exceso de sacarosa como fuente de carbono, alimentando cada tercer día, terminado este periodo se continuó la alimentación de acuerdo a lo mencionado en la sección de metodología. En la Figura 9A se muestran los reactores inoculadores a un mes de su inoculación, donde todavía no se aprecia una diferencia a simple vista, en

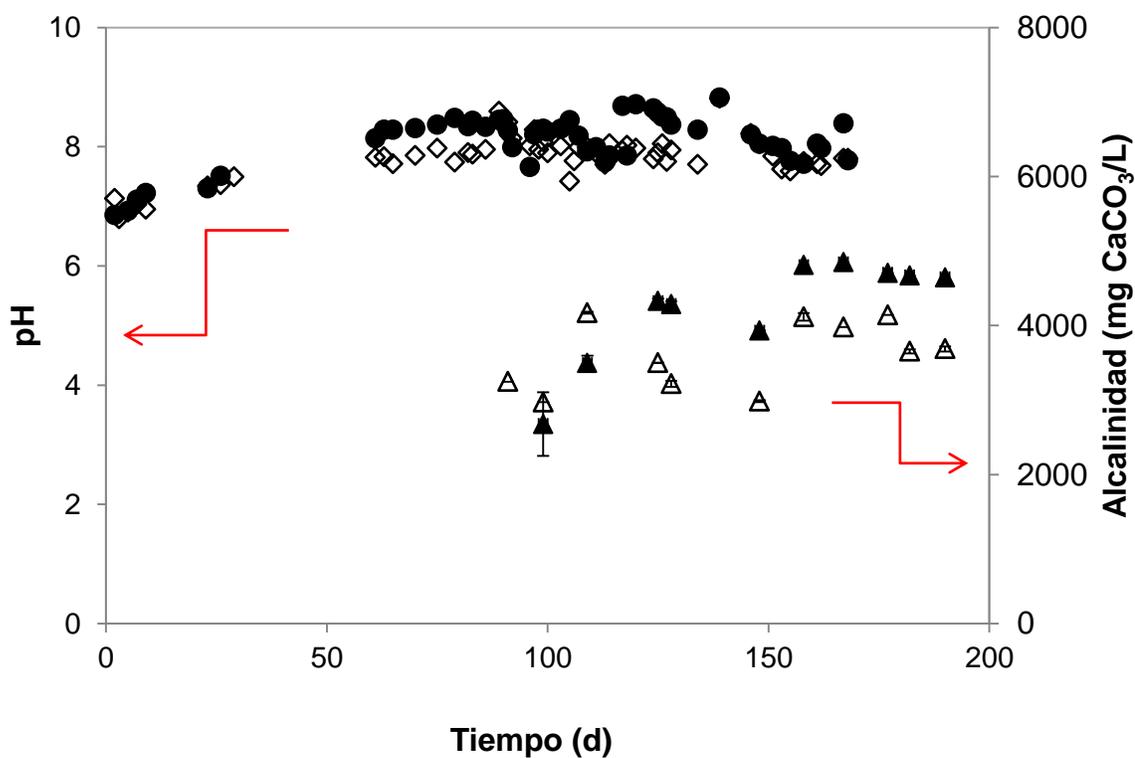
comparación con la Figura 9B, donde después de 6 meses es evidente el cambio de coloración de los reactores; el desnitrificante tomó un color claro, mientras que el sulfato reductor tomó un color oscuro con tonalidades verdosas.



**Figura 11.** Reactores inoculadores. A) Después de un mes de adaptación y B) después de 6 meses de adaptación.

Al terminar el montaje se inició el monitoreo de los diferentes parámetros (eficiencia de remoción de DQO, pH, eficiencia de remoción de nitratos, eficiencia de remoción de sulfatos y alcalinidad. El plan de monitoreo esta descrito en la sección 5.3.2 de metodología.

### 6.3.1 pH y alcalinidad

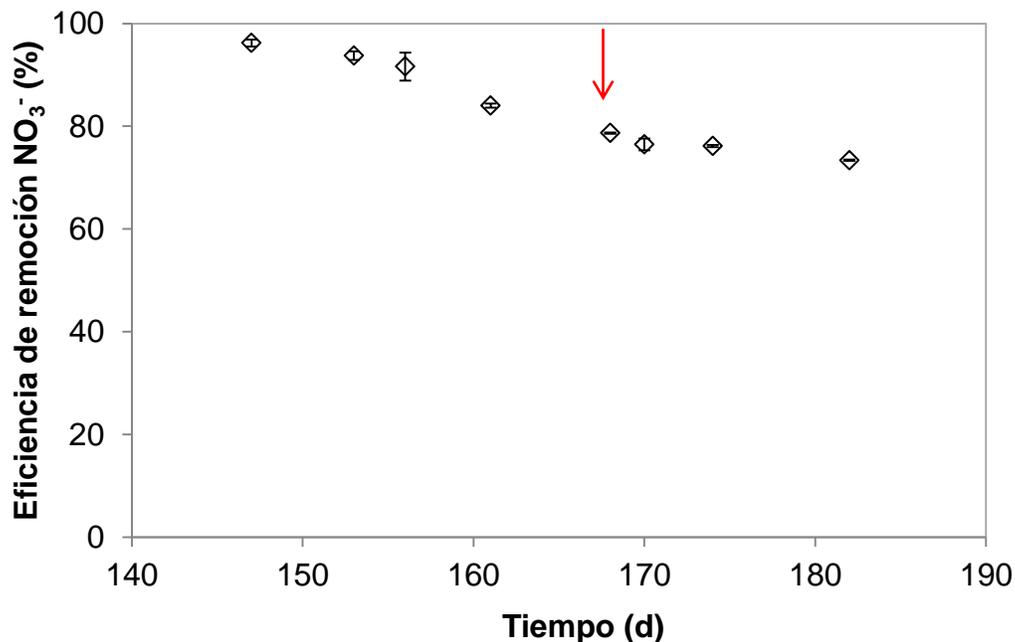


**Figura 12.** Seguimiento del pH y la alcalinidad para ambos reactores inoculadores. *Rombo blanco*, pH reactor sulfato reductor; *Círculo negro*, pH reactor desnitrificante; *triángulo blanco*, alcalinidad reactor sulfato reductor; *triángulo negro*, alcalinidad reactor desnitrificante.

Se puede apreciar en la Figura 10 que ambos reactores aumentaron su pH a partir de la inoculación, al mismo tiempo, aumento su alcalinidad. Se decidió disminuir la cantidad de  $\text{NaHCO}_3$  agregado bajando su concentración en el agua de alimentación hasta 0.2 g/L. Debido a que los cultivos mostraron que generan su propia alcalinidad no se observó una disminución notoria de la alcalinidad o pH, sin embargo, no siguió su aumento.

### 6.3.2 Nitratos

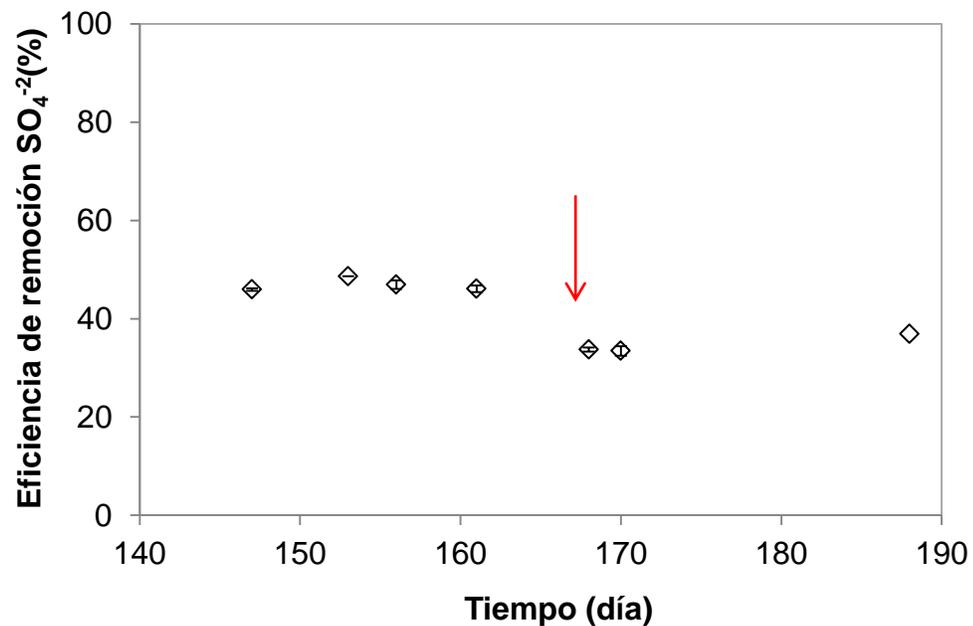
En la Figura 11 se muestra la  $\eta_{\text{NO}_3}$ , durante el inicio del monitoreo del reactor desnitrificante la  $\eta_{\text{NO}_3}$  fue mayor a 90%. Sin embargo, estaba subestimada la concentración por lo que se ajustó la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en el agua de alimentación, y se aumentó a un 25% en exceso, con lo cual la eficiencia de remoción de  $\text{NO}_3^-$  al día 168 fue del 78%. Después del ajuste de alimentación a los 168 d, la eficiencia de remoción promedio fue de  $76.18 \pm 2.17 \%$ .



**Figura 13.** Monitoreo de eficiencia de remoción de nitratos en reactor inoculador desnitrificante. La flecha roja indica el punto de ajuste de concentración de  $\text{NaNO}_3$ .

### 6.3.3 Sulfatos

La eficiencia de remoción de  $\text{SO}_4^{-2}$  se ha mostrado abajo del 50%, como se aprecia en la Figura 12, después de una revisión de las concentraciones de alimentación, se descubrió que se estaba alimentando con un 57% de exceso. Se ajustó la fuente de sulfato para limitar un exceso al 25%, debido al ajuste, disminuyó la concentración de  $\text{SO}_4^{-2}$  en la alimentación. Sin embargo, en los 20 días posteriores no disminuyó la concentración de sulfatos de salida, lo que se refleja como una disminución en la eficiencia de remoción después del ajuste. La eficiencia de remoción de sulfatos a lo largo del monitoreo fue en promedio  $41.66 \pm 0.37$ .

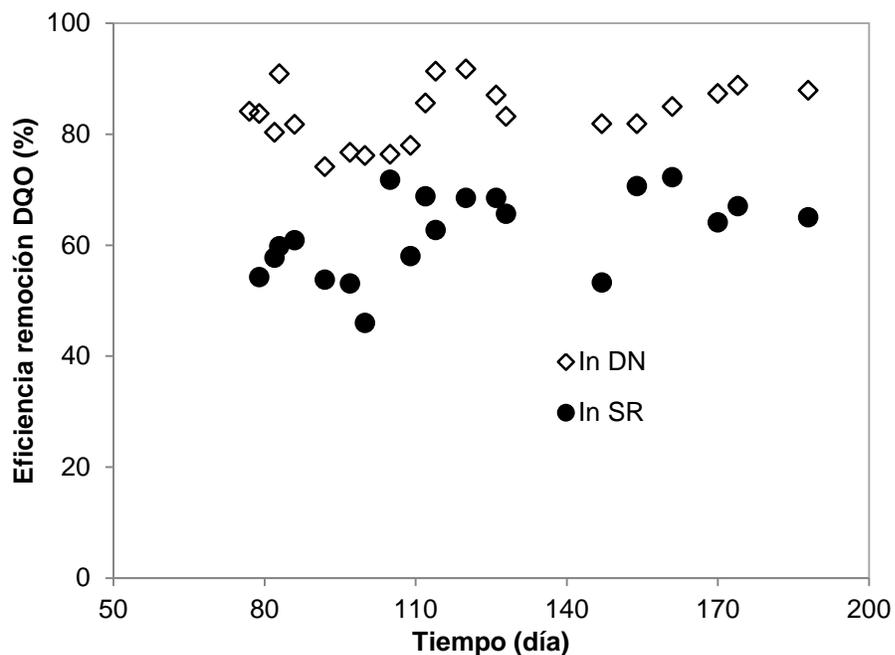


**Figura 14.** Eficiencia de remoción de sulfatos en reactor inoculador SR. El punto rojo indica el punto de ajuste de concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

### 6.3.4 Demanda química de oxígeno

En la Figura 13 se muestra el monitoreo de la  $\eta_{DQO}$ . Se puede apreciar que el reactor desnitrificante removió más materia orgánica, esto se mantuvo durante toda la etapa de adaptación.

Pese a que el comportamiento de los reactores mostró variaciones no se observó un patrón. La  $\eta_{DQO}$  promedio durante la adaptación fue  $83.49 \pm 5.26$  % ER para el reactor desnitrificante y  $62.06 \pm 7.39$  % ER para el reactor desnitrificante.



**Figura 15.** Eficiencia de remoción de DQO en ambos reactores inoculadores.

### 6.4 Actividad 3. Enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas

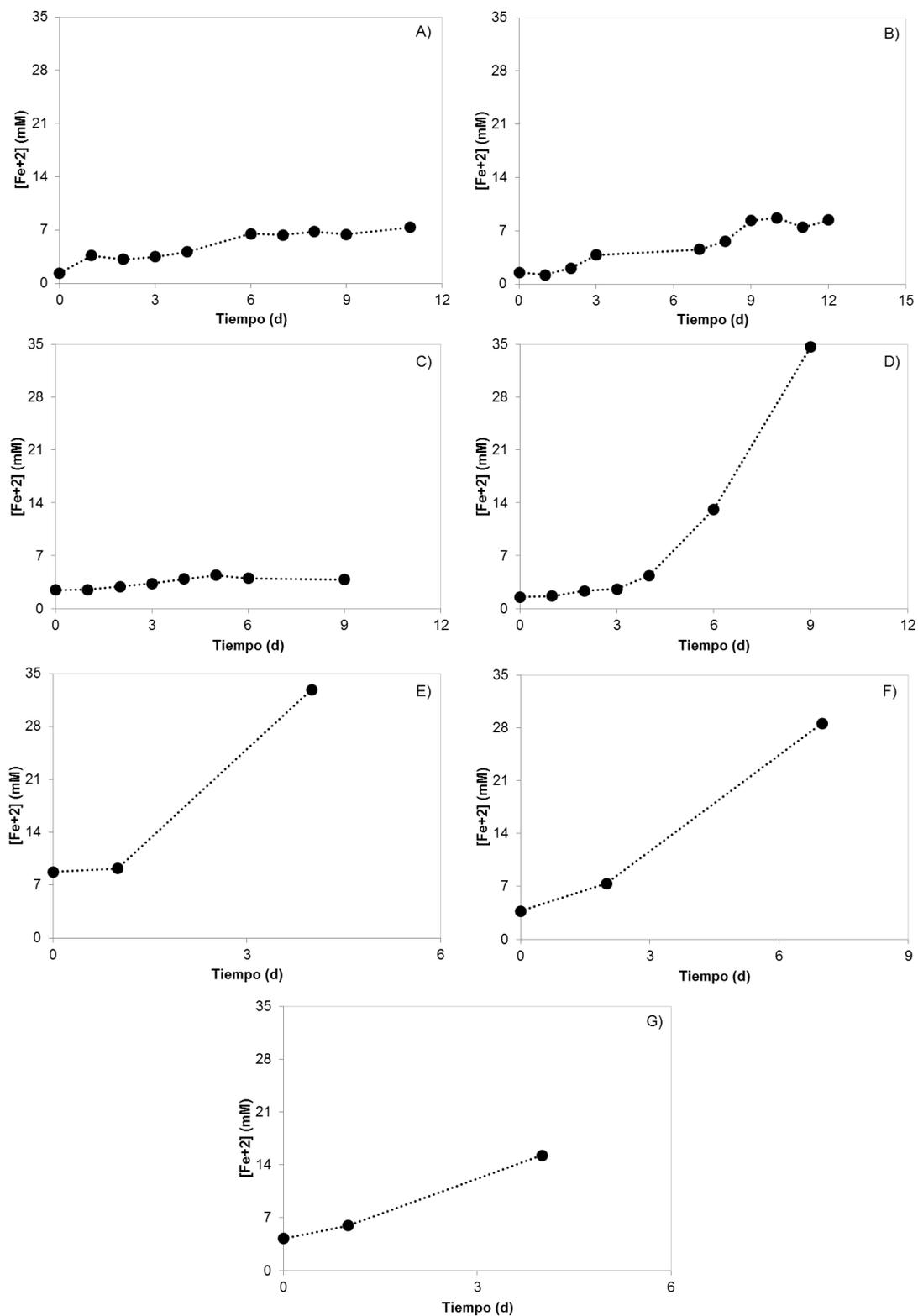
Durante el periodo de enriquecimiento se realizaron múltiples pases. El enriquecimiento de bioánodo tuvo mayor velocidad de respuesta por lo que se realizaron mayor número de pases, en el periodo de monitoreo se llevaron a cabo seis pases para el bioánodo, mientras que para el biocátodo solo se hicieron cuatro pases.

En la Tabla 8 se resumen los índices de enriquecimiento por pase tanto para bioánodo como para biocátodo. El índice de enriquecimiento ( $\epsilon$ ) se calculó como mencionó en la sección 5.3.3 de metodología.

**Tabla 8.** Índice de enriquecimiento en cada pase en enriquecimiento catódico y anódico.

	$\epsilon$ (mM Fe <sup>+2</sup> d <sup>-1</sup> )						
	Pase 0	Pase 1	Pase 2	Pase 3	Pase 4	Pase 5	Pase 6
BA	1.29	0.79	0.38	8.28	24.11	24.83	10.99
BC	0.19	6.44	2.69	0.25	0.15		
BC+FC	0.02	5.51	4.47	4.62	4.85		

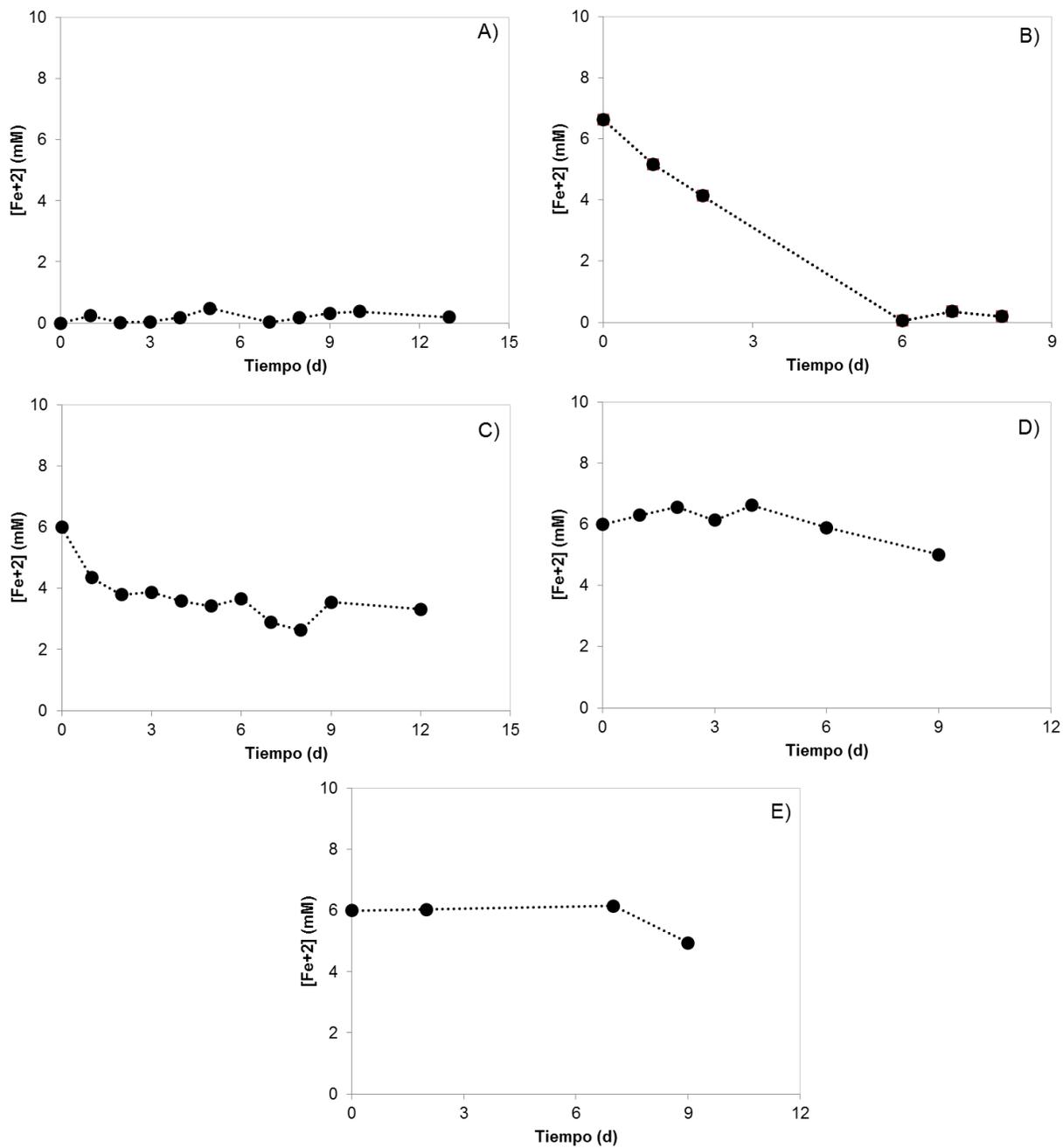
En la Figura 14 se muestra la evolución de la concentración de Fe<sup>+2</sup> en cada pase para el enriquecimiento anódico. Se observa que en los primeros tres periodos la actividad de reducción de Fe<sup>+3</sup> no despegó, por lo que las lecturas se extendieron hasta 12 días. Fue hasta el pase 3 cuando la actividad reductora despegó, obteniendo un  $\epsilon$  de 8.28 mM Fe<sup>+2</sup>/d, y alcanzando un máximo en el pase 5 con 24.83 mM Fe<sup>+2</sup>/d.



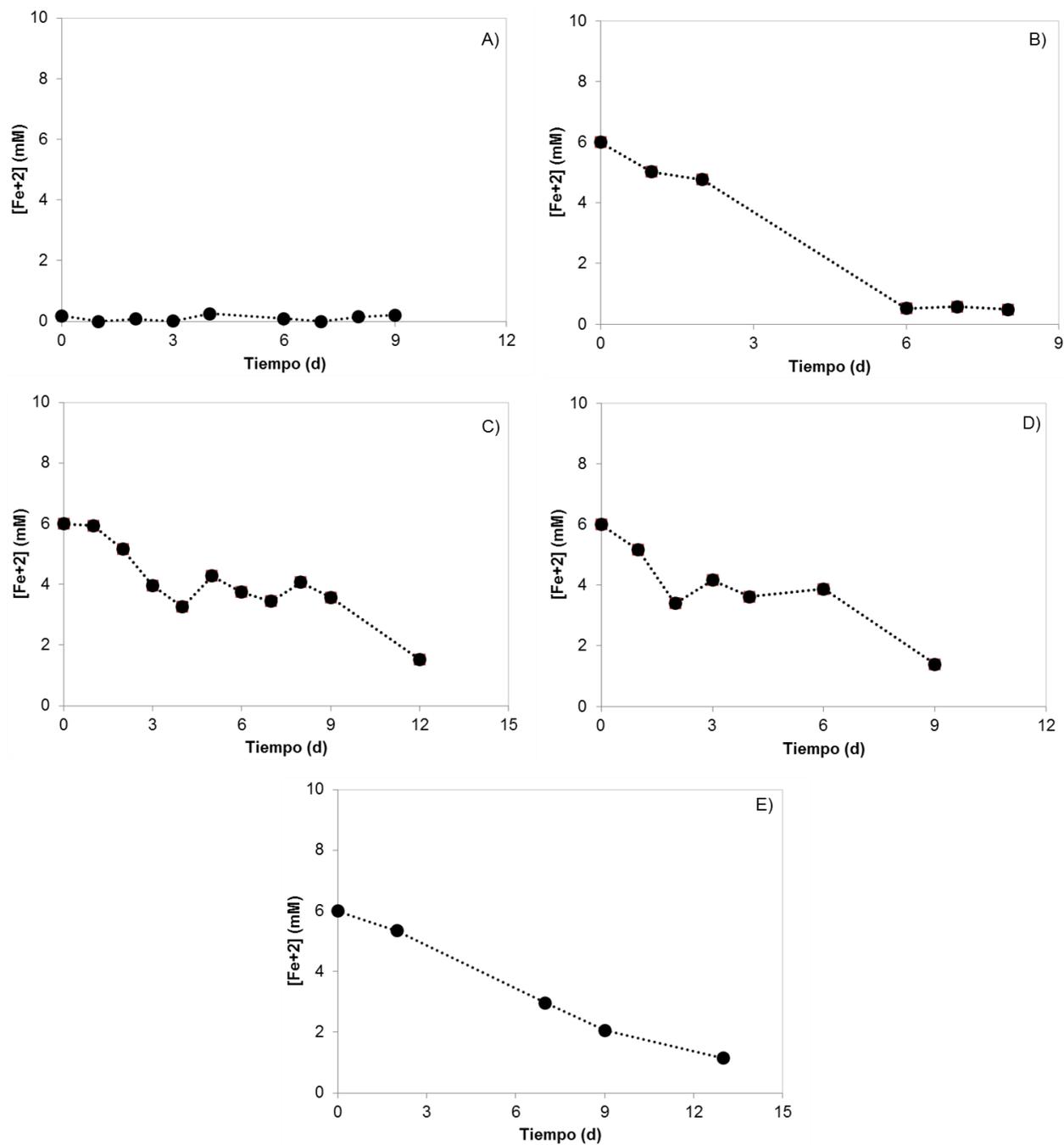
**Figura 16.** Resumen de pases de enriquecimiento anódico. A) fase 0; B) fase 1; C) fase 2; D) fase 3; E) fase 4; F) fase 5; G) fase 6.

En el caso del enriquecimiento catódico, mostró un comportamiento distinto cuando se incubó con fuente de carbono y cuando no se añadió fuente de carbono, en la Figuras 15 muestra la evolución de  $\text{Fe}^{+2}$  para la incubación sin fuente de carbono y en la Figura 16 la incubación con fuente de carbono. En el enriquecimiento sin fuente de carbono, la desaparición de  $\text{Fe}^{+2}$  disminuyó con cada pase; en contraste, los viales incubados con fuente de carbono mostraron un leve decremento en el primer pase, pero mantuvieron un índice de enriquecimiento estable en los pases siguientes, siendo el pase 1 donde se alcanzó el máximo índice de enriquecimiento de  $5.51 \text{ mM Fe}^{+2} \text{ d}^{-1}$ .

Este comportamiento en el enriquecimiento catódico se puede deber al mantenimiento de la biomasa, el metabolismo quimolitoautotrófico no puede producir suficiente biomasa en el tiempo de incubación para contrarrestar el lavado de biomasa con cada pase a un vial nuevo, mientras que los viales con fuente de carbono, el metabolismo heterotrófico que aporta la presencia de acetato de sodio, alcanzó para mantener un índice de enriquecimiento pase tras pase, sin embargo, tampoco fue suficiente para mostrar un incremento en la actividad de oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$ .



**Figura 17.** Resumen de pases de enriquecimiento catódico sin fuente de carbono. A) pase 0; B) pase 1; C) pase 2; D) pase 3; E) pase 4.



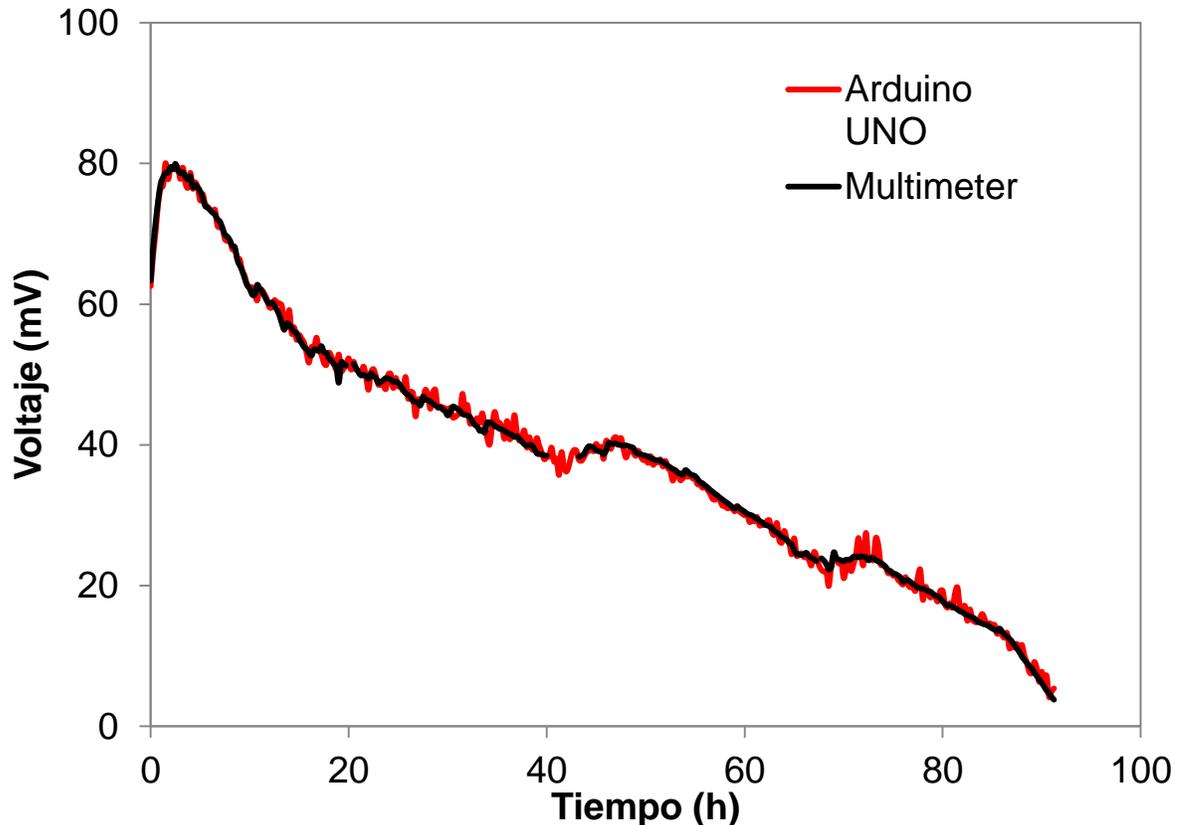
**Figura 18.** Resumen de pases de enriquecimiento catódico con fuente de carbono.

A) pase 0; B) pase 1; C) pase 2; D) pase 3; E) pase E).

## 6.5 Actividad 4. Operación en celda con cultivos enriquecidos

### 6.5.1 Validación de monitoreo de voltaje con Arduino UNO

Después de 4 días de operación de la celda, con lecturas de Arduino UNO y el multímetro comercial, el voltaje cayó a las 96.5 h. En la Figura 19 se muestra el voltaje con ambos dispositivos.



**Figura 19.** Voltaje medido con Arduino UNO vs multímetro ESCORT 3146A

Pese a que el error absoluto promedio fue de 0.73 mV, el error relativo aumenta a medida que disminuye el voltaje. Sin embargo, al permanecer constante durante toda la corrida el error absoluto promedio, podemos predecir un error relativo menor a 1% cuando se trabaje con voltajes arriba de 80 mV y menor a 2% trabajando arriba de los 40 mV, los cuales son fácilmente alcanzados con las CCM. Con estos resultados, aunado a la facilidad de captura de datos con Arduino directo a planilla de software

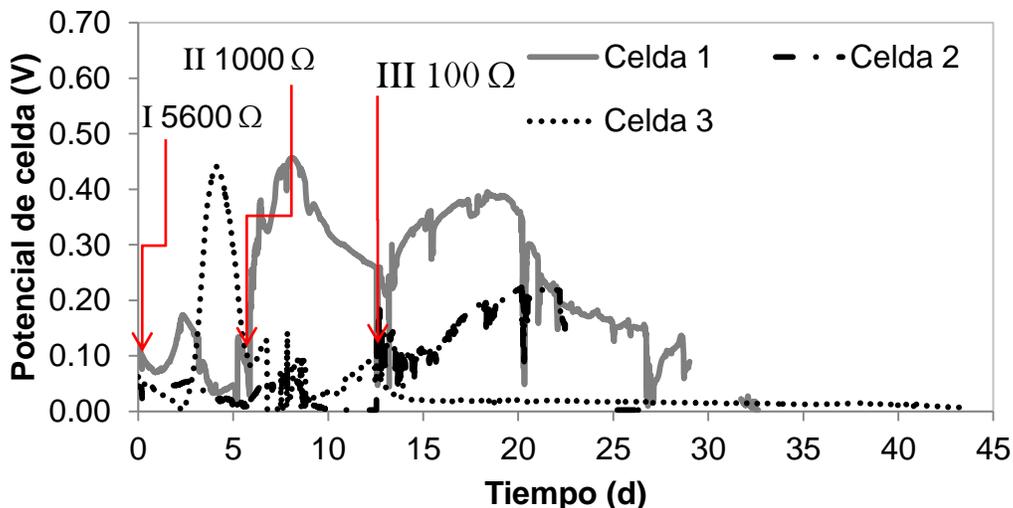
Excel (Microsoft®) se tomó la decisión de utilizar el Arduino UNO en el monitoreo de voltaje en las pruebas posteriores.

### 6.5.2 Ensayo bioelectroquímico de cultivos enriquecidos en-celda

Después de la etapa de enriquecimiento electroquímico de los cultivos, se realizó un ensayo en-celda para evaluar el efecto de enriquecer los cultivos en el desempeño de la celda.

Las celdas para el ensayo se montaron de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología.

En la Figura 20 se muestra la evolución del voltaje de las tres celdas durante los tres periodos. En ella se aprecia que aunque en el periodo I, con  $R_{ext}$  de  $5600 \Omega$ , la celda 3 con inóculos no enriquecidos fue la que mostró mayor voltaje, sin embargo, al ir disminuyendo la  $R_{ext}$ , la celda 3 pierde actividad eléctrica, mientras que celdas 1 y 2 muestran mejores resultados a medida que baja la resistencia.



**Figura 20.** Voltaje durante los tres periodos. Celda 1: BA/DN; Celda 2: BA/BC; Celda 3: SR/DN

El resumen de los parámetros eléctricos se muestra en la Tabla 10. Es notable como parámetros electroquímicos como la potencia volumétrica y densidad de corriente aumentan con cada periodo. La máxima potencia volumétrica la alcanzó la celda 1, con un  $41.13 \text{ W/m}^3$ , seguido de la celda dos con  $13.1 \text{ W/m}^3$ , siendo la celda 3 la de peor resultado con solo  $4.78 \text{ W/m}^3$ .

**Tabla 9.** Parámetros eléctricos de las tres celdas durante los tres periodos

Periodo	$E_{\text{prom}}$	$P_{V_{\text{max}}}$ ( $\text{mW/m}^3$ )	$j_{\text{max}}$ ( $\text{mA/m}^2$ )	$j_{V_{\text{max}}}$ ( $\text{mA/m}^3$ )
I 5600 $\Omega$				
Celda 1	0.09	141.51	0.80	815.46
Celda 2	0.04	13.68	0.25	253.52
Celda 3	0.16	914.16	2.04	2072.65
II 1000 $\Omega$				
Celda 1	0.34	5486.89	11.83	12016.32
Celda 2	0.02	191.84	2.21	2246.84
Celda 3	0.05	540.39	3.71	3771.05
III 100 $\Omega$				
Celda 1	0.23	41132.01	104.04	105682.20
Celda 2	0.16	13104.19	57.80	58714.56
Celda 3	0.02	478.80	4.67	4742.68

Oon et al. (2016) reportaron  $699 \text{ mW/m}^3$  y  $3.48 \text{ A/m}^3$  trabajando con nitrato como aceptor de electrones y una  $R_{\text{ext}}$  de  $1000 \Omega$ ; comparándolo contra nuestros resultados a la misma  $R_{\text{ext}}$  (periodo II), la celda 1 obtiene resultados mayores con  $5.48 \text{ W m}^{-3}$  y  $12.01 \text{ A m}^{-3}$ , sin embargo, los resultados de las celdas 2 y 3 son menores. (Zhang et al. 2011), trabajando con un biocátodo aerobio, reportaron una  $P_{V_{\text{max}}}$  de  $99 \text{ W/m}^3$  con una  $R_{\text{ext}}$  de 100 y una combinación de cepillo de fibras y

gránulos de grafito, cuando utilizaron solamente gránulos de grafito, como en el presente trabajo, su  $Pv_{max}$  disminuye a  $72.84 \text{ W/m}^3$ , con lo que sigue siendo mayor a lo obtenido en este trabajo.

Aunque se comprobó el mejoramiento del desempeño de celda con inóculo de bioánodo enriquecido, en el caso del enriquecimiento catódico no fue posible confirmarlo, ya que el desempeño de celda 1 (biocátodo no enriquecido) fue mayor a la celda 2 (biocátodo enriquecido).

Un factor que puede resultar crucial y ha sido poco abordado es la carga de biomasa en celda. En este experimento las concentraciones de los inóculos fueron (en mg/L): BA 125, BC 110, SR 450 y DN 1035. En base a lo anterior, las celdas inoculadas con mostraron un mejor desempeño que aquellas inoculadas con SR, aunque la carga de biomasa fue 260 % mayor para el inóculo SR, esto confirma los beneficios del enriquecimiento del bioánodo. En el biocátodo la celda 2 no pudo superar el desempeño de la celda 1 con inóculo no enriquecido, esto indica que el cultivo desnitrificante es capaz, hasta cierto punto, de soportar la corriente generada en el bioánodo enriquecido. La potencia volumétrica promedio de la celda 1 fue de  $18.41 \text{ W/m}^3$  la cual fue más del doble que la producida por la celda 2 ( $7.36 \text{ W/m}^3$ ). Sin embargo, la carga de biomasa fue casi 10 veces mayor en el cátodo de la celda 1 que en la celda 2. Esta no proporcionalidad entre la energía generada y la carga de biomasa podría indicar una mayor actividad en el inóculo enriquecido.

## **6.6 Actividad 5. Aclimatación de los cultivos enriquecidos BEA a tetracloruro de carbono**

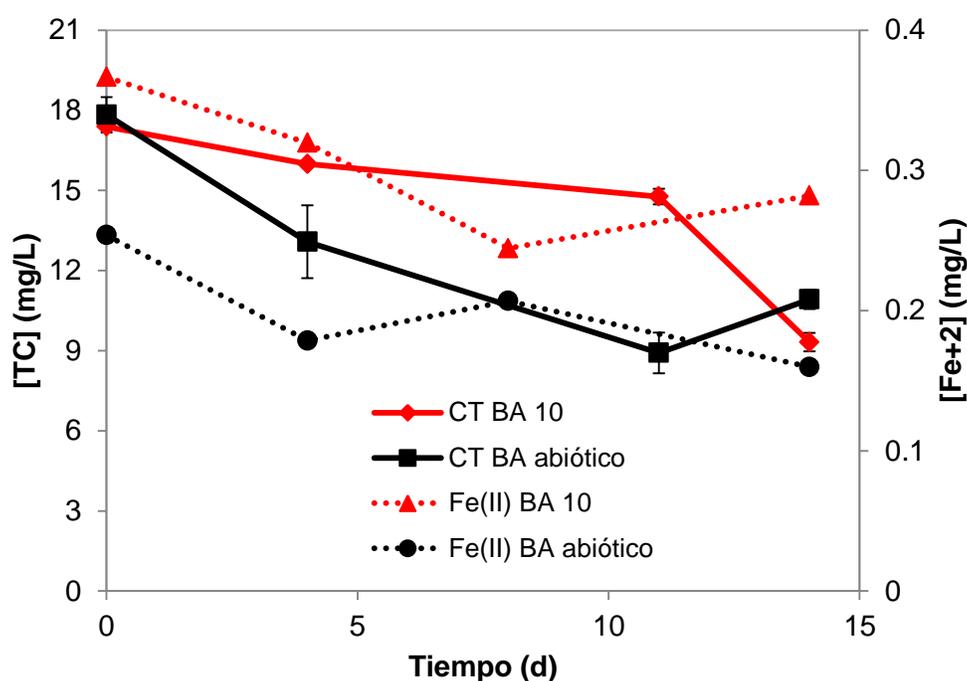
En el ensayo 1 de aclimatación (realizados en reactores con 0.5 V de operación), debido al sistema de alimentación semi-continuo, hubo dificultades para monitorear la remoción de TC, ya que las pérdidas por volatilidad fueron muy altas.

Además, después de cerca de dos semanas en el reactor en presencia de TC, el cultivo de bioánodo perdió actividad reductora de  $\text{Fe}^{+3}$ . Por lo que se optó por una aclimatación a TC en botellas serológicas.

En el segundo ensayo (botellas serológicas, viales) se pudo dar mejor seguimiento a la remoción de TC, y mostró aparentemente buenos resultados. El primer pase, a concentraciones de 2.5 y 5 mg/L de TC, mostró una buena eficiencia de remoción (ER) del contaminante: 92 %ER para BA 2.5 mg/L TC, 87.6 %ER para BA 5 mg/L TC, 61 % ER para BC 2.5 mg/L TC y 47 %ER para BC 5 mg/L TC. Aunado a esto, la técnica de aclimatación en viales, a concentraciones de 2.5 y 5 mg/L de TC, también fue sido capaz de retomar la actividad hierro reductora/oxidante de Fe, por lo que el método de aclimatación en viales de enriquecimiento parece facilitar el manejo y contención del contaminante, muestreo, y conservar la actividad reductora/oxidante de los cultivos; por lo que es una opción más factible para la aclimatación a un contaminante volátil.

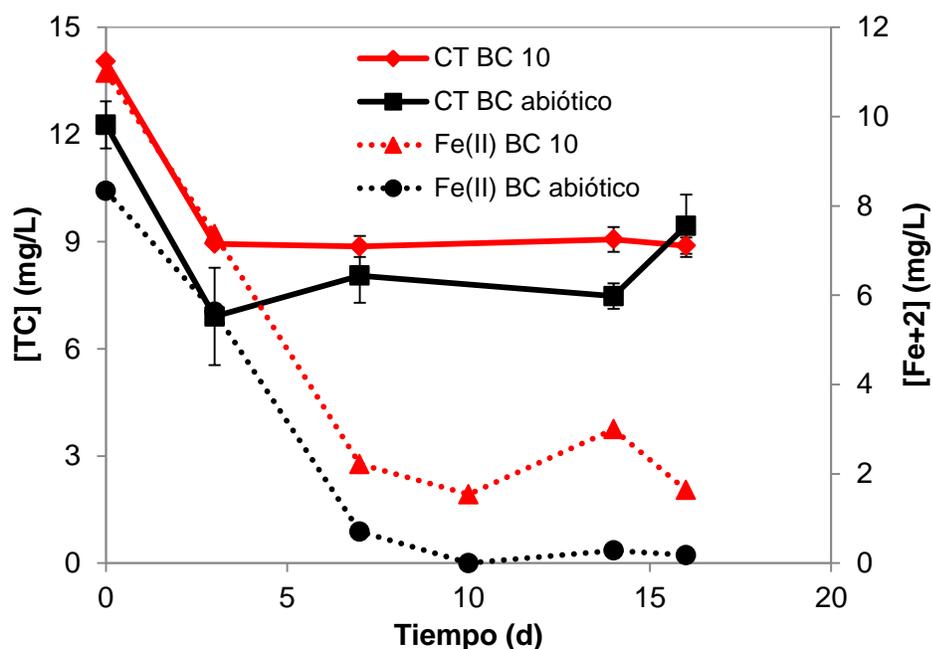
En los siguientes pases de aclimatación, aumentando las concentraciones de TC, aumentó la concentración removida, sin embargo, la eficiencia de remoción no mostró aumento, al contrario, disminuyó al aumentar la concentración, observando en el pase 3 eficiencias de remoción de 46.4 % para BA 10 y de 36.7 % para BC 10. Pese a que la cantidad removida aumentó a medida que continuaban los pases, la

similitud con los resultados del control abiótico (Figura 21 y 22) ponen en duda la capacidad de los cultivos de ejercer la dechloración reductiva dentro de los viales, y la remoción se esté llevando a cabo por mecanismos abióticos como fuga, volatilización y por reducción por  $\text{Fe}^{+2}$ , en el caso de este último se puede apreciar con la desaparición del ion  $\text{Fe}^{+2}$  en la aclimatación de BC tanto en biótico como en abiótico. Erbs *et al.* (1999) reportaron la reducción de TC por hidróxidos de  $\text{Fe}^{+2}$ - $\text{Fe}^{+3}$  de manera eficiente, sin embargo, no fueron capaces de reducir los metabolitos menos clorados, inclusive detectaron la formación de hexacloroetano por unión de radicales  $\text{CCl}_3\cdot$ .



**Figura 21.** Seguimiento de remoción de TC y evolución de Fe (II) en el pase 3 de aclimatación de BA.

Ayala-Luis *et al.* (2012), en un estudio más reciente con hidróxidos de  $\text{Fe}^{+2}$ - $\text{Fe}^{+3}$ , si lograron una remoción eficiente de sus metabolitos, solo con aparición de CF como el 6% de los productos.



**Figura 22.** Seguimiento de remoción de TC y evolución de Fe (II) en el pase 3 de la aclimatación de BC.

También se ha reportado la reducción de TC por  $\text{Fe}^0$ . Chen *et al.* (2008) trabajaron con partículas bimetálicas de  $\text{Al/Fe}^0$ , removieron el 97% de una concentración inicial de TC de 31.7 mg/L en 60 h, obteniendo como productos solamente 9% de CF, 17 % de diclorometano como productos clorados.

Debido a que la reducción de TC por especies férricas ha sido reportada y a que la remoción en viales inóculados fue similar a la de los controles abióticos, no se pudo confirmar la participación de la actividad microbiana en la remoción de tetracloruro de carbono dentro de los viales de aclimatación. En la Tabla 9 se muestra el resumen de remoción y eficiencia de remoción por pase durante la aclimatación.

**Tabla 10.** Resumen de la remoción de TC durante todos los pases de viales. \*NR: no replica.

Pase	Muestra	Remoción (mg/L)	Eficiencia de remoción (%)
0	BA 2.5	1.96 ± NR	92.80 ± NR
0	BA 5	3.30 ± NR	87.62 ± NR
0	BC 2.5	1.82 ± NR	61.80 ± NR
0	BC 5	1.36 ± NR	47.17 ± NR
1	BA 2.5	1.73 ± NR	94.63 ± NR
1	BA 5	1.21 ± NR	26.83 ± NR
1	BC 5	2.71 ± NR	55.29 ± NR
1	BC 10	8.68 ± NR	66.75 ± NR
2	BA 5	1.98 ± 0.72	21.85 ± 5.95
2	BC 10	7.91 ± 0.24	51.37 ± 0.74
3	BA 10	8.07 ± 0.36	46.40 ± 0.67
3	BC 10	6.20 ± 1.47	45.41 ± 12.3

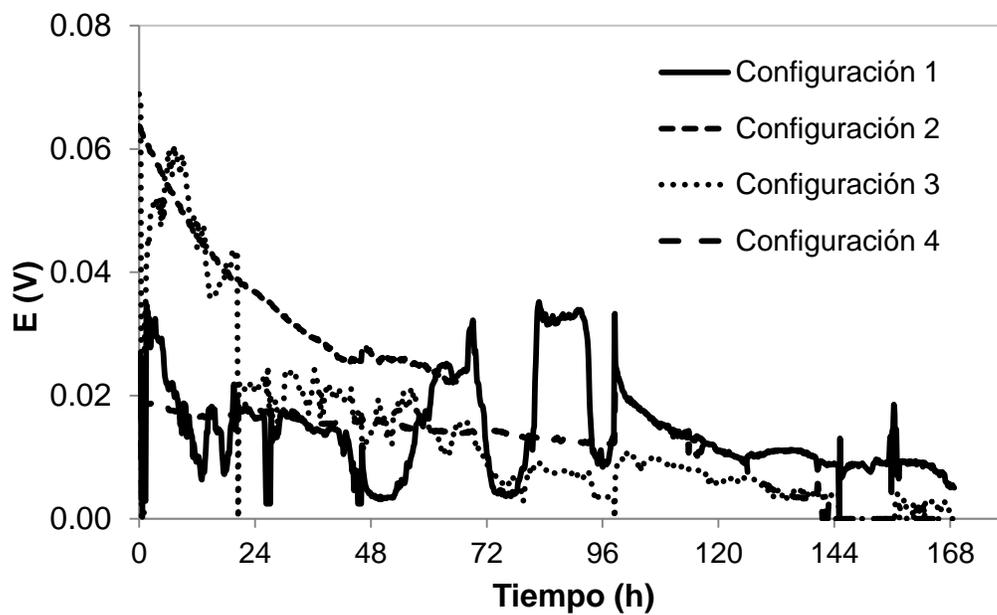
\* BA: cultivo anódico; BC: cultivo catódico; NR: sin réplica; 2.5, 5 y 10: concentración de TC.

## 6.7 Actividad 6. Operación de celdas en presencia de tetracloruro de carbono

### 6.6.1 Desempeño electroquímico de las celdas en presencia de tetracloruro de carbono

En esta actividad se evaluaron los cultivos seleccionados en su degradación de tetracloruro de carbono, y su desempeño en celda. Los cultivos seleccionados fueron BA para el bioánodo y BCTC para el biocátodo.

El periodo de adaptación en celda se realizó bajando resistencias externas gradualmente, de acuerdo a lo descrito en metodología. Sin embargo, El desempeño de las celdas fue mucho más bajo de lo esperado, con voltajes promedios debajo de los 50 mV, operando con 1000 Ohm como resistencia externa (Figura 21).



**Figura 23.** Voltaje de las configuraciones 1, 2, 3 y 4 en la operación en presencia de TC.

Se observó que el voltaje de las configuraciones 2, 3 y 4 cayó hasta 0 mV a partir del 6 día, mientras que la configuración 1 operó hasta 10 días sin llegar a 0 mV, aunque manteniéndose a un voltaje bajo. Se realimentó las configuraciones 1 y 3 para ver si la caída de voltaje era debida a la falta de sustratos, no obstante, el voltaje no subió. Esto parece indicar que el cultivo catódico quedó incapacitado por la presencia del contaminante. Sin embargo, a los 6 días la concentración de TC es muy baja para todas las configuraciones, de algún metabolito o subproducto de gran toxicidad.

### 6.6.2 Remoción de tetracloruro de carbono con las diferentes configuraciones de operación

Pese al bajo desempeño electroquímico se inició el monitoreo de remoción de tetracloruro de carbono. En la Tabla 11 se muestra el resumen de las lecturas de concentración de TC (tetracloruro de carbono) y CF (cloroformo) en todas las

configuraciones de operación. No se incluyen los tiempos 0 debido a que por problemas de mezclado, fue difícil obtener la concentración calculada, por lo que se definieron como 10 mg/L de TC al tiempo inicial de cada configuración de operación. Las configuraciones de operación fueron las mostradas en la Figura 1.

Es observable que en los primero dos días ocurrieron los mayores cambios en la concentración de contaminante, en los días posteriores las concentraciones de tanto TC como CF fueron prácticamente estables o no mostraron un patrón de aumento ni remoción posterior.

En el día uno se observa que todas las configuraciones muestran una gran disminución en la concentración de TC. Para evaluar si esta remoción es debida a factores físicos, como volatilidad, se corrieron dos controles abióticos, uno en celda y otro en viales herméticamente cerrados.

La concentración de TC y CF en el control abiótico en viales fue constante hasta el día 3, donde comenzó a disminuir TC. La concentración de CF fue inexistente durante el control en viales, esto prueba que no hubo transformación de TC a CF, y la remoción de TC a partir del día 3 se puede deber a que se acumuló TC en el espacio generado por el muestreo previo, y pudo haber escapado al momento al introducir o retirar la jeringa.

**Tabla 11.** Concentración de tetracloruro de carbono y cloroformo durante seis días de operación para las diferentes configuraciones de operación, en mg/L.

Configuración	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6	
	TC	CF	TC	CF	TC	CF	TC	CF	TC	CF	TC	CF
1 (Ánodo)	0.55 ± 0.095	4.78 ± 0.52	-	-	0.024 ± 0.012	2.24 ± 2.03	0.012 ± 0.003	2.64 ± 1.28	0.076 ± 0.082	4.36 ± 1.13	0.065 ± 0.018	2.99 ± 1.42
2 (Cátodo)	0.28 ± 0.022	1.20 ± 0.073	0.11 ± 0.006	2.52 ± 0.011	-	-	0.027 ± 0.000	0.69 ± 0.013	-	-	-	-
3 (Ánodo)	1.94 ± 1.19	2.07 ± 1.77	0.10 ± 0.017	3.72 ± 0.045	-	-	0.037 ± 0.003	2.72 ± 0.49	-	-	0.035 ± 0.000	3.28 ± 0.053
3 (Cátodo)	1.89 ± NR	< 0.03	0.17 ± 0.001	2.33 ± 0.074	-	-	0.043 ± 0.024	2.38 ± NR	-	-	0.039 ± 0.000	2.19 ± 0.080
4 (Cátodo)	1.00 ± 0.47	2.23 ± 0.56	0.077 ± NR	2.62 ± NR	-	-	0.042 ± 0.002	1.52 ± 0.15	-	-	0.033 ± 0.000	2.14 ± 0.018
5 (OCV Ánodo)	6.25 ± 2.61	5.91 ± 0.013	0.09 ± 0.008	3.05 ± 0.80	0.06 ± 0.001	3.69 ± 0.063	-	-	-	-	-	-
5 (OCV Cátodo)	8.41 ± 0.98	1.56 ± 0.32	0.22 ± NR	1.62 ± NR	0.081 ± 0.040	1.80 ± 1.22	-	-	-	-	-	-
6 (Celda)	7.75 ± 0.54	0.60 ±	3.83 ± 0.57	0.70 ± NR	0.31 ± 0.023	0.69 ± 0.093	-	-	-	-	-	-
Abiótico en viales	10.00	< 0.03	10.00	< 0.03	6.42 ± 0.79	<0.03	-	-	2.07 ± 0.003	< 0.03	-	-

\*TC; tetracloruro de carbono; CF: cloroformo, NR: sin réplica.

En el caso del control abiótico en celda, muestra una disminución en la concentración de TC, sin embargo, mucho menor a las corridas con bioánodo o biocátodo. La concentración de TC al día 1 para el control abiótico en celda fue similar a la encontrada en la celda operada en circuito abierto tanto en ánodo como cátodo. La baja concentración de CF mostrada en la celda abiótica pueden deberse a remanentes de corridas anteriores que hayan provocado cierta aparición de CF, aunque la concentración se mantuvo baja y no aumentó con el tiempo.

En las configuraciones con bioánodo y biocátodo activos se observaron patrones que se repiten de acuerdo al tipo de inóculo. Las configuraciones con TC en el ánodo fueron las que mostraron aparición de CF a con mayores concentraciones. Siendo la configuración 5 (bioánodo en OCV) donde se alcanzó la mayor concentración de CF con  $5.91 \pm 0.013$  mg/L a las primeras 24 hr, seguido por la configuración 1 (solo bioánodo con TC), con  $4.78 \pm 0.51$  mg/L a las 24 h y configuración 3 (bioánodo, TC en ambas cámaras) con  $3.72 \pm 0.04$  las 48 h. Esto puede indicar que la configuración 5, al no transferir electrones al cátodo, tuvo mayor eficiencia en utilizar el TC como aceptor de electrones, llevándose a cabo la reducción de TC como una respiración anaerobia. Sin embargo, La concentración de CF no mostró patrones convincentes de desaparición, con altibajos en los días siguientes, por lo que se puede intuir que el cloroformo sea un compuesto más difícil de eliminar que el tetracloruro de carbono, además cuenta con una solubilidad en agua 10 veces mayor que el TC, por lo que su eliminación física no se presentara por volatilización. Este resultado concuerda con lo reportado por de Best et al. (1998), quienes trabajando con cultivo mixto en condiciones sulfato reductoras, encontraron

que las bacterias sulfato reductoras eran capaces de reducir TC a CF y DCM, siendo CF el principal producto, y DCM no apareció hasta la cuarta semana. Sin embargo, una reducción posterior se lo atribuye a otro grupo de bacterias.

En el caso del biocátodo, se encontró que las configuraciones con TC únicamente en el cátodo mostraron mayor eliminación de TC que su contraparte anódica en las primeras 24 h, la configuración 2 obtuvo la menor concentración del contaminante a las 24 h con  $0.28 \pm 0.022 \text{ mg L}^{-1}$ . Además de que la aparición de CF fue menor que la obtenida en las cámaras anódicas, manteniéndose a una concentración menor a  $2 \text{ mg L}^{-1}$ .

Teniendo en cuenta la pérdida de TC por día en el control abiótico en celda, podemos estimar una pérdida base, debida a manejo de celda y alta volatilidad de TC, por día de  $3.22 \text{ mg/L}$ . Con esta pérdida base podemos calcular una remoción neta de TC, con lo que podemos discriminar lo que se transformó a cloroformo y lo que se llevó a otros productos. En la Tabla 12 se hace el resumen de la eficiencia de remoción de TC por configuración, además se incluye que porcentaje de la remoción se transformó a CF y cuanto a otros productos, se tomaron las concentraciones a 24 h para hacer los cálculos eficiencia de remoción  $\text{d}^{-1}$ .

La remoción neta se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de remoción } \text{d}^{-1} = \frac{(TC_i - TC_{24h} - Pb)}{TC_i} \times 100 \quad \text{Ec. 11}$$

Donde:

$TC_i$  = concentración de TC inicial

$TC_{24h}$  = concentración de TC a las 24 h

$Pb$  = pérdida base ( $3.22$  en este caso)

**Tabla 12.** Resumen de remoción de TC y producción de otros compuestos.

	Eficiencia de remoción de TC (%/d)	Producción de CF (%)	Otros productos (%)
Configuración 1	62.3	76.73	23.27
Configuración 2	65	18.46	81.54
Configuración 3 (Ánodo)	48.4	42.77	57.23
Configuración 3 (Cátodo)	48.9	-	100.00
Configuración 4	57.8	38.58	61.42

De acuerdo a los resultados de la Tabla 12 podemos detectar ciertos patrones. En las configuraciones con cámara anódica podemos observar que el principal producto es el cloroformo, mientras que en el cátodo se obtuvo en mayor proporción otros productos. Esto podría explicar la caída de voltaje en las celdas con TC en cámara catódica, al producirse un subproducto de mayor toxicidad que TC y CF que haya afectado en gran medida el cultivo catódico, que aún con medio nuevo no pudo recuperar su actividad electroquímica.

## VII CONCLUSIÓN

El ensayo electroquímico de los cultivos enriquecidos mostró que el enriquecimiento catódico mejora de gran manera el desempeño electroquímico de la celda, y es hasta nuestro conocimiento la primera vez que se utiliza bioánodo enriquecido en una celda de doble cámara.

No se pudo comprobar el beneficio del enriquecimiento catódico en el desempeño electroquímico de la celda, se necesitan más estudios con mayor control en la técnica de enriquecimiento catódico.

La etapa de aclimatación no mostró avance en la remoción de TC, ya que los resultados no sobrepasaron el control abiótico. Aunado a esto es de mencionar que el cultivo anódico perdió actividad tras el periodo de aclimatación, por lo que la presencia prolongada de TC parece afectar de mayor manera al cultivo anódico.

La remoción de TC en celda fue mayor a lo obtenido en aclimatación, con actividad de remoción tanto en ánodo como en cátodo. El principal producto del ánodo es el cloroformo. Las operaciones en cátodo muestran una reducción más allá del cloroformo, pero se asume que hay producción de algún metabolito o subproducto de alta toxicidad.

En trabajos próximos se pueden incluir etapas que favorezcan la producción de biomasa, ya que la serie de presiones selectivas forzaron de gran manera los cultivos, y no tuvieron tiempo para recuperarse. Por lo que factores como carga de biomasa pueden tener un papel clave y pueden ser abordados.

Con los resultados obtenidos se puede mencionar que se logró una remoción de gran parte del contaminante. Es la primera vez, a nuestro conocimiento, que se evalúa la remoción de TC en un sistema bioelectroquímico. El BES mostró que la

reducción electroquímicamente asistida en cátodos logró mayor reducción de TC y CF que la respiración anaerobia reportada hasta el momento en nuestra búsqueda bibliográfica.

Este dispositivo puede funcionar en operación continua, ya que la acumulación de productos afecta el desempeño.

## VIII PERSPECTIVAS

El presente trabajo mostró que la digestión bioelectroquímicamente asistida fue eficiente en la remoción de TC. Sin embargo, no se confirmó que el enriquecimiento ni la aclimatación mejoraran el desempeño del biocátodo. Esto se puede deber en parte a que las etapas de enriquecimiento y aclimatación, al ser presiones selectivas de larga duración, terminaron afectando el cultivo. En estudios futuros con biocátodo enriquecido, será conveniente incluir etapas de recuperación del cultivo, para evitar que bajen el desempeño, pierdan biomasa o pierdan toda actividad.

Lo anterior se puede observar en el desempeño electroquímico, donde en las pruebas en celda después del enriquecimiento tuvieron alto desempeño. En cambio, después de someter los cultivos a la aclimatación y a mayor tiempo de presión selectiva, el desempeño electroquímico fue muy pobre en la operación con TC.

Una alternativa que se puede abordar al seguir trabajando con enriquecimiento de biocátodos es el enriquecimiento en celda. De esta manera, con un voltaje impuesto se facilita la polarización, los cultivos se adaptan a la celda en menos tiempo y se acortan los periodos de enriquecimiento en viales.

Para estudios posteriores de reducción bioelectroquímicamente asistida para el tratamiento de efluentes, se puede considerar trabajar en operación CEM.

## IX REFERENCIAS

- Aulenta, F. et al., 2010. Characterization of an electro-active biocathode capable of dechlorinating trichloroethene and cis-dichloroethene to ethene. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(7), pp.1796–1802. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2009.12.033>.
- Aulenta, F. et al., 2011. Dechlorination of trichloroethene in a continuous-flow bioelectrochemical reactor: Effect of cathode potential on rate, selectivity, and electron transfer mechanisms. *Environmental Science and Technology*, 45(19), pp.8444–8451.
- Aulenta, F. et al., 2007. Electron transfer from a solid-state electrode assisted by methyl viologen sustains efficient microbial reductive dechlorination of TCE. *Environmental Science and Technology*, 41(7), pp.2554–2559.
- Aulenta, F. et al., 2009. Influence of mediator immobilization on the electrochemically assisted microbial dechlorination of trichloroethene (TCE) and cis-dichloroethene (cis-DCE). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(6), pp.864–870.
- Aulenta, F., Reale, P., et al., 2008. Kinetics of trichloroethene dechlorination and methane formation by a mixed anaerobic culture in a bio-electrochemical system. *Electrochimica Acta*, 53(16), pp.5300–5305.
- Aulenta, F., Canosa, A., et al., 2008. Trichloroethene dechlorination and H<sub>2</sub> evolution are alternative biological pathways of electric charge utilization by a dechlorinating culture in a bioelectrochemical system. *Environmental Science and Technology*, 42(16), pp.6185–6190.
- Ayala-Luis, K.B. et al., 2012. Efficient dechlorination of carbon tetrachloride by hydrophobic green rust intercalated with dodecanoate anions. *Environmental Science and Technology*, 46(6), pp.3390–3397.
- De Best, J.H. et al., 1999. Transformation of carbon tetrachloride in an anaerobic packed-bed reactor without addition of another electron donor. *Biodegradation*, 10(4), pp.287–295.
- de Best, J.H. et al., 1998. Transformation of carbon tetrachloride under sulfate reducing conditions. *Biodegradation*, 8(6), pp.429–436.

- Boopathy, R., 2002. Anaerobic biotransformation of carbon tetrachloride under various electron acceptor conditions. *Bioresource Technology*, 84(1), pp.69–73.
- Bower, E. et al., 1983. Transformation of halogenated organic compounds under denitrification conditions. *Applied and environmental microbiology*, 45(4), pp.1295–1299. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=242453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>  
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Transformation+of+halogenated+organic+compounds+under+denitrification+conditions#1>.
- Butler, C.S. et al., 2010. Bioelectrochemical perchlorate reduction in a microbial fuel cell. *Environmental Science and Technology*, 44(12), pp.4685–4691.
- Cervantes, F.J. et al., 2004. Quinone-respiration improves dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), pp.702–711.
- Chen, L.H., Huang, C.C. & Lien, H.L., 2008. Bimetallic iron-aluminum particles for dechlorination of carbon tetrachloride. *Chemosphere*, 73(5), pp.692–697.
- Clauwaert, P. et al., 2007. Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 41(9), pp.3354–3360.
- Clauwaert, P. & Verstraete, W., 2009. Methanogenesis in membraneless microbial electrolysis cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), pp.829–836.
- Collins, R. & Picardal, F., 1999. Enhanced anaerobic transformations of carbon tetrachloride by soil organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(12), pp.2703–2710.
- Criddle, C.S. et al., 1990. Transformation of carbon tetrachloride by *Pseudomonas* sp. strain KC under denitrification conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), pp.3240–3246.
- Doong, R.A., Chen, T.F. & Wu, Y.W., 1997. Anaerobic dechlorination of carbon tetrachloride by free-living and attached bacteria under various electron-donor conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(3), pp.317–323.
- Du, Z., Li, H. & Gu, T., 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*, 25(5), pp.464–482.

- Erbs, M., Christian, H. & Hansen, B., 1999. Reductive Dechlorination of Carbon Tetrachloride Using Iron ( II ) Iron ( III ) Hydroxide Sulfate ( Green Rust ). *Environmental Science & Technology*, (li), pp.307–311.
- Faroon, O., 2005. *Toxicological profile for carbon tetrachloride*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Franks, A.E. & Nevin, K.P., 2010. Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies*, 3(5), pp.899–919. Available at: <http://www.mdpi.com/1996-1073/3/5/899/htm> [Accessed May 26, 2016].
- Gregoire, K.P. et al., 2014. Enrichment of a High-Current Density Denitrifying Microbial Biocathode. *Journal of The Electrochemical Society*, 161(13), pp.H3049–H3057.
- Guo, W.Q. et al., 2015. Reduction of 4-chloronitrobenzene in a bioelectrochemical reactor with biocathode at ambient temperature for a long-term operation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 46, pp.119–124. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2014.09.009>.
- Gurung, A. & Oh, S.E., 2012. Application of Biocathodes in Microbial Fuel Cells : Opportunities and Challenges Application of Microbial Fuel Cells ( MFCs ). , 45(3), pp.410–420.
- He, Z. & Angenent, L.T., 2006. Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. *Electroanalysis*, 18(19-20), pp.2009–2015.
- Hernandez-flores, G., Solorza-feria, O. & Ponce-noyola, M.T., 2013. Improvement of Microbial Fuel Cell Characteristics by Inoculum Enrichment and Selection of Anodic Materials. , 129, pp.121–129.
- Holliger, C. & Schumacher, W., 1994. Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1-3), pp.239–246.
- Huang, L. et al., 2014. Anaerobic/aerobic conditions and biostimulation for enhanced chlorophenols degradation in biocathode microbial fuel cells. *Biodegradation*, 25(4), pp.615–632.
- Huang, L., Regan, J.M. & Quan, X., 2011. Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(1), pp.316–323. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.096>.

- Jafary, T. et al., 2015. Biocathode in microbial electrolysis cell; Present status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, pp.23–33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.003>.
- Kalathil, S. et al., 2013. Production of bioelectricity, bio-hydrogen, high value chemicals and bioinspired nanomaterials by electrochemically active biofilms. *Biotechnology Advances*, 31(6), pp.915–924. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.001>.
- Koenig, J.C., Lee, M.J. & Manefield, M., 2012. Successful microcosm demonstration of a strategy for biodegradation of a mixture of carbon tetrachloride and perchloroethene harnessing sulfate reducing and dehalorespiring bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 219-220, pp.169–175. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.076>.
- Kokabian, B. & Gude, V.G., 2015. Sustainable photosynthetic biocathode in microbial desalination cells. *Chemical Engineering Journal*, 262, pp.958–965. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.048>.
- Kong, F., Wang, A., Ren, H.Y., et al., 2014. Improved dechlorination and mineralization of 4-chlorophenol in a sequential biocathode-bioanode bioelectrochemical system with mixed photosynthetic bacteria. *Bioresource Technology*, 158, pp.32–38. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.142>.
- Kong, F., Wang, A. & Ren, H.Y., 2014. Improved 4-chlorophenol dechlorination at biocathode in bioelectrochemical system using optimized modular cathode design with composite stainless steel and carbon-based materials. *Bioresource Technology*, 166, pp.252–258. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.049>.
- Li, J.J. et al., 2015. Perchlorate reduction in microbial electrolysis cell with polyaniline modified cathode. *Bioresource Technology*, 177, pp.74–79. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.065>.
- Liang, B. et al., 2013. Accelerated reduction of chlorinated nitroaromatic antibiotic chloramphenicol by biocathode. *Environmental Science and Technology*, 47(10), pp.5353–5361.
- Liu, D. et al., 2013. Direct electron transfer from electrode to electrochemically active

- bacteria in a bioelectrochemical dechlorination system. *Bioresource Technology*, 148, pp.9–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.108>.
- Liu, H., Grot, S. & Logan, B.E., 2005. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environmental Science and Technology*, 39(11), pp.4317–4320.
- Liu, X.W., Li, W.W. & Yu, H.Q., 2014. Cathodic catalysts in bioelectrochemical systems for energy recovery from wastewater. *Chem Soc Rev*, 43(22), pp.7718–7745. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23959403>.
- Logan, B.E., 2007. *Microbial Fuel Cells*, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444531995000981>.
- Logan, B.E., Rabaey, K. & Verstraete, W., 2006. Critical Review Microbial Fuel Cells : Methodology and Technology. *Environmental Science & Technology*, 40(17), pp.5181–5192. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0605016>.
- Lovley, D.R. & Phillips, E.J.P., 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(4), pp.683–689.
- Lovley, D.R. & Phillips, E.J.P., 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7), pp.1536–1540.
- Ma, J. et al., 2014. Bioelectricity generation through microbial fuel cell using matters recovered from municipal wastewater. *Environmental Process & Sustainable Energy*, 33(1), pp.290–297.
- Mieseler, M. et al., 2013. Direct enrichment of perchlorate-reducing microbial community for efficient electroactive perchlorate reduction in biocathodes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(11), pp.1321–1327.
- Oon, Y.-S. et al., 2016. Long-term operation of double chambered microbial fuel cell for bio-electro denitrification. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(6), pp.893–900. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00449-016-1568-y>.
- Pant, D. et al., 2010. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology*, 101(6), pp.1533–1543. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.017>.

- Penny, C., Vuilleumier, S. & Bringel, F., 2010. Microbial degradation of tetrachloromethane: Mechanisms and perspectives for bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(2), pp.257–275.
- Picardal, F., Arnold, R.G.R.G. & Huey, B.B.B., 1995. Effects of electron donor and acceptor conditions on reductive dehalogenation of tetrachloromethane by *Shewanella putrefaciens*. *Applied and environmental ...*, 61(1), pp.8–12. Available at: <http://aem.asm.org/content/61/1/8.short> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=167256&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Poggi-Varaldo, H.M. & Valdéz-Ledezma, L., 1995. Optimization of dry anaerobic digestion start-up. In *Proceeding of the 17th Canadian Waste Management Conference September*. pp. 11–14.
- Pous, N. et al., 2013. Bioremediation of nitrate-polluted groundwater in a microbial fuel cell. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(9), pp.1690–1696.
- Pous, N. et al., 2015. Cathode potential and anode electron donor evaluation for a suitable treatment of nitrate-contaminated groundwater in bioelectrochemical systems. *Chemical Engineering Journal*, 263, pp.151–159. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.11.002>.
- Revelo, D.M., Hurtado, N.H. & Ruiz, J.O., 2013. Celdas de combustible microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. *Informacion Tecnologica*, 24(6), pp.17–28.
- Rosenbaum, M. et al., 2011. Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresource Technology*, 102(1), pp.324–333. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.008>.
- Rozendal, R. a et al., 2008. Hydrogen production with a microbial biocathode. *Environmental Science & Technology*, 42(2), pp.629–634. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18284174](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18284174).
- Saeed, H.M. et al., 2015. Microbial desalination cell technology: A review and a case study. *Desalination*, 359, pp.1–13. Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2014.12.024>.
- Santharam, S., Davis, L.C. & Erickson, L.E., 2014. Biodegradation of carbon tetrachloride in simulated groundwater flow channels. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 33(2), pp.444–453.
- Sathish-Kumar, K. et al., 2013. Electrochemical and chemical enrichment methods of a sodic-saline inoculum for microbial fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(28), pp.12600–12609.
- Shan, H., Kurtz, H.D. & Freedman, D.L., 2010. Evaluation of strategies for anaerobic bioremediation of high concentrations of halomethanes. *Water Research*, 44(5), pp.1317–1328. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.035>.
- Sharma, V. & Kundu, P.P., 2010. Biocatalysts in microbial fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(5), pp.179–188. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.07.001>.
- Shea, C. et al., 2008. Adapting a denitrifying biocathode for perchlorate reduction. *Water Science and Technology*, 58(10), pp.1941–1946.
- Sikkema, J., de Bont, J.A. & Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2), pp.201–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Strycharz, S.M. et al., 2008. Graphite electrode as a sole electron donor for reductive dechlorination of tetrachlorethene by *Geobacter lovleyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), pp.5943–5947.
- Strycharz, S.M. et al., 2010. Reductive dechlorination of 2-chlorophenol by *Anaeromyxobacter dehalogenans* with an electrode serving as the electron donor. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2), pp.289–294.
- Thrash, J.C. et al., 2007. Electrochemical stimulation of microbial perchlorate reduction. *Environmental Science and Technology*, 41(5), pp.1740–1746.
- Vázquez-Larios, A.L. et al., 2014. Bioelectricity production from municipal leachate in a microbial fuel cell: Effect of two cathodic catalysts. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(29), pp.16667–16675.
- Vázquez-Larios, A.L. et al., 2015. Effect of type of inoculum on microbial fuel cell performance that used RuxMoySez as cathodic catalyst. *International Journal of*

- Hydrogen Energy*, 40(48), pp.17402–17412.
- Xie, D. et al., 2014. Competitive microbial reduction of perchlorate and nitrate with a cathode directly serving as the electron donor. *Electrochimica Acta*, 133, pp.217–223. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.016>.
- Zhang, D. et al., 2014. Electrochemical stimulation of microbial reductive dechlorination of pentachlorophenol using solid-state redox mediator (humins) immobilization. *Bioresource Technology*, 164, pp.232–240. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.071>.
- Zhang, G.D. et al., 2011. Improved performance of microbial fuel cell using combination biocathode of graphite fiber brush and graphite granules. *Journal of Power Sources*, 196(15), pp.6036–6041. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.03.096>.
- Zhang, J. et al., 2013. Degradation characteristics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in electro-biological system. *Journal of Hazardous Materials*, 262, pp.137–142. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.038>.
- ZHAO, T. et al., 2009. Co-inhibition of methanogens for methane mitigation in biodegradable wastes. *Journal of Environmental Sciences*, 21(6), pp.827–833. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62348-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62348-7).
- Zhen, G. et al., 2015. Understanding methane bioelectrosynthesis from carbon dioxide in a two-chamber microbial electrolysis cells (MECs) containing a carbon biocathode. *Bioresource Technology*, 186, pp.141–148. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.064>.
- Zhou, M. et al., 2013. Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(4), pp.508–518.
- Zhu, L. et al., 2014. Enhanced reductive transformation of p-chloronitrobenzene in a novel bioelectrode-UASB coupled system. *Bioresource Technology*, 167, pp.303–309. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.116>.