

Microbial Fuel Cells como alternativa para la remediación de drenaje ácido de mina

Microbial Fuel Cells as an alternative for acid mine drainage remediation

Enzo Leiva Aravena¹, alumno 5to año.

Eduardo Leiva Llantén^{2,3}, profesor asistente.

Ignacio Vargas Cucurella², profesor asistente.

¹Departamento de Ingeniería Química y Bioprocessos, Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile.

²Departamento de Ingeniería Hidráulica y Ambiental, Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile.

³Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile.

*Autor para correspondencia: itvargas@ing.puc.cl.

Enzo Leiva Aravena¹, 5th year student.

Eduardo Leiva Llantén^{2,3}, assistant professor.

Ignacio Vargas Cucurella², assistant professor.

¹Department of Chemical Engineering and Bioprocesses, School of Engineering, Pontificia Universidad Católica de Chile.

²Department of Hydraulic and Ambient Engineering, School of Engineering, Pontificia Universidad Católica de Chile.

³Department of Inorganic Chemistry, College of Chemistry, Pontificia Universidad Católica de Chile.

*Correspondence author: itvargas@ing.puc.cl.

RESUMEN

El Drenaje Ácido de Mina es un problema ambiental caracterizado por la generación de aguas con bajo pH y altas concentraciones de metales disueltos. Este trabajo evaluó el uso de *Microbial Fuel Cells* como alternativa de tratamiento, con foco en la neutralización de aguas. Dos reactores de cámara simple fueron operados en modo batch por ~5 meses, monitoreando su potencial de tratamiento y simultáneamente su potencial de generación de energía. Las máximas densidades de corriente obtenidas fueron de $\sim 357 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$ y $\sim 186 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$, mientras que el pH aumentó más de 4 unidades en cada reactor. Adicionalmente, se registró la dinámica del cambio de pH al interior de los reactores durante las primeras horas de operación, obteniendo un comportamiento similar para las condiciones de circuito abierto y cerrado. Posteriormente, uno de los reactores fue desmontado para evaluar la capacidad aislada de cada una de las comunidades microbianas presentes en el reactor para aumentar el pH. Si bien todas demostraron tener potencial de tratamiento, no se alcanzaron los niveles del efluente del reactor original. Estos resultados sugieren que la neutralización es un proceso independiente de la generación de corriente, causado por un efecto sinérgico de las comunidades del reactor. Si bien la operación de las *Microbial Fuel Cells* no influiría en la eficiencia de tratamiento, sí podría tener un rol en la selección de los microorganismos responsables de la neutralización.

Palabras clave: *Microbial Fuel Cells, Drenaje Ácido de Mina, Tratamiento biológico de aguas, Microorganismos ácido-tolerantes.*

1. INTRODUCCIÓN

La actividad minera, muy fructífera para nuestro país, es la responsable de problemas ambientales como el Drenaje Ácido de Mina (DAM). El DAM corresponde a aguas con bajo pH y altas concentraciones de iones metálicos (e.g. hierro y aluminio) y no metálicos (e.g., sulfato) [1]. Estas aguas pueden provenir de minas abandonadas, minas en operación, relaves y otras fuentes, donde ha tenido lugar la **OXIDACIÓN** de minerales provocada por su exposición a oxígeno y agua [2]. Un ejemplo de esto se presenta en el extremo norte de Chile, donde los yacimientos de azufre del volcán Tacora, abandonados hace algunas décadas, constituyen un foco de producción de DAM [3]. Esta contaminación hace muy difícil la existencia de cultivos

ABSTRACT

Acid mine drainage is an environmental concern that generates low-pH water with high dissolved metal concentrations. This study evaluated the use of microbial fuel cells as a treatment alternative, focusing on water neutralization. Two single-chamber reactors were operated in batch mode for five months, a time over which treatment and energy generation potentials were simultaneously monitored. The maximum current densities obtained were $\sim 357 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$ and $\sim 186 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$, and the pH inside each reactor increased more than 4 pH units. Additionally, pH change dynamics inside reactors were recorded for the first hours of operation, and similar behaviors were obtained for open- and closed-circuit conditions. After operation, one of the reactors was dismantled to separately evaluate the ability of each microbial community to increase pH. While all communities demonstrated treatment potential, the pH levels of the effluent for the original reactor were not replicated. These results suggest that neutralization, inside the tested reactor, was independent from current generation and was caused by a synergistic effect between the different microbial biofilms of the reactor. While microbial fuel cell operation might not affect treatment efficiency, it could be related to the selection of neutralizing microorganisms.

Keywords: *Microbial fuel cells, Acid mine drainage, Biological water treatment, Acid-tolerant microorganisms*

1. INTRODUCTION

Mining, a prolific and important industry for Chile, causes certain environmental concerns, such as acid mine drainage (AMD). AMD is a mine-to-environment outflow of low-pH water with high metallic (e.g. iron and aluminum) and non-metallic (e.g. sulfate) ion concentrations [1]. This water is generated through mineral **OXIDATION**, specifically through the exposure of mineral ore in abandoned or operating mines, as well as tailings and other sources, to oxygen and water [2]. An example of this situation can be observed in northern Chile, where abandoned sulfur deposits from the Tacora Volcano are now a focal point for AMD production [3]. This pollution detrimentally affects crop production in the Lluta River Valley, in contrast with

en el valle del río Lluta, en contraste con la conocida fertilidad del vecino valle de Azapa [3].

Las soluciones convencionales para el problema de DAM consisten en medidas preventivas o estrategias de remediación [2]. Los esfuerzos preventivos incluyen métodos de sellado efectivo de minas o relaves, y utilización de toxinas para eliminar a microorganismos involucrados en la oxidación de minerales [2]. Por su parte, las estrategias de remediación se clasifican en dos tipos: i) procesos activos, asociados a la aplicación continua de soluciones básicas, lo que provoca tanto la **NEUTRALIZACIÓN** de las aguas como la precipitación de metales disueltos; y ii) procesos pasivos, basados en el uso de humedales naturales o artificiales que aprovechan procesos biológicos para cumplir los mismos objetivos.

Las estrategias mencionadas poseen numerosas desventajas, tanto económicas como operacionales. Entre estas se encuentran: la duración transitoria del efecto de algunas medidas preventivas; la formación de precipitados indeseados, que pueden inducir la falla de sistemas de tratamiento; y los elevados costos de operación y mantención de los sistemas pasivos de remediación [2]. En este escenario, resulta interesante evaluar el uso de tecnologías emergentes y eventualmente más sustentables para remediar el problema de DAM. Como ejemplo de esto, la tecnología conocida como **MICROBIAL FUEL CELL** (MFC), que permite la obtención de energía eléctrica mediante el uso de microorganismos, ha sido reportada como una alternativa con potencial para el tratamiento de DAM [4].

Existen escasas incursiones previas en la remediación de DAM utilizando sistemas MFC. Un ejemplo es la MFC de doble cámara que usó un agua sintética tipo DAM como catolito ($\text{pH} \sim 2,4$, $\text{Fe}^{3+} \sim 500 \text{ mg L}^{-1}$) [1]. Sus resultados fueron bastante satisfactorios para el tratamiento de DAM, ya que se logró simultáneamente la neutralización del catolito y la precipitación de gran parte del ión Fe^{3+} inicial, luego de 6 días de operación **BATCH**. Otro caso destacable es el de una MFC de doble cámara cuyo ánodo fue **INOCULADO** con la **BACTERIA ACIDÓFILA** *Acidiphilium cryptum* [5]. Este sistema aprovechó la capacidad natural de *A. cryptum* para **REDUCIR** Fe^{3+} y transferir electrones al ánodo. Si bien este trabajo no se centró en la remediación de DAM (neutralización y remoción de metales), sí constituye un referente para la construcción de MFCs operando a pH ácido. Esto, debido a que el pH 4 de ambas cámaras aumentó la disponibilidad de protones para la **REDUCCIÓN** del **ACEPTOR** final de electrones (oxígeno) [5], además de aumentar la solubilidad del ión Fe^{2+} , esencial para el traspaso de electrones al ánodo y por tanto para la generación de corriente.

Gran cantidad de las MFCs reportadas usan oxígeno como aceptor final de electrones, suministrándolo a través del burbujeo de aire u oxígeno puro en un medio acuoso. Sin embargo, el uso de MFCs de una sola cámara, que usan un

the fertility of the neighboring Azapa Valley [3].

Conventional solutions for AMD consist in preventive measures or remediation strategies [2]. Preventive efforts include sealing techniques for mines and tailings, in addition to using toxins to kill microorganisms involved in mineral oxidation [2]. Remediation strategies are classified into two types: i) active processes, associated with the continuous application of basic solutions that neutralize water and dissolved metal precipitates; and (ii) passive processes, which use natural or artificial wetlands to leverage biological processes to achieve **NEUTRALIZATION**.

The above strategies have various economic and operational disadvantages. These problems include: temporary effects for some preventive measures; the formation of unwanted precipitates, which may induce treatment system breakdowns; and high operation and maintenance costs, particularly for passive remediation systems [2]. Considering these limitations, emerging and possibly more sustainable technologies for solving the AMD problem should be explored. **MICROBIAL FUEL CELL** (MFC) technology, which obtains electrical energy from microorganisms, is one such potential alternative for AMD treatment [4].

There are few reported studies for AMD remediation using MFC technology. One study used a dual-chamber MFC with artificial AMD as the catholyte ($\sim 2.4 \text{ pH}$ and $\sim 500 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$) [1]. Lefebvre *et al.* [1] obtained promising results, as a large part of the initial Fe^{3+} ions were simultaneously neutralized and precipitated at the cathode after six days of **BATCH** operation. Another notable dual-chamber MFC used an anode **INOCULATED** with the **ACIDOPHILIC BACTERIUM** *Acidiphilium cryptum* [5]. This system used the natural capacity of *A. cryptum* to **REDUCE** Fe^{3+} and transfer electrons to the anode. Although Borole *et al.* [5] did not focus on AMD remediation (i.e. metal neutralization and removal), the described dual-chamber system serves as a reference point for constructing MFCs operational at an acidic pH. In particular, proton availability for the reduction of the final **ELECTRON ACCEPTOR** (i.e. oxygen) increased due to the pH in both chambers (pH 4) [5]. This acidic pH additionally increased Fe^{2+} solubility, which is essential for transferring electrons to the anode and, therefore, for current generation.

Oxygen, as supplied through air or pure-oxygen bubbles in aqueous media, is often used as the final electron acceptor in MFCs. However, single-chamber MFCs can use a special cathode known as an **AIR CATHODE**, which can increase power generation and reduce operation costs [6]. One interesting example of this for AMD treatment research is the single-chamber MFC, which operates at pH 5 using acetate as the **ELECTRON DONOR** [7]. Although AMD treatment was not the focus of He *et al.* [7], it is worth noting that the **ELECTROLYTE** increased approximately 1 pH unit after two days of operation in batch mode.

cátodo especial conocido como ***air-cathode***, puede tanto aumentar la generación de corriente como reducir los costos de operación [6]. Una celda construida con esta tecnología, y además interesante en el estudio del tratamiento de DAM, corresponde a una MFC de cámara simple operando a pH 5 y con acetato como **donante de electrones** [7]. Si bien el foco de este último estudio tampoco estaba en el tratamiento de aguas ácidas, se observó un incremento de aproximadamente 1 unidad de pH en el electrolito, luego de dos días de operación en modo batch.

En el presente trabajo se evaluó el uso de MFCs de cámara única, construidas con la tecnología de *air-cathode*, para remediar aguas sintéticas tipo DAM. En concreto, el estudio se enfocó solo en la capacidad de incrementar el pH de estas aguas. Para ello se utilizaron reactores previamente inoculados con microorganismos provenientes de ambientes extremos del Norte de Chile. De este modo, los objetivos de este trabajo fueron lograr la neutralización de aguas sintéticas tipo DAM y caracterizar preliminarmente los mecanismos más influyentes en esta eventual neutralización.

2. METODOLOGÍA

2.1 Construcción, operación y monitoreo de reactores MFC

Se trabajó con dos reactores tipo MFC de cámara única, de un volumen de ~25 mL (**Figura 1**). El inóculo consistió en microorganismos provenientes de un **ENRIQUECIMIENTO** de la comunidad microbiana presente en sedimentos de la cuenca del río Lluta (extremo norte de Chile). Estos sedimentos provienen de una zona afectada por DAM, caracterizada por las siguientes concentraciones: pH 3,7; SO_4^{2-} 2.500 mg·L⁻¹; Fe 543 mg·L⁻¹ y As ~7 mg·L⁻¹. El mencionado enriquecimiento fue realizado en un medio de cultivo idéntico al medio Lhet2 [5], con la salvedad de haber reemplazado su contenido de glucosa por 1,3 g·L⁻¹ de piruvato.

Las celdas (ver Principio Científico) se construyeron con un ánodo de fieltro de carbono, en el que se asentó la comunidad microbiana **EXOELECTROGENICA** y un cátodo configurado como *air-cathode*, esto es, fibra de carbono cubierta por el lado externo con Poli-Tetrafluoroetileno (PTFE) y por el interno con Platino (0,5 mg·cm⁻²), que actúa como catalizador de la reacción de reducción de oxígeno. Esta configuración permite la difusión de oxígeno desde el aire exterior hacia la celda, pero no la fuga del líquido interior [8].

Los reactores (réplicas) operaron en modo batch, con renovación completa del medio de cultivo cada ~2,5 días. El medio de cultivo estuvo compuesto por los siguientes reactivos: piruvato de sodio (1,3 g·L⁻¹); NH_4Cl (0,31 g·L⁻¹); KCl (0,13 g·L⁻¹); solución de vitaminas [9] 100X y solución de minerales traza [10] 1000X. Esta solución fue completada

The present study evaluated the use of single-chamber MFCs built with air-cathode technology for remediating artificial AMD. Particular focus was placed on potential increases in water pH. The reactors used in this study were previously inoculated with microorganisms from extreme environments in northern Chile. The overall aims were to successfully neutralize the artificial AMD and to preliminarily characterize the most influential mechanisms of neutralization.

2. METHODOLOGY

2.1 MFC reactor construction, operation, and monitoring

Two single-chamber MFC reactors (~25 mL each) were used (**Figure 1**). After ENRICHMENT, The chambers were inoculated with microorganisms originally collected from microbial communities present in sediments from the Lluta River Basin (Northern Chile, between 17° 39' - 18° 30' S and 70° 20' - 69° 22' W). The specific sampling site is affected by AMD, with sediments registering the following approximate concentrations: pH 3.7; 2,500 mg·L⁻¹ SO_4^{2-} ; 543 mg·L⁻¹ Fe; and 7 mg·L⁻¹ As. The collected samples were enriched in a culture medium identical to the Lhet2 medium [5], except that glucose content was replaced with 1.3 g·L⁻¹ pyruvate.

The MFCs (see Scientific Principle) were constructed with a carbon-felt anode, where the EXOELECTROGENIC microbial community was settled. The air cathode consisted in carbon fiber externally covered with polytetrafluoroethylene (PTFE) and internally covered with platinum (0.5 mg·cm⁻²), which acts as a catalyst for oxygen reduction. This MFC configuration allows oxygen to diffuse into the cell from outside air, but does not permit the inner liquid to escape [8].

The reactors (replicates) were operated in batch mode, and the culture medium of each reactor was completely renewed every ~2.5 days. The culture medium was composed of the following reagents: sodium pyruvate (1.3 g·L⁻¹); NH_4Cl (0.31 g·L⁻¹); KCl (0.13 g·L⁻¹); a 100X vitamin solution [9], and a 1000X trace mineral solution [10]. The trace mineral solution was completed with type 1 ultrapure water and



Figura 1. Fotografía de las MFCs operadas bajo condiciones ácidas, con Piruvato como donante de electrones y oxígeno como acceptor.

Figure 1. MFC chambers operated under acidic conditions, using pyruvate as the electron donor and dissolved oxygen as the acceptor.

con agua ultra-pura tipo 1, y su pH fue ajustado a ~3,7, usando HCl 0,05 M.

Cada celda estuvo conectada en todo momento a una resistencia externa de $100\ \Omega$, excepto donde se indique. El potencial de generación de energía de los reactores fue evaluado a través de la generación de corriente eléctrica durante cerca de 5 meses. Para esto, se registró el valor de voltaje de las celdas cada 10 minutos, a través de un sistema de adquisición de datos 2.700 Multimeter (Keithley, Solon, OH, USA). Su operación fue llevada a cabo en condiciones controladas de temperatura ($\sim 25\ ^\circ\text{C}$).

Por otra parte, al término de cada ciclo de operación se realizó un muestreo del medio saliente de cada MFC. Además se consideró una muestra de volumen equivalente de medio de cultivo de entrada. Todas estas muestras fueron destinadas a la medición de parámetros geoquímicos como conductividad eléctrica y pH. Las mediciones de pH (sonda PHC301), y conductividad eléctrica (sonda CDC401), fueron realizadas con un medidor multi-paramétrico HQ40d (Hach, Loveland, CO, USA).

2.2 Dinámica de pH al interior de los reactores

Se monitoreó el cambio de pH al interior de ambas celdas durante las primeras horas de operación. Luego de la renovación del medio de cultivo, se registró el valor de pH cada 15 minutos durante la primera hora de operación. Posteriormente, se midió el valor de pH cada 1 hora hasta completar 6 horas de funcionamiento. Este experimento fue realizado en dos condiciones: circuito cerrado, es decir, con el reactor conectado a la resistencia externa, y circuito abierto, desconectado de ella. De esta forma, se evaluó la influencia del sistema MFC propiamente tal (circuito cerrado, ver Principio Científico) en el cambio de pH al interior de los reactores.

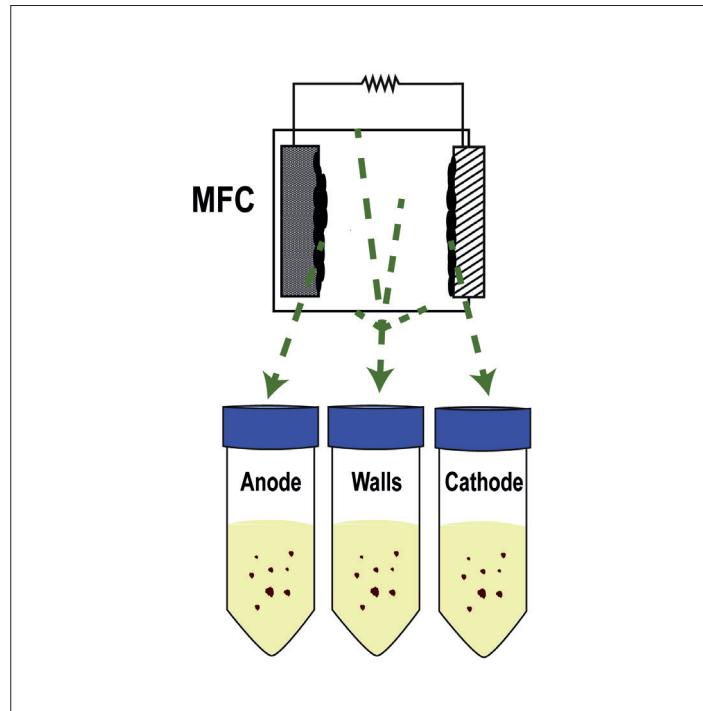
adjusted to ~ 3.7 pH using 0.05 M HCl.

Each MFC was connected to a $100\ \Omega$ external load, except where indicated. The potential power generation of each reactor was evaluated through electricity generation over five months. Electricity generation was recorded through cell voltage every ten minutes with a 2,700 Multimeter/ Data Acquisition System (Keithley, Solon, OH, USA). Reactors were operated at $25\ ^\circ\text{C}$.

A sample of the output medium for each MFC was collected at the end of each operating cycle. An equivalent sample volume of the input culture medium was also collected. These input/output samples were used to measure electrical conductivity (CDC401 probe) and pH (PHC301 probe) (Hach, Loveland, CO, USA). These geochemical parameters were evaluated using an HQ40d multiparameter meter (Hach, Loveland, CO, USA).

2.2 pH dynamics inside reactors

pH changes inside each cell were monitored over the first few hours of operation. After culture medium renewal, the pH value was recorded every 15 minutes for the first hour of operation. Thereafter, pH values were measured every hour for six hours. Two experimental conditions were assessed: closed circuit, with the reactor connected to the external load; and open circuit, with the reactor disconnected from the external load. Evaluating both conditions established the direct influence of the MFC system (closed circuit, see Scientific Basis) on pH changes inside the reactor.



2.3 Influencia de las biopelículas en el cambio de pH

Transcurridos los 5 meses de operación en modo batch, uno de los reactores fue desmontado. A partir de esto se obtuvieron muestras ($\sim 1 \text{ cm}^2$) de las **BIOPELÍCULAS** asentadas en ambos electrodos y en las paredes de la MFC. Estas muestras fueron destinadas a una segunda experiencia donde se evaluó la influencia aislada de cada comunidad microbiana en el cambio de pH evidenciado al interior de las celdas. Para esto se inocularon reactores con cada una de estas muestras, adicionando 20 mL de medio de cultivo y posteriormente ajustando su pH a un valor de $\sim 3,7$ (Figura 2). Los nuevos cultivos fueron dispuestos en una habitación con temperatura controlada (25°C), en la que se procedió a la medición de pH al interior de cada reactor (sonda PHC301 y medidor HQ40d), cada 5 minutos por dos días.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Generación de corriente

Durante la operación de los reactores MFC en modo batch, se observó una diferencia en la generación de corriente entre ambos reactores (Figura 3). Las pérdidas de voltaje (y por tanto, de corriente), pueden ser clasificadas como: (i) pérdidas óhmicas, asociadas a la resistencia al flujo de electrones por parte de cables, electrodos y **ELECTROLITOS**; (ii) pérdidas de activación, asociadas al traspaso de electrones entre electrodos y moléculas, que pueden estar disueltas o presentes en la membrana de las bacterias; (iii) pérdidas metabólicas, determinadas

Figura 2. Experimento para determinar la importancia de las distintas comunidades del reactor en el cambio de pH evidenciado en las MFCs. Para esto, se inocularon nuevos cultivos con cada una de las distintas biopelículas (provenientes del ánodo, cátodo y paredes), por separado.

Figure 2. Experimental scheme for determining the importance of different reactor communities in MFC pH changes. New cultures were separately inoculated with each different biofilms from the anode, cathode, and cell walls.

2.3 Influence of biofilms on pH change

After five months of batch-mode operation, one of the reactors was dismantled. **BIOFILM** samples ($\sim 1 \text{ cm}^2$) were collected from electrodes and the MFC walls. These samples were used in a second experiment to establish the influence of each microbial community individually on pH changes within the cells. Reactors were inoculated with each sample and culture medium (20 mL). The pH was subsequently adjusted to ~ 3.7 (Figure 2). These new cultures were incubated at a controlled 25°C , and the pH inside each reactor was measured with a PHC301 probe and HQ40d meter every five minutes for two days.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Current generation

Current generation differed between the two MFC reactors during batch-mode operation (Figure 3). Voltage losses, and subsequent current losses, can be classified as: (i) ohmic losses, associated with electron-flow resistance from cables, electrodes, and electrolytes; (ii) activation losses, related to electron transfer between electrodes and molecules that may be dissolved or present in the bacterial membrane; (iii) metabolic losses, which result from possible spontaneous electron transfer and are determined by the difference in potential between electrodes of the involved electrochemical

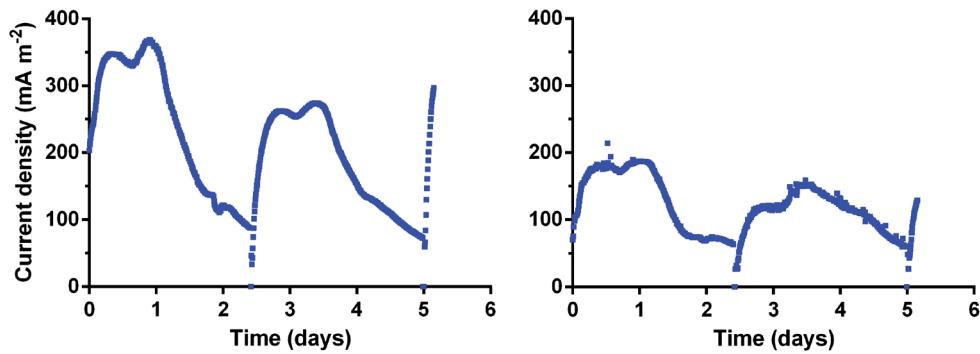


Figura 3. Ciclos representativos de densidad de corriente obtenida para el reactor A (izquierda) y el reactor B (derecha), en el mismo período de operación.

Figure 3. Representative current density cycles from reactor A (left) and reactor B (right) over the same operating period.

por la diferencia de potencial entre electrodos y especies electroquímicas involucradas, que resultan en la espontaneidad o no del traspaso de electrones; y (iv) pérdidas de concentración, por limitaciones del transporte de masa de las especies químicas [8].

Si se comparan los valores obtenidos de densidad de corriente (valor de corriente normalizado por el área del ánodo) con valores de literatura, se observa una diferencia notable con MFCs operadas en condiciones de bajo pH. Las celdas de este estudio presentaron valores *peak* de $\sim 357 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$ para el reactor A y $\sim 186 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$ para el reactor B. Mientras que, por ejemplo, la MFC de doble cámara utilizada por Borole *et al.* tuvo una densidad de corriente de $19.2 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$ [5]. El bajo nivel de generación de corriente obtenido por Borole *et al.* se asocia a la dependencia de mediadores en suspensión, y por tanto, a las pérdidas de activación y de concentración respectivas. Por otra parte, la MFC de cámara simple de He *et al.*, que funcionó a pH 5 y usó acetato como donante, registró un *peak* de $46.5 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$ [7]. En este último caso, su baja generación de corriente podría deberse meramente a que la comunidad anódica disminuye su actividad a ese pH, ya que los autores registraron una densidad de corriente tres a cuatro veces mayor para el mismo reactor operando a pH básico [7].

Por otro lado, si se compara la densidad de corriente con los máximos valores obtenidos en MFCs construidas de forma casi idéntica a las de este estudio (volumen de $\sim 25 \text{ mL}$, *air-cathode* y catalizador Pt $0.5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$), la generación de las celdas de este estudio aún se encuentra muy por debajo de valores como ~ 490 [6] y $\sim 750 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$ [11]. Sin embargo, estas últimas celdas presentaron diferencias significativas de operación con respecto a las nuestras, ya que utilizaron inóculos de bacterias exoelectrogénicas provenientes de aguas residuales, además de ocupar medios de cultivo con pH cercano al neutro y donantes de electrones como glucosa y acetato, respectivamente.

species; and, finally, (iv) concentration losses, due to mass limitations for chemical species transport [8].

Comparisons of the presently obtained density values (i.e. current value normalized by the anode area) with those in the literature reveal notable differences for MFCs operated under low-pH conditions. In this study, reactor A reached a peak current density of $\sim 357 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$, while reactor B reached $\sim 186 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$. These values contrast with the dual-chamber MFC used by Borole *et al.*, who reported a peak current density of $19.2 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$ [5]. The low current density obtained by Borole *et al.* is associated with system dependence on suspended electron mediators and, consequently, the respective activation and concentration losses. On the other hand, the single-chamber MFC of He *et al.*, which ran at pH 5 and used acetate as a donor, recorded a peak current density of $46.5 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$ [7]. In this case, low power generation could be due to the decreased activity of the anodic community at pH 5, especially since a three to four times greater density is obtained for the same reactor when operating at a basic pH [7].

Current densities in the present study were much lower than the highest values obtained in similar MFCs (i.e. $\sim 25 \text{ mL}$ chambers, air cathode, and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ pyruvate catalyst), including as high as ~ 490 [6] and $\sim 750 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$ [11]. However, it is worth mentioning that these latter cells were very operationally different than those of the present study. In particular Liu *et al.* [6] and Xing *et al.* [11] used exoelectrogenic inocula from wastewaters, as well as culture media with a near neutral pH and electron donors such as glucose and acetate.

3.2 Potencial de los reactores para el tratamiento de Drenaje Ácido de Mina

Las celdas evidenciaron un notorio aumento de pH al término de cada ciclo de operación batch (**Tabla 1**). Se sabe que el pH del interior de la celda está dominado por distintos factores. Entre estos se encuentran [7]: el pH inicial del medio de cultivo, los protones generados y consumidos por las reacciones red-ox involucradas en la generación de corriente, y también reacciones microbianas asociadas a la mantención del pH intracelular de los organismos de la comunidad presente.

Dentro de la poca evidencia de neutralización en sistemas MFC, en un estudio se logró obtener un ΔpH 1,1 (pH inicial 5), luego de 2 días de operación de una MFC de cámara única de 10 mL [7]. Este menor ΔpH se podría explicar por la resistencia a cambios de pH ocasionada por el TAMPÓN fosfato presente en el medio de cultivo utilizado, en contraste con nuestra agua sintética tipo DAM que no contempla ningún tampón. Además de esto, si bien los tiempos de operación son similares, el volumen es menor a la mitad del volumen de nuestras celdas, lo que también tendría influencia en la magnitud de la neutralización.

Otro estudio realizado en una MFC de doble cámara usó agua sintética tipo DAM como catolito [1], logrando una neutralización importante de esta solución ($\Delta\text{pH} = 4,7$), además de la precipitación del 97% del ión Fe^{3+} inicial, en 6 días de operación batch. Nuevamente, en la comparación con este estudio se deben tener en cuenta las diferencias de volumen (175 mL para la cámara catódica) y de tiempos de operación. Segundo los autores, en el cátodo ocurre la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , y luego una re-oxidación espontánea de Fe^{2+} por la acción del oxígeno presente [1]. Posteriormente, el ion férrico re-formado tiende a precipitar, generando protones en solución que sumados a los electrones provenientes de las reacciones de re-oxidación favorecen considerablemente la reducción de oxígeno. Esta reacción aumentada termina por consumir una gran cantidad de protones, es decir, aumentando el pH.

3.2 Potential for acid mine drainage treatment

The cells showed a noticeable pH increase at the end of each batch operation cycle (**Table 1**). The pH inside the cell is affected by various factors. These include [7]: initial culture medium pH, the protons generated and consumed by redox reactions, and microbial reactions associated with regulation of the intracellular pH.

There is little research on neutralization in MFC systems, but one study did reach a ΔpH of 1.1 (initial pH 5) after two days of operating a 10 mL single-chamber MFC [7]. This lower ΔpH could be explained by the resistance to changes in pH by the phosphate BUFFER present in the culture medium. This is in contrast to the presently assessed artificial AMD, which did not include any buffer. In addition to this, while the operation times were similar, the volume used by He *et al.* [7] was less than half of the cell volume in the present study, which could also influence the degree of neutralization.

Another dual-chamber MFC study used artificial AMD as a catholyte [1], which resulted in major neutralization ($\Delta\text{pH} = 4.7$) and 97% precipitation of the initial Fe^{3+} over six days of batch operation. Again, differences in volume (175 mL for cathode chamber) and operational times should be considered when making comparisons with this study. According to Lefebvre *et al.* [1], Fe^{3+} was reduced to Fe^{2+} in the cathode before spontaneously re-oxidizing as a result of the oxygen present [1]. Afterwards, the re-formed ferric ion tended to precipitate, generating protons in the solution that, together with the electrons from the re-oxidation reactions, considerably enabled oxygen reduction. This increased reaction consumes a large number of protons, causing pH increases.

Table 1. pH variation (effluent - initial culture medium)

Reactor	ΔpH
A	4,14
B	4,05

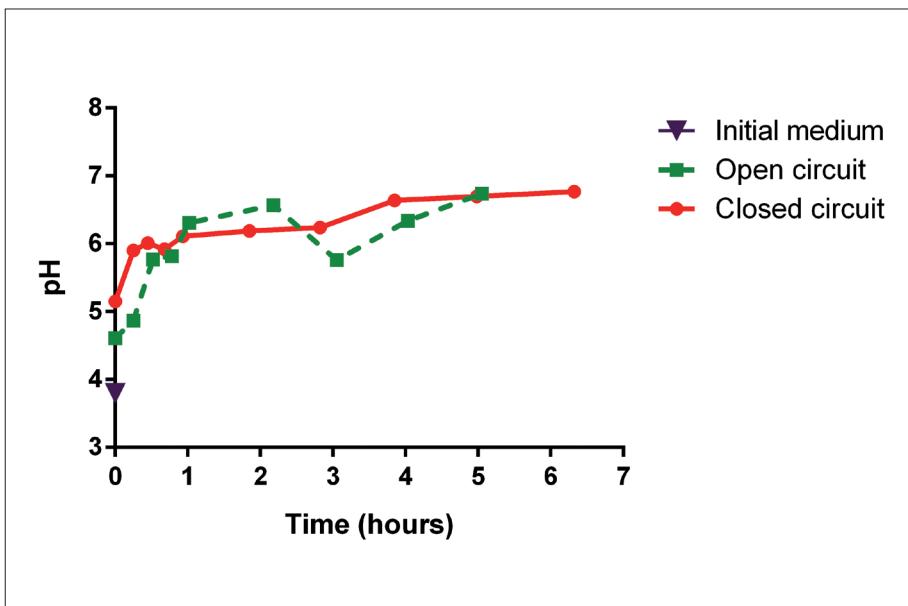


Figura 4. Dinámica del valor de pH dentro del reactor A, durante las primeras horas de operación en modo batch. Se compara el comportamiento en condiciones de circuito cerrado y circuito abierto.

Figure 4. pH dynamics inside reactor A over the first hours of batch operation. Behaviors are compared between closed- and open-circuit conditions.

3.3 Caracterización preliminar del mecanismo de neutralización del pH

Ante la evidente neutralización del pH, se decidió evaluar si los cambios de esta variable eran consecuencia de la generación de corriente. Para esto, se evaluó la dinámica de incremento del pH en el interior de la MFC, lo que evidenció que alcanzaba un valor cercano a 6, tras 30 minutos desde la renovación del medio de cultivo (**Figura 4**). Este comportamiento fue observado en ambos reactores, tanto en condiciones de circuito cerrado como de circuito abierto. Por lo tanto, el mecanismo de neutralización del pH puede ser considerado independiente de las reacciones red-ox involucradas en la generación de corriente. Es más, los resultados sugieren la existencia de metabolitos presentes en las distintas biopelículas del reactor, cuya concentración sería suficiente para neutralizar el medio de cultivo a los pocos minutos de ingresar a la celda.

Como se mencionó anteriormente, el pH al interior de una MFC puede variar tanto por reacciones asociadas a la generación de corriente como por otros procesos biológicos [7]. Entre estos últimos se han reportado diversas reacciones que consumen acidez o aumentan **ALCALINIDAD**, como: fotosíntesis, amonificación, denitrificación, reducción de hierro y reducción de sulfato [12]. Esta última es la más interesante en el contexto de remediación de DAM, ya que las bacterias sulfato-reductoras además de alcalinidad generan ácido sulfídrico, que favorece la precipitación de metales disueltos [12].

Finalmente, respecto de los cultivos batch de las distintas biopelículas, se observó que al cabo de dos días todas las comunidades presentaron un aumento considerable del pH

3.3 Preliminary characterization of pH neutralization mechanism

Given the observed pH neutralization, experiments were performed to determine if changes in pH were a result of current generation. Investigating pH increase dynamics inside the MFC revealed a rise in pH to close to 6 only 30 minutes after culture medium renewal (**Figure 4**). This behavior was observed in both reactors and for closed/open circuit conditions. Therefore, the pH neutralization mechanism seems to be independent of the redox reactions involved in current generation. Moreover, the results suggest the existence of metabolites in the different reactor biofilms at concentrations sufficient for neutralizing the incoming culture medium in a few minutes after entry.

As mentioned, the internal pH of MFCs may vary from reactions associated with electrical current generation and from other biological processes [7]. The latter includes various reported reactions that consume acidity or increase **ALKALINITY**, such as photosynthesis, ammonification, denitrification, iron reduction, and sulfate reduction [12]. Of these, sulfate reduction is particularly interesting in regards to AMD remediation since sulfate-reducing bacteria additionally produce hydrogen sulfide, which enables the precipitation of dissolved metals [12].

Finally, considerable increases in pH were observed in all biofilm culture communities after two days (**Figure 5**). Nevertheless, not all communities increased pH at the same speed. Indeed, the cathode community was the fastest, followed by the anode and, lastly, MFC wall microorganisms. Additionally, the maximum pH value

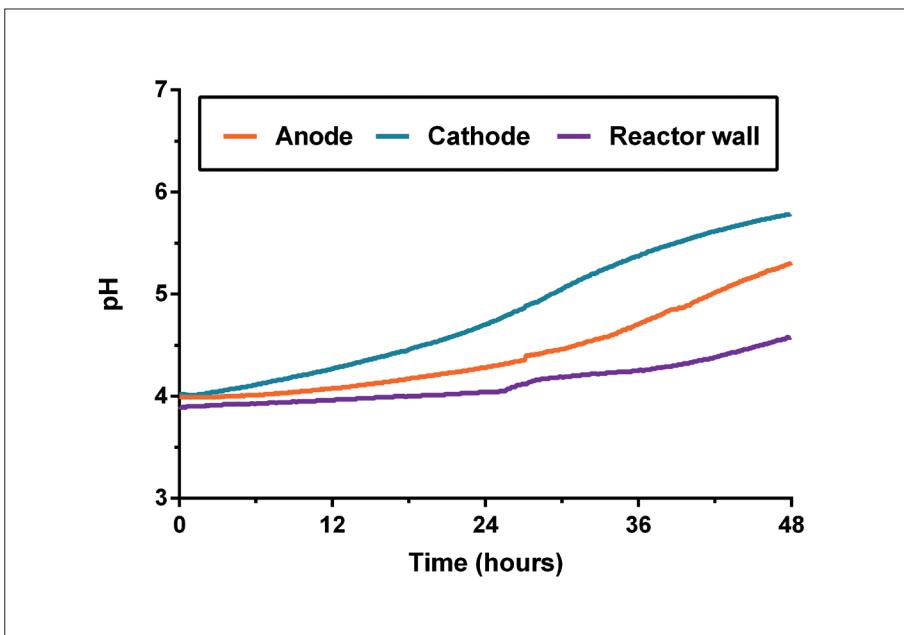


Figura 5. Dinámica del valor de pH para los cultivos batch, por comunidad proveniente del reactor B.

Figure 5. pH value dynamics for batch cultures by community from reactor B.

(Figura 5). Además, se observó que no todas aumentaban el pH con la misma velocidad, ya que la comunidad del cátodo lo hizo más rápido que la del ánodo y esta, a su vez, más rápido que los microorganismos de las paredes de la MFC. Adicionalmente, se observa que el máximo valor de pH alcanzado por los cultivos está por debajo de lo observado en los ciclos de operación batch de la MFC.

En base a lo anterior, se puede suponer cierto grado de sinergia entre la acción de las tres biopelículas. Por otra parte, también es posible que las diferencias de comportamiento entre las comunidades puedan atribuirse a la cantidad dispar de biomasa de cada tipo de cultivo. Sin embargo, dado que todas tienen un comportamiento similar, sería esperable que las distintas comunidades compartieran la presencia de microorganismos y/o metabolitos responsables de este incremento del pH.

4. CONCLUSIONES

El principal resultado de este estudio corresponde a la neutralización de aguas ácidas al interior de reactores MFC, pues se evidenció un aumento de más de 4 unidades de pH luego de ~2,5 días de operación batch. Por lo tanto, se demuestra la potencial aplicabilidad de las comunidades microbianas aquí utilizadas para el tratamiento de DAM. Por otra parte, los resultados de dinámica de pH al interior del reactor, comparando condiciones de circuitos abierto y cerrado, sugieren que las reacciones redox involucradas en la generación de corriente no tendrían mayor influencia en esta neutralización. Además, el experimento que aisló la influencia de las distintas comunidades en este incremento de pH sugiere que habría algún nivel de sinergia entre

reached by the cultures was lower than in the MFC batch operation cycles.

Based on the above, there seems to be a degree of synergy among the activities of the three biofilms. On the other hand, the behavioral differences between communities may be attributable to uneven biomass amounts in each culture type. However, given that all displayed similar behaviors, the different communities can all be expected to contain the microorganisms and/or metabolites responsible for increasing pH.

4. CONCLUSIONS

The assessed MFC reactors neutralized AMD by increasing pH by more than 4 pH units over 2.5 days of batch operation. This finding supports the potential applicability of the evaluated microbial communities for AMD remediation. Another important observation was obtained when comparing internal pH dynamics between open and closed circuit conditions. Specifically, the redox reactions involved in current generation seem not to largely influence neutralization. Additionally, experiments on the individual influences of different microbial biofilms on pH increases suggest some degree of synergy between communities.

todas ellas para llevarlo a cabo.

Otro resultado interesante corresponde a los valores de corriente eléctrica obtenidos, pues son auspiciosos al ser comparados con los de otras celdas operando a pH ácido. Sin embargo, se debe considerar que este nivel de generación de energía muy posiblemente esté influenciado por la neutralización del medio que ocurre en los primeros minutos de operación. Independientemente de lo anterior, es destacable el hallazgo de microorganismos exoelectrogénicos en la comunidad microbiana proveniente del norte de Chile. Este aspecto es de relevancia en la medida en que podría proyectarse hacia el desarrollo de sistemas de tratamiento de DAM autosustentables, que puedan solventar sus requerimientos energéticos en base a la generación de electricidad a través del sistema MFC.

En resumen, se observó el cumplimiento del objetivo de neutralización de pH de un agua sintética tipo DAM, y por tanto se logró un aporte al estudio de estrategias novedosas para su remediación sustentable. Respecto de la caracterización preliminar de los agentes responsables de esto, la evidencia sugiere que dicha neutralización no se debería al funcionamiento de la MFC. Sin embargo, es posible que la operación de los reactores como MFC sí tenga un rol en la selección de microorganismos que determinan de una u otra forma este aumento de pH. Esto, sumado a la posibilidad de que la neutralización esté asociada a la cantidad de biomasa por unidad de volumen, hace necesario continuar la investigación con miras a determinar los mecanismos involucrados en el aumento del pH.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto FONDECYT 3140515 y por el Centro de Desarrollo Urbano Sustentable (CEDEUS), a través del proyecto FONDAP 15110020. Se agradece además la colaboración de la, en ese entonces, alumna de Magíster Vasty Zamorano, del profesor Pablo Pastén González y del personal del Laboratorio de Calidad del Agua UC: Fernanda Carrasco, Mauricio Medel y Felipe Medina.

The obtained electric current values are encouraging when compared with other cells operating at an acid pH. However, power generation could be influenced by the neutralization processes that occur within the first few minutes of operation. Regardless of the above, the discovery of exoelectrogenic microorganisms in microbial communities from northern Chile is remarkable. This aspect is important to the extent that it can be applied towards the development self-sustaining AMD treatment systems, thereby solving inherent energy requirements through electricity generation with MFCs.

In summary, pH neutralization was achieved for artificial AMD. This can contribute to the study of innovative strategies for sustainable remediation. Regarding the preliminary characterization of responsible agents, the evidence suggests that neutralization is not due to MFC operation. However, the operation of reactors, such as MFCs, may play a role in the selection of microorganisms, which would ultimately influence pH increases. Neutralization might also be associated with the amount of biomass per volume unit. Therefore, continued research is needed to determine the mechanisms involved in pH increases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the FONDECYT 3140515 project and by the Center for Sustainable Urban Development (CEDEUS) through the FONDAP 15110020 project. We also appreciate the collaborative aid provided by Vasty Zamorano (Master's student), Professor Pablo Pastén Gonzalez, and the UC water-quality laboratory staff: Fernanda Carrasco, Mauricio Medel and Felipe Medina.

GLOSARIO

ALCALINIDAD: capacidad de un agua para neutralizar ácidos. En general, está determinada por la presencia de los iones HCO_3^- (bicarbonato) y CO_3^{2-} (carbonato).

AIR-CATHODE: tipo especial de cátodo que se encuentra en contacto con el aire exterior, permitiendo la difusión de oxígeno atmosférico hacia el interior para que actúe como el aceptor final de electrones de una celda de combustible.

BACTERIA ACIDÓFILA: microorganismo que preferentemente vive en ambientes con $\text{pH} < 3$.

BATCH: traducido literalmente como “lote”, es un término utilizado para describir a un reactor cuyo volumen no varía en el tiempo, ya que no posee flujos de entrada ni de salida.

BIOPELÍCULA: organización compleja de microorganismos asociados a una superficie.

DONANTE/ACCEPTOR DE ELECTRONES: especie química que cede/capta electrones en una reacción de óxido-reducción.

ELECTROLITO: solución conductora de electricidad. En una celda de combustible se pueden distinguir el anolito y el catolito, presentes en las cámaras anódica y catódica respectivamente.

ENRIQUECIMIENTO: en microbiología, es un procedimiento de cultivo que favorece el crecimiento de algunos integrantes de una comunidad microbiana.

EXOELECTROGÉNICOS: microorganismos que poseen la capacidad de ceder electrones al medio extracelular.

INOCULAR: acto de introducir microorganismos (inóculo) en un recipiente con el objetivo de iniciar un cultivo microbiano.

MICROBIAL FUEL CELL: traducido literalmente como “celda de combustible microbiana”. Corresponde a un dispositivo que convierte energía química en energía eléctrica, donde microorganismos cumplen una función catalizadora.

NEUTRALIZACIÓN: cambio en el valor de pH de una solución a un valor cercano a 7 (pH neutro).

OXIDACIÓN/REDUCCIÓN: reacciones que implican la transferencia de electrones entre sus reactantes. Una especie química se oxida/reduce cuando cede/capta electrones y por tanto aumenta/reduce su estado de oxidación.

TAMPÓN: solución que permite amortiguar cambios drásticos de pH.

GLOSSARY

ACIDOPHILIC BACTERIUM: organism that preferably lives in conditions with a $\text{pH} < 3$.

ALKALINITY: water capacity to neutralize acids. In general, this is determined by the presence of HCO_3^- (bicarbonate) and CO_3^{2-} (carbonate) ions.

AIR CATHODE: special type of cathode that is in contact with external air, allowing for the diffusion of atmospheric oxygen inside of the chamber, where it acts as the final electron acceptor of a fuel cell.

BATCH: a term used to describe a reactor whose volume does not vary over time since it does not have input or output flows.

BIOFILM: complex microorganism structure associated with a surface.

BUFFER: solution that prevents drastic changes in pH.

ELECTRON DONOR/ACCEPTOR: chemical species that releases/captures electrons in an oxidation reduction reaction.

ELECTROLYTE: electricity-conductive solution. In a fuel cell, the anolyte and catholyte are present in the anode and cathode chambers, respectively.

ENRICHMENT: in microbiology, this is a culture procedure that favors the growth of particular microorganisms over others.

EXOELECTROGENIC: microorganisms that can transfer electrons to the extracellular medium.

INOCULATE: act of introducing microorganisms (i.e. inoculum) into a container to start a microbial culture.

MICROBIAL FUEL CELL: device that converts chemical energy into electrical energy, with microorganisms acting as catalyst.

NEUTRALIZATION: pH change in a solution to a value close to neutral (i.e. pH 7).

OXIDATION/REDUCTION: reactions involving electron transfer between reactants. A chemical species is oxidized/reduced when it releases/captures electrons and therefore increases/decreases its oxidation state.

PRINCIPIO CIENTÍFICO

Una MFC es un dispositivo que transforma energía química, proveniente de un sustrato reducido, en energía eléctrica [8]. Este proceso es catalizado por microorganismos exoelectrogénicos, que oxidan compuestos orgánicos o inorgánicos y transfieren estos electrones a un electrodo (ánodo). Este electrodo transmitirá los electrones externamente a un segundo electrodo (cátodo), acto que genera corriente eléctrica.

Para que ocurra la generación de corriente en una MFC, se requieren ciertos elementos mínimos (**Figura 6**) [13]: un ánodo y un cátodo; una o dos cámaras contenedoras de electrolitos; una reacción red-ox global que sea espontánea en las condiciones de operación de la MFC; un dador y un aceptor de electrones; una comunidad microbiana anódica con presencia de exoelectrogénicos; y una resistencia externa.

Los microorganismos exoelectrogénicos utilizan diferentes mecanismos para la transferencia de electrones al ánodo [13]: la generación de nanocables conductores desde su membrana celular; transportadores de electrones que se reducen temporalmente para luego oxidarse cerca del electrodo; y transferencia por contacto directo del microorganismo con el electrodo. Independiente del mecanismo utilizado, la transferencia de electrones siempre implica un bombeo de protones hacia el medio extracelular, los cuales serán eventualmente utilizados en la reducción del aceptor final de electrones en el cátodo [14].

CIENTIFIC PRINCIPLE

A MFC is a device that converts chemical energy from a reduced substrate into electrical energy [8]. This process is catalyzed by exoelectrogenic microorganisms that oxidize organic or inorganic compounds and that transfer the resulting electrons to an electrode (i.e. anode). This electrode will externally transmit electrons to a second electrode (i.e. cathode), thereby generating an electric current.

The following minimum elements are needed to generate current in a MFC (**Figure 6**) [13]: an anode and cathode; one or two electrolyte-holding chambers; a spontaneous global redox reaction during MFC operation; an electron donor and acceptor; a microbial community with an exoelectrogenic anode; and an external load.

Exoelectrogenic microorganisms use different mechanisms for transferring electrons to the anode [13], such as by generating conductive nanowires from the cell membrane; through electron transporters that are temporarily reduced and then oxidized near the electrode; and by direct-contact transfer with the electrode. Regardless of the mechanism, the electron transfer always involves pumping protons into the extracellular environment, which will eventually be used in reducing the final electron acceptor in the cathode [14].

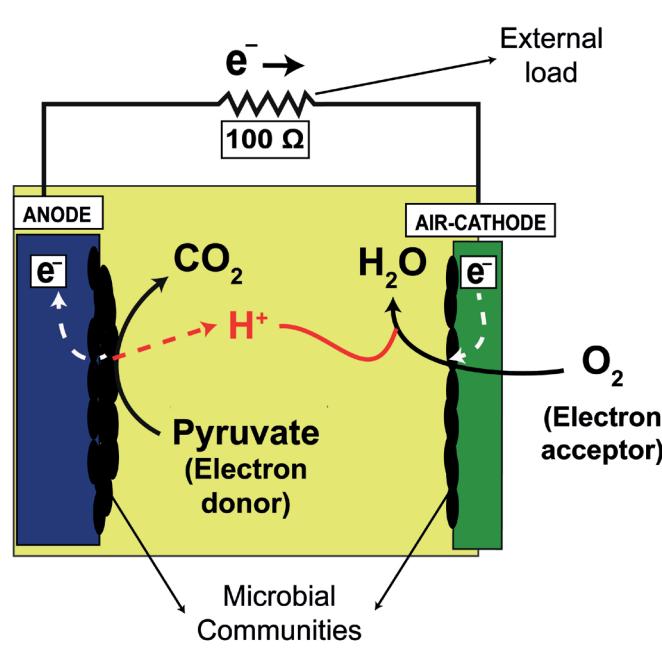


Figura 6. Esquema de la MFC de cámara simple utilizada en este estudio.

Figure 6. Layout of the single-chamber MFC used in this study.

REFERENCES

- [1] LEFEBVRE, O., NECULITA, C., YUE, X., NG, HY. "Bioelectrochemical treatment of acid mine drainage dominated with iron". *Journal of Hazardous Materials*. 2012, vol. 241-242, p. 411-417.
- [2] JOHNSON, B., HALLBERG, K. "Acid Mine Drainage Remediation Options: A Review". *Science of the Total Environment*. 2005, vol. 338, núm. 1-2, p 3-14.
- [3] BONILLA, et al. "Mejor agua para el río Lluta". *Revista Universitaria*. 2012, núm. 115, p. 48-53.
- [4] CHENG, S., DEMPSEY, B., LOGAN, B. "Electricity Generation from Synthetic Acid-Mine Drainage (AMD) Water using Fuel Cell Technologies". *Environmental Science & Technology*. 2007, vol. 41, núm. 23, p. 8149-8153.
- [5] BOROLE, A., et al. "A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile Acidiphilum cryptum". *Biotechnology Letters*. 2008, vol. 30, núm. 8, p.1367-1372.
- [6] LIU, H., LOGAN, B. "Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane". *Environmental Science and Technology*. 2004, vol. 38, núm. 14, p. 4040-4046.
- [7] HE, Z., et al. "Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell". *Bioelectrochemistry*. 2008, vol. 74, núm. 1, p. 78-82.
- [8] LOGAN, B., et al. "Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology". *Environmental Science and Technology*. 2006, vol. 40, núm. 17, p. 5181-5192.
- [9] NEWMAN, D., BEVERIDGE, T., MOREL, F. "Precipitation of Arsenic Trisulfide by Desulfotomaculum auripigmentum". *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, vol. 63, núm. 5, p. 2022-2028.
- [10] SKERMAN, V. *A guide to the identification of the genera of bacteria*. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1967. 303 p.
- [11] XING, D., et al. "Electricity Generation by Rhodopseudomonas palustris DX-1". *Environmental Science and Technology*. 2008, vol. 42, núm 11, p. 4146-4151.
- [12] KAKSONEN, A., PUHAKKA, J. "Review: Sulfate Reduction Based Bioprocesses for the Treatment of Acid Mine Drainage and the Recovery of Metals". *Engineering in Life Sciences*. 2007, vol. 7, núm. 6, p. 541-564.
- [13] LOGAN, B., REGAN, J. "Microbial Fuel Cells - Challenges and Applications". *Environmental Science and Technology*. 2006, vol. 40, núm. 17, p. 5172-5180.
- [14] FRANKS, A., NEVIN, K. "Microbial Fuel Cells, A Current Review". *Energies*. 2010, vol. 3, p. 899-919.

EQUIPO DE INVESTIGADORES / RESEARCH TEAM



Enzo Leiva
Aravena



Eduardo Leiva
Llantén



Ignacio Vargas
Cucurella