

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA

*“Uso de Celdas de Combustible Microbiano con cátodo al aire para el tratamiento de aguas residuales del procesamiento del café”*

Trabajo Final de Graduación presentado como requisito para optar por el grado de  
Licenciatura en Química

José Ricardo Villegas Jiménez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2020

## Tabla de contenidos

<i>Resumen</i> .....	<i>vii</i>
<i>Lista de cuadros</i> .....	<i>ix</i>
<i>Lista de figuras</i> .....	<i>x</i>
<i>Lista de abreviaturas</i> .....	<i>xii</i>
<i>Introducción</i> .....	<i>1</i>
<b>1. Fundamento teórico</b> .....	<b>3</b>
1.1. Beneficiado húmedo de café .....	3
1.1.1. Despulpado.....	3
1.1.2. Desmucilaginado.....	4
1.1.3. Lavado.....	4
1.2. Tratamiento de las aguas residuales del procesamiento del café .....	4
1.3. Celda de Combustible Microbiano.....	7
1.3.1. Cámara catódica .....	8
1.3.2. Modificación del cátodo con catalizador.....	9
1.3.3. Configuración con cátodo al aire.....	11
1.3.4. Cámara anódica .....	11
1.3.5. Microorganismos electrogénicos.....	12
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>21</b>
3.1. Objetivo general .....	21
3.2. Objetivos específicos .....	21
<b>4. Metodología</b> .....	<b>22</b>
4.1. Caracterización fisicoquímica del agua residual del procesamiento del café .....	22
4.1.1. Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	22
4.1.2. Contenido de sólidos .....	23
4.1.3. Porcentaje de humedad.....	23
4.1.4. Contenido de fibra.....	23
4.1.5. Relación carbono y nitrógeno (C:N) .....	25
4.2. Caracterización microbiológica de las bacterias previamente aisladas del agua residual del procesamiento del café .....	25
4.2.1. Preparación del medio de cultivo .....	25
4.2.2. Estudio preliminar de la ruta respiratoria de transferencia extracelular directa de electrones.....	26
4.2.3. Cuantificación de Fe <sup>2+</sup> .....	26
4.3. Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire .....	27
4.3.1. Estudio del cátodo .....	27
4.3.2. Modificación del cátodo.....	30
4.3.3. Estudio del ánodo .....	31
4.3.4. Tratamiento del ánodo.....	31
4.4. Tratamiento del agua residual del procesamiento del café mediante el uso de CCM con cátodo al aire .....	32
<b>5. Resultados y discusión</b> .....	<b>33</b>

5.1.	Caracterización fisicoquímica del agua residual del procesamiento del café.....	33
5.2.	Caracterización microbiológica de las bacterias previamente aisladas del agua residual del procesamiento del café.....	36
5.3.	Condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire.....	39
5.3.1.	Electrodos.....	40
5.3.2.	Cámara catódica.....	42
5.3.3.	Cámara anódica.....	47
5.4.	Desempeño de una Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire en el tratamiento del agua residual del procesamiento del café.....	52
	<i>Conclusiones y recomendaciones.....</i>	<i>57</i>
	<i>Referencias bibliográficas.....</i>	<i>60</i>
	<i>Anexos.....</i>	<i>68</i>
A.	Datos experimentales.....	68
B.	Imágenes de los ensayos.....	80
C.	Pruebas.....	85
D.	Documentos adjuntos.....	88

## Resumen

El principal impacto ambiental de la industria del café es la generación de alrededor de 8 L de agua residual (*agua miel*) por kg de café en grano, y el tratamiento de esta agua para una adecuada disposición final representa un 6,3 % del costo total del beneficiado de café. En un esfuerzo para buscar opciones de tratamiento, en el presente trabajo, se plantea el uso de Celdas de Combustible Microbiano (CCM) con cátodo al aire debido a su característica dual: tratamiento de residuos y generación de energía.

El rendimiento de las CCM está determinado por varios factores como los electrodos y el tipo de sustrato. Con el propósito de desarrollar celdas más eficientes se han investigado diferentes configuraciones y modificaciones. La configuración con cátodo al aire mejora su desempeño al disminuir la resistencia interna, ya que el cátodo está expuesto a la atmósfera y permite el suministro directo de oxígeno. Se ha reportado la alimentación de estas celdas con aguas residuales de industrias lácteas, agrícolas, así como aguas negras domésticas. Esta investigación trabajó en la implementación del agua residual del procesamiento del café a un tratamiento con CCM.

Se caracterizó fisicoquímicamente el sustrato y se determinó que es rico en material lignocelulósico, lo que dificulta la degradación anaerobia de microorganismos electrógenos y a su vez la generación de corriente eléctrica. La relación C:N del agua residual del procesamiento del café se encuentra en el rango óptimo para el desarrollo de microorganismos que contribuyen a la degradación de materia orgánica. Si se considera el tratamiento actual de este residuo, de aspersión sobre pasto “estrella”, esta relación es baja en términos de valor nutricional para los suelos. Además, el pH ácido y la alta carga orgánica provocan que esta disposición pueda ser perjudicial.

Se realizó un estudio preliminar de la ruta de transferencia electrónica a especies químicas solubles e insolubles de Fe(III) de bacterias previamente aisladas del agua residual del procesamiento del café. Esta caracterización microbiológica evidenció la presencia de la bacteria *Enterobacter asburiae* con capacidad de reducir especies químicas solubles e insolubles en medio anaerobio, característica presente en microorganismos electrogénicos.

El estudio de las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una CCM permitió seleccionar el electrodo de tela de carbono modificado con catalizador tipo perovskita  $Cs_4NiBi_2Cl_{12}$  como cátodo para evaluar su desempeño en la configuración

con cátodo al aire. Se realizó un recubrimiento catalítico de una masa promedio de  $(0,46 \pm 0,07)$  mg/cm<sup>2</sup> bajo la técnica *drop casting*. La voltametría cíclica evidenció que el electrodo de tela de carbono modificado exhibe actividad catalítica para la reacción de reducción de oxígeno (ORR, por sus siglas en inglés), sin embargo, presentó bajo desempeño en comparación con el electrodo comercial catalizado con MnO<sub>2</sub> (electrodo control).

Se seleccionó el electrodo de cepillo de fibras de carbono como ánodo por su alta área superficial. Se logró determinar que un tratamiento con amoníaco en el ánodo disminuye la resistencia óhmica propia de la biopelícula al reflejar un aumento del 50 % en el voltaje generado. Así mismo, se observó que *Enterobacter asburiae* a pesar de presentar evidencia electrogénica no presenta un buen desempeño en la transferencia directa de electrones hacia el electrodo en una CCM.

Se implementó esta configuración para el tratamiento del agua residual del procesamiento de café, lo que permitió una remoción del 28 % de DQO en un periodo de 5 días y exhibió una eficiencia coulombica que se encuentra en el rango de  $(0,173 - 0,209)$  %, baja en comparación a otros sustratos. Esta configuración de celda también logró generar un valor de densidad de corriente máxima igual a  $(13,28 \pm 0,04)$  μA/cm<sup>2</sup>.

El agua residual del procesamiento del café es un sustrato complejo que limita la degradación microbiana relacionado con la generación de electricidad. Es importante reconocer que no todos los residuos pueden ser adecuados para alimentar directamente las CCM, pero, existen diferentes estrategias que pueden mejorar su capacidad de generación de voltaje.

*Palabras clave:* Energía renovable, Celda de Combustible Microbiano, cátodo al aire, electroquímica, comunidad bacteriana, microorganismo electrógeno, agua residual, café.

*Directora del Trabajo Final de Graduación:* M. Sc. Paola Fuentes Schweizer.

## Lista de cuadros

<b>Cuadro I.</b> Residuos de las diferentes etapas del procesamiento del café <sup>10</sup> .....	4
<b>Cuadro II.</b> Límites máximos permisibles de vertido de aguas residuales de beneficiado de café. ....	5
<b>Cuadro III.</b> Ecuaciones de las reacciones químicas de la reducción de oxígeno y sus potenciales de reducción <sup>4,22</sup> .....	8
<b>Cuadro IV.</b> Desempeño de diferentes sustratos e inóculos en CCM. ....	17
<b>Cuadro V.</b> Desempeño de diferentes sistemas de CCM de una cámara. ....	18
<b>Cuadro VI.</b> Descripción de los electrodos empleados como ánodo y cátodo para establecer las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una CCM con cátodo al aire. ....	29
<b>Cuadro VII.</b> Resultados de los diferentes parámetros de la caracterización del agua residual del procesamiento del café. ....	33
<b>Cuadro VIII.</b> Densidad óptica (O.D.) y concentración de Fe <sup>2+</sup> reducido por las diferentes bacterias en los medios de cultivo anaerobios con disolución aceptora de electrones de especies Fe <sup>3+</sup> .....	37
<b>Cuadro IX.</b> Masa de la perovskita de Cs <sub>4</sub> NiBi <sub>2</sub> Cl <sub>12</sub> por unidad de área inmovilizada en los electrodos de tela de carbono posterior al recubrimiento bajo la técnica <i>drop casting</i> .....	45
<b>Cuadro X.</b> Promedio de la densidad de corriente máxima como parámetro de desempeño del correcto funcionamiento del electrodo en la cámara catódica en una CCE configuración con doble cámara y con cátodo al aire. ....	46
<b>Cuadro XI.</b> Promedio de la densidad de corriente máxima como parámetro de desempeño del correcto funcionamiento del electrodo de fibras de carbono en la cámara anódica en una CCM configuración con doble cámara y el efecto de un tratamiento de NH <sub>3</sub> . ....	49
<b>Cuadro XII.</b> Desempeño de una CCM con cátodo al aire empleando electrodo comercial catalizado con MnO <sub>2</sub> y agua residual del procesamiento del café como sustrato con DQO inicial 27 g/L. ....	53

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura del fruto del café.....	3
<b>Figura 2.</b> Fases el proceso de descomposición anaerobia.....	6
<b>Figura 3.</b> Diagrama esquemático de una Celda de Combustible Microbiano con doble cámara.....	7
<b>Figura 4.</b> Estructura general de la perovskita $ABX_3$ .....	9
<b>Figura 5.</b> Estructura cristalina, $Cs_4MB_2X_{12}$ , de doble perovskita.....	10
<b>Figura 6.</b> Diagrama esquemático de una Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire.....	11
<b>Figura 7.</b> Ruta respiratoria Mtr propuesta de la bacteria <i>Shewanella oneidensis</i> para el mecanismo transferencia extracelular de electrones.....	13
<b>Figura 8.</b> Promedio de la densidad óptica (O.D.) de las diferentes bacterias en los medios de cultivo anaerobios con disolución aceptora de electrones con especies $Fe^{3+}$ .....	38
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de conversión $Fe^{2+}$ reducido por las diferentes bacterias en los medio de cultivo anaerobios con disolución receptora de electrones con especies químicas $Fe^{3+}$ .....	39
<b>Figura 10.</b> Voltametría cíclica vs. (Ag/AgCl) de un electrodo de tela de carbono empleando PBS (pH = 6,67 y 0,1/1,5 mol/L) como electrolito soporte y velocidad de barrido de 25 mV/s: (a) electrodo modificado perovskita $Cs_4CuBi_2Cl_{12}$ aireado, (b) electrodo modificado con perovskita $Cs_4CuBi_2Cl_{12}$ con purga de nitrógeno y (c) electrodo sin modificar.....	41
<b>Figura 11.</b> Voltametría cíclica vs. (Ag/AgCl) de un electrodo de tela de carbono empleando PBS (pH = 6,67 y 0,1/1,5 mol/L) como electrolito soporte y velocidad de barrido de 25 mV/s: (a) electrodo modificado perovskita $Cs_4NiBi_2Cl_{12}$ aireado, (b) electrodo modificado con perovskita $Cs_4NiBi_2Cl_{12}$ con purga de nitrógeno y (c) electrodo sin modificar.....	42
<b>Figura 12.</b> Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo de una CCE con doble cámara $Fe^{2+}/Br_2$ para evaluar el correcto funcionamiento del electrodo de tela de carbono sin modificar.....	43
<b>Figura 13.</b> Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo de una CCE con doble cámara y cátodo aireado, una CCE con cátodo al aire modificado con perovskita, y una CEE con cátodo al aire sin modificar para evaluar el correcto funcionamiento de la configuración de celda con cátodo al aire.....	44
<b>Figura 14.</b> Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo de una CCE con cátodo al aire comercial catalizado con $MnO_2$ para evaluar el desempeño del electrodo de tela de carbono modificado con perovskita.....	46
<b>Figura 15.</b> Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo en una CCM con doble cámara inoculada con <i>Shewanella oneidensis</i> empleando como ánodo cepillo de carbono con y sin tratamiento de $NH_3$ .....	48
<b>Figura 16.</b> Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo en una CCM con doble cámara inoculada con <i>Enterobacter asburiae</i> empleando como ánodo cepillo de carbono con y sin tratamiento de $NH_3$ .....	49

**Figura 17.** Rayado de bacteria: (a) *S. oneidensis* y (b) *E. asburiae* inoculadas en un CCM con doble cámara empleando ánodo con y sin tratamiento de  $\text{NH}_3$  en platos de AN. .... 51

**Figura 18.** Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo en una CCM con cátodo al aire empleando agua residual del procesamiento del café como sustrato..... 52

## Lista de abreviaturas

<b>CMM</b>	Celda de Combustible Microbiano
<b>CCE</b>	Celda de Combustible Electroquímica
<b>CELEQ</b>	Centro de Electroquímica y Energía Química
<b>CIA</b>	Centro de Investigaciones Agronómicas
<b>CINA</b>	Centro de Investigación en Nutrición Animal
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxígeno
<b>MINAE</b>	Ministerio de Ambiente y Energía
<b>ORR</b>	Oxygen Reduction Reaction (Reacción de Reducción de Oxígeno)
<b>EEH</b>	Electrodo Estándar de Hidrógeno
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution (Disolución Amortiguadora de Fosfatos)
<b>AN</b>	Agar Nutritivo
<b>MRS</b>	De Man, Rogosa y Sharpe
<b>CE</b>	Coulombic Efficiency (Eficiencia Coulómbica)

## Introducción

La generación, el almacenamiento y el consumo de energía son temas frecuentes en muchas áreas de la investigación de interés mundial<sup>1</sup>. La investigación sobre la generación de energías limpias sigue en aumento y se han explorado varias tecnologías que muestran resultados prometedores. Las Celdas de Combustible Microbiano (CCM) representan una tecnología en desarrollo que emplea reacciones catalíticas microbianas en el ánodo para la generación de electricidad a partir de residuos y biomasa renovable<sup>1</sup>.

Las CCM presentan dos ventajas: generación de electricidad y lograr, simultáneamente, el tratamiento de aguas residuales al bajar su carga orgánica<sup>2</sup>, por lo cual el proceso se vuelve más ecológico y factible. Esta combinación se ha investigado ampliamente para el desarrollo de diferentes configuraciones y modificaciones para maximizar su funcionamiento. La configuración con cátodo al aire mejora su desempeño al disminuir la resistencia interna, ya que el cátodo está expuesto a la atmósfera y permite el suministro directo de oxígeno<sup>3,4</sup>.

Este tipo de celdas constituyen un método de biorremediación de contaminantes y disminución de la cantidad de nutrientes específicos en las aguas residuales<sup>5</sup>. La recuperación de metales pesados, la decoloración de tintes, la producción de bioenergía como el metano, hidrógeno e incluso biomasa son algunas de las aplicaciones de las CCM<sup>6</sup>.

Sin embargo, existen algunos obstáculos para que las CCM se empleen ampliamente. El principal inconveniente en la operación de estas celdas es la baja generación de potencia<sup>1,2,7</sup>. Al ser un sistema que involucra una serie de reacciones de acoplamiento bioelectroquímico, el sustrato es un elemento importante de producción de energía como donador de electrones. Las bacterias oxidan el sustrato para generar los electrones, y la velocidad de utilización del sustrato indica la velocidad de reacción en los reactores<sup>7</sup>.

La investigación de este sistema en diferentes sustratos es importante para optimizar su funcionamiento general. En Costa Rica, la producción de café representa una de las principales actividades económicas del país, al ser el tercer producto de exportación<sup>8,9</sup>. En el periodo de cosecha 2018 – 2019 se produjeron 1 717 659 fanegas (1 fanega equivale a 250 kg) de café fruta<sup>8</sup>, del cual solo el 18 % del peso total del fruto se procesa a grano oro<sup>8</sup>. Es decir, que la actividad cafetalera produce más de 300 000 toneladas de residuos anuales. De

esto deriva la importancia del adecuado manejo de la actividad agrícola, específicamente en la correcta disposición de los residuos.

En búsqueda de una solución sostenible para este residuo en el país, este proyecto en colaboración con el Centro de Electroquímica y Energía Química (CELEQ) y el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) evaluó el desempeño de una Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire para el tratamiento de aguas residuales del procesamiento del café. Para esto fue fundamental realizar un estudio fisicoquímico y microbiológico del agua residual, así como de los diferentes componentes de la celda para evaluar su correcto funcionamiento. Posteriormente se implementó esta tecnología utilizando como sustrato el agua residual del procesamiento del café y se evaluó su desempeño.

El presente trabajo de investigación se encuentra organizado de la siguiente manera:

En el Capítulo 1 se presenta el fundamento teórico de la investigación, donde se abordan conceptos claves relacionados al beneficiado húmedo de café, al tratamiento actual que se les realiza a los principales residuos de la actividad cafetalera y al funcionamiento de las CCM, así como los factores que determinan su rendimiento.

En el Capítulo 2 se realiza una revisión bibliográfica del estado actual de la tecnología de las CCM y su aplicación para el tratamiento de residuos.

En el Capítulo 3 se detallan los objetivos de la presente investigación.

En el Capítulo 4 se describen los materiales, métodos y condiciones de trabajo empleadas para realizar la caracterización del sustrato y el estudio del correcto funcionamiento de la celda.

En el Capítulo 5 se presenta el análisis y discusión de los resultados obtenidos durante la evaluación del desempeño de la celda.

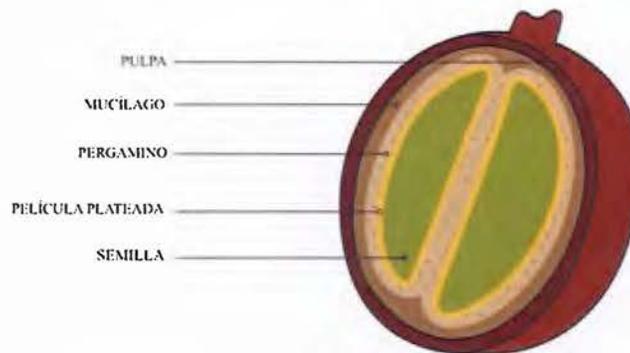
Por último, se presentan las conclusiones de la investigación y las recomendaciones para futuros trabajos.

## 1. Fundamento teórico

### 1.1. Beneficiado húmedo de café

El procesamiento del café mediante beneficiado húmedo es fundamental para mantener y destacar la excelente calidad del café que proviene de los diferentes valles y cordilleras del país. No obstante, la calidad del café se contrapone a los costos ambientales que trae consigo el beneficiado húmedo en términos de contaminación de ecosistemas, alto consumo de agua y uso ineficiente de la energía<sup>10-12</sup>.

El proceso de beneficiado húmedo de café consiste en el desprendimiento de la pulpa o cáscara y del mucílago (*miel*) del grano por medio de la despulpadora y el uso de agua<sup>10</sup>. En la *Figura 1* se puede observar la estructura del fruto del café, la pulpa representa el 29 % del peso del fruto<sup>13</sup>, mientras que el mucílago y pergamino representan el 5 % y 12 %, respectivamente.



Tomado de Audet, J.<sup>14</sup>

**Figura 1.** Estructura del fruto del café.

Este proceso consta de varios pasos, inicia con la clasificación de la fruta, posteriormente incluye: el despulpado, el desmucilaginado y el lavado, por último, concluye con el secado y almacenamiento del grano.

#### 1.1.1. Despulpado

El despulpado es la etapa inicial de la fase húmeda del proceso. El grano no sufre ningún cambio fisiológico o bioquímico sino consiste en desprender la pulpa y parte del mucílago adherido a ella en forma mecánica, se utiliza una despulpadora que emplea mecanismos de presión y fricción<sup>10</sup>. En esta etapa se genera un residuo que se conoce como broza y se incurre en pérdidas de café grano. El café despulpado, con un remanente importante de mucílago (*mieles*), continúa hacia el proceso de desmucilaginado<sup>11</sup>.

### 1.1.2. Desmucilaginado

Con el propósito de eliminar por completo el mucílago que recubre el grano de café, se puede realizar un proceso de fermentación o desmucilaginado mecánico. En la fermentación se transforma el mucílago en una sustancia soluble en agua a través de la acción enzimática de microorganismos y su posterior lavado<sup>15</sup>. Mientras que el método mecánico consiste en eliminar el mucílago por medios físicos, donde por medio de la rotación se generan esfuerzos cortantes en la masa y fricción entre los granos<sup>10</sup>.

### 1.1.3. Lavado

En esta etapa se desprende el mucílago del pergamino con ayuda del agua cuando este ha alcanzado su punto óptimo de fermento. Al café lavado se le ha removido la mayor parte de los residuos presentes en el grano (pedazos de pulpa, mucílago, granos secos y cuerpos extraños). En este proceso se obtienen la mayor parte de residuos líquidos del procesamiento del café, que se conocen como *agua miel*<sup>16</sup>. Por último, el pergamino se remueve en una etapa de secado y remoción mecánica sobre el grano oro<sup>10</sup>.

## 1.2. Tratamiento de las aguas residuales del procesamiento del café

La producción de café, como se puede observar en el *Cuadro I*, conlleva la generación de residuos con alta carga orgánica. Estrategias para su uso consisten, en el caso de los residuos sólidos de pulpa, mucílago y pergamino o cascarilla en la aplicación directa a plantaciones o después de realizar un proceso aerobio de compostaje<sup>10</sup>. Mientras que la gran cantidad de lixiviados y aguas residuales son comúnmente sometidos a tratamientos como sistemas aerobios, reactores anaerobios, lagunas anaerobias o aspersión sobre pasto “estrella”<sup>16,17</sup>, esta última actividad está regulada por el MINAE.

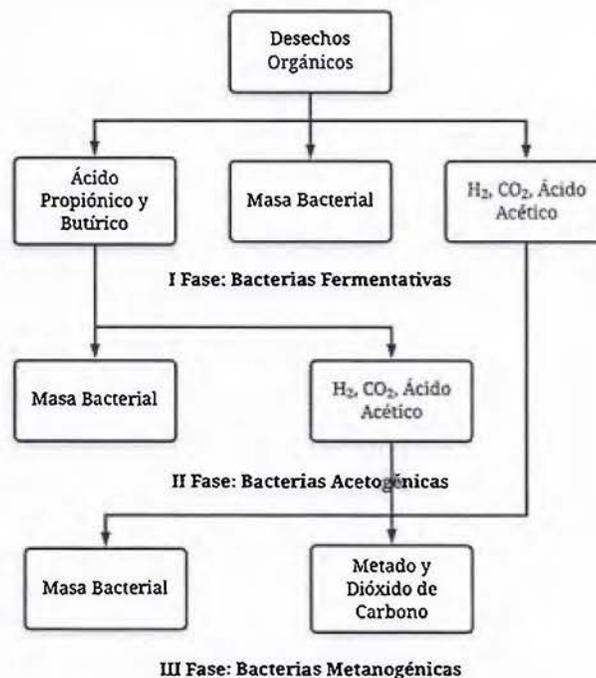
**Cuadro I.** Residuos de las diferentes etapas del procesamiento del café<sup>10</sup>.

Etapa	Residuo
Despulpado	Pulpa o broza y agua para fermentación
Desmucilaginado mecánico	Mucílago
Lavado	Mucílago hidrolizado o <i>agua miel</i>
Secado	Pergamino o cascarilla

Las aguas residuales del procesamiento del café antes de algún tratamiento reportan valores típicos de DQO entre los (8 000 – 20 000) mg/L, pH menor a 4 y sólidos totales cercanos a 8 000 mg/L, más elevados a los permitidos según la normativa del país<sup>16</sup>. De

pilas de fermentación. En la pila de almacenamiento, la acidificación se vuelve anaerobia, pues en el agua no entra suficiente oxígeno para que sobrevivan las bacterias aerobias. En este punto las bacterias anaerobias siguen el proceso de fermentación donde se producen ácidos grasos volátiles, principalmente ácido acético. Simultáneamente las bacterias metanogénicas se alimentan del ácido acético para así producir una mezcla mayoritariamente compuesta de metano y dióxido de carbono, conocida como biogás<sup>11</sup>.

Todo lo anterior, se puede esquematizar en la *Figura 2* que en forma sencilla describe el proceso de descomposición anaerobia de las aguas residuales.



Elaboración propia

**Figura 2.** Fases del proceso de descomposición anaerobia.

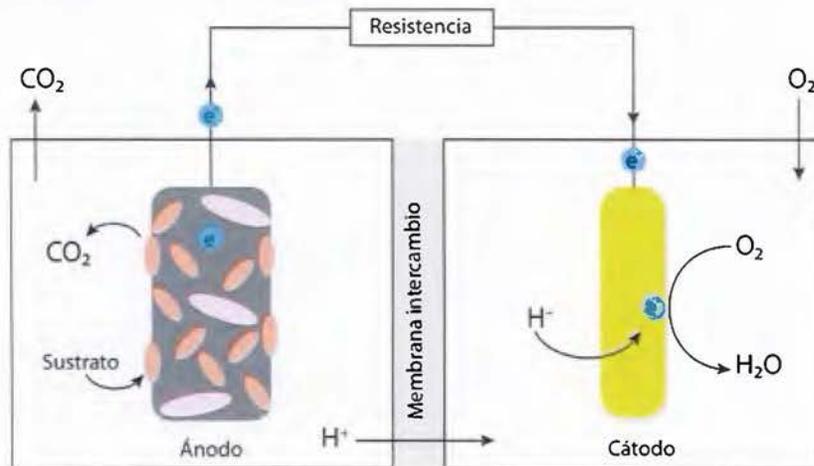
Actualmente, el tratamiento de aguas residuales por aspersión sobre pasto “estrella” (*Cynodon neimfluensis*) ha llamado la atención en la mayoría de los beneficios de café del país, debido a su bajo costo comparado con los demás tratamientos. Para implementar este sistema de tratamiento se debe minimizar la producción de agua residual y para lograr esto se debe consumir menos de 1 000 L y en algunos casos menos de 500 L de agua por fanega, para garantizar que las aguas residuales se comporten como lodos<sup>10</sup>. Sin embargo, esto conlleva a la concentración que resulta en agua residual con parámetros mayores a los típicos<sup>16</sup>.

Por otro lado, se debe demostrar técnicamente la viabilidad ambiental y excluir la posibilidad de la contaminación de los acuíferos, y contar con al menos 2 pozos de monitoreo para medir el impacto sobre las aguas subterráneas. Además, a la hora de la aspersión se debe contar con una etapa de tamizado previo para evitar la presencia de sólidos<sup>10</sup>.

Este tipo de tratamiento es muy conocido y utilizado, pero otro, que presenta una tecnología atractiva que trata el agua residual al bajar su carga orgánica y produce electricidad simultáneamente, se está abriendo paso en este campo.

### 1.3. Celda de Combustible Microbiano

Las Celdas de Combustible Microbiano (CCM) son un tipo de celda combustible que utiliza microorganismos activos como biocatalizador en un compartimento anódico para la producción de bioelectricidad<sup>19</sup>. Como se observa en la *Figura 3*, la mayoría de las CCM consisten en dos cámaras: anódica y catódica, físicamente separadas por una membrana de intercambio de protones. El biocatalizador activo en el ánodo oxida anaeróbicamente los sustratos orgánicos, esta oxidación produce electrones, protones ( $H^+$ ) y  $CO_2$  como productos. Los protones se conducen a la cámara catódica a través de la membrana, y los electrones se transportan a través del circuito externo hacia el cátodo<sup>19</sup>.



Elaboración propia

**Figura 3.** Diagrama esquemático de una Celda de Combustible Microbiano con doble cámara.

Los protones y electrones reaccionan en el cátodo para llevar a cabo la reducción de oxígeno a agua. El oxígeno en la cámara anódica inhibiría la producción de electricidad, de

ahí la importancia de mantener las bacterias separadas del oxígeno por medio de la membrana de intercambio de protones<sup>20</sup>.

El rendimiento de la CCM está influenciado por varios factores, principalmente: el suministro y consumo de oxígeno en la cámara del cátodo, la oxidación de sustratos en la cámara del ánodo, el flujo electrónico desde el ánodo hasta el cátodo y la permeabilidad de la membrana de intercambio de protones<sup>3,20,21</sup>.

### 1.3.1. Cámara catódica

El oxígeno del aire se ha utilizado ampliamente en las CCM como aceptor de electrones debido a su disponibilidad y sostenibilidad. Sin embargo, el alto sobrepotencial de la reacción de reducción de oxígeno (ORR, por sus siglas en inglés) y el suplemento continuo de oxígeno son dos de los principales problemas de la celda<sup>4,20,21</sup>. La ORR en disolución electrolítica ocurre según dos vías posibles: la reducción completa que involucra cuatro electrones a H<sub>2</sub>O y la reducción de dos electrones a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se puede observar en *Cuadro III*.

**Cuadro III.** Ecuaciones de las reacciones químicas de la reducción de oxígeno y sus potenciales de reducción<sup>4,22</sup>.

<b>Ecuación ORR</b>	<b>E<sup>0</sup> (V) vs. EEH</b>	<b>E<sup>0</sup> en condiciones de CCM (V) vs. EEH</b>
$O_{2(g)} + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2O$	+1,229	+0,805
$O_{2(g)} + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2O_2$	+0,682	+0,328

El pH neutro, las bajas capacidades de amortiguamiento y las bajas concentraciones iónicas restringen el rendimiento del cátodo para estas reacciones. Como el pH neutro y la temperatura ambiente son necesarias para el crecimiento de las bacterias en la cámara anódica, los potenciales de reducción se deben de normalizar a 25 °C y pH 7 según la ecuación [1]<sup>4</sup>:

$$E = E^0 + \frac{4F}{RT} \ln(P_{O_2}) - \frac{2,3RT}{F} pH \quad [1]$$

Donde  $E^0$  es el potencial estándar de reducción,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  es la constante del gas ideal,  $T$  la temperatura y  $P$  la presión parcial.

Al comparar estos resultados con los potenciales de reducción estándar, se evidencia la afectación por las condiciones de la CCM, de igual forma se observan caídas de potencial

debido principalmente a la alta barrera de energía de activación, por lo que el rendimiento del cátodo se considera la principal limitación en este tipo de celdas.

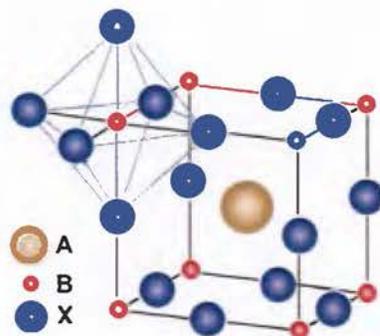
Por otro lado, el área superficial del electrodo tiene un efecto insignificante en la potencia de salida, sin embargo, la eficiencia del cátodo puede mejorarse utilizando materiales con gran área superficial o materiales granulares como el grafito. Algunos de los materiales utilizados en el cátodo son: papel de carbón, fieltro de carbono, cepillo de fibra de carbono y fibra de carbono<sup>20,23,24</sup>.

El uso de catalizadores o el diseño de diferentes configuraciones se emplea para superar la barrera de activación de la reacción catódica y eliminar la limitación del rendimiento del cátodo en la doble cámara.

### 1.3.2. Modificación del cátodo con catalizador

El catalizador determina la vía de la ORR y el rendimiento del cátodo. La catálisis es necesaria por el hecho de que un catalizador apropiado puede disminuir la energía de activación y mejorar la velocidad de reacción. La presencia de un catalizador adecuado es de suma importancia, en el caso de las CCM estos deben ser altamente activos a pH neutro, bioestables y de bajo costo<sup>25</sup>.

Las perovskitas de estructura sencilla han sido consideradas durante mucho tiempo como una categoría de catalizadores rentables con alta actividad<sup>26</sup>. Con una fórmula química nominal de  $ABX_3$ , donde los cationes B y los aniones X forman octaedros  $BX_6$  que comparten esquinas con cationes A que ocupan los sitios coordinados 12 veces dentro de la cavidad de ocho de tales octaedros (*Figura 4*). Esto permite una multitud de propiedades físicas y químicas con una amplia gama de aplicaciones catalíticas orientadas a la energía y al medio ambiente<sup>27</sup>.

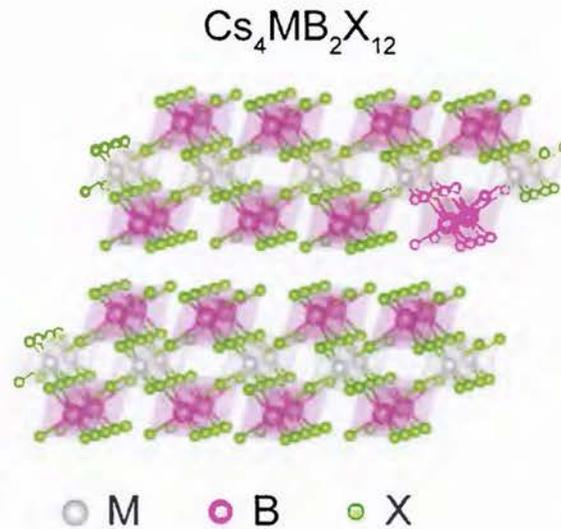


Tomado de Santomauro *et al*<sup>28</sup>.

**Figura 4.** Estructura general de la perovskita  $ABX_3$ .

El óxido de tipo perovskita está compuesto de metales de tierras raras y metales de transición, típicamente siguen la fórmula  $ABO_3$  donde A es un elemento lantánido y B es un metal de transición<sup>29,30</sup>. Estos metales son más abundantes y, por lo tanto, de menor costo que el platino y otros metales preciosos. Este tipo de óxidos pueden usarse como catalizadores de bajo costo para la ORR debido a su capacidad de carga y descarga muy rápida<sup>31</sup>.

Por otro lado, la sustitución del catión A' por A (o B' por B) conduce a la formación de una perovskita con la estructura  $A_{1-x}A'_xBX_3$  (o  $AB_{1-y}B'_yX_3$ ), donde los cationes A y A' (o B y B') toman una disposición desordenada, pero si  $x$  (o  $y$ )  $\approx 0,5$  y A' y A (o B' y B) son suficientemente diferentes en tamaño y carga, la orientación de los cationes del sitio A (o sitio B) se puede observar en la *Figura 5*. Esto da lugar a un compuesto comúnmente denominado perovskita de doble capa<sup>27,32</sup>, cuya fórmula se escribe como  $AA'B_2X_6$  (o  $A_2BB'X_6$ ).



Tomado de Xu *et al*<sup>33</sup>

**Figura 5.** Estructura cristalina,  $Cs_4MB_2X_{12}$ , de doble perovskita.

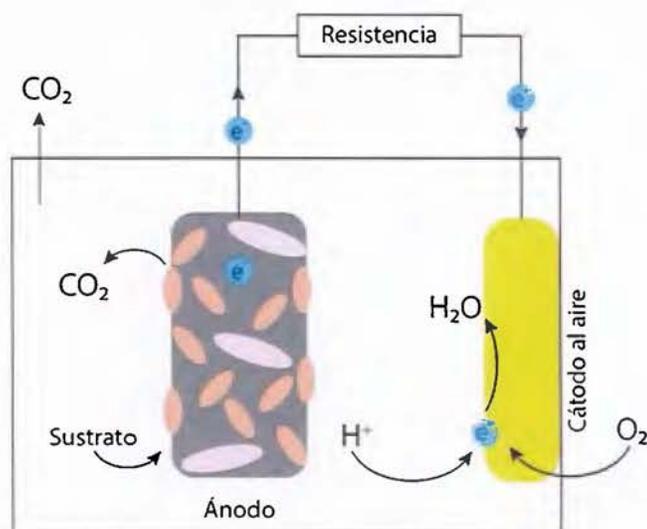
La formación de una estructura de perovskita de doble capa puede introducir varios beneficios importantes a las propiedades fisicoquímicas, afectando la actividad, la estabilidad y la eficiencia en aplicaciones catalíticas relevantes. De esta manera se considera un electrocatalizador activo y estable en ácidos y bases para la reacción de evolución de oxígeno, reacción de reducción de oxígeno y reacción de evolución de hidrógeno<sup>27</sup>.

### 1.3.3. Configuración con cátodo al aire

Las principales pérdidas que afectan el rendimiento catódico son las pérdidas óhmicas, de activación y de transporte masivo<sup>3</sup>. El diseño actual de las CCM depende de la cinética de ORR en la superficie del cátodo y está limitada por la barrera de energía de activación. Se han intentado varios enfoques, como la modificación del cátodo, el uso de mediadores y la optimización de las condiciones de trabajo, para mejorar la cinética de reacción.

La configuración con cátodo de aire es un diseño mejorado de la CCM donde se comprime la cámara del cátodo en una capa delgada hidrófila en la superficie del cátodo, de modo que el oxígeno en el aire puede difundirse pasivamente a través del cátodo al sitio de ORR sin aireación y así superar algunas de las limitaciones de la configuración de doble cámara<sup>3,4,20</sup>.

En esta configuración, como se observa en la *Figura 6*, no hay cámara anódica y catódica, por lo tanto, no se requieren de electrolitos diferentes.



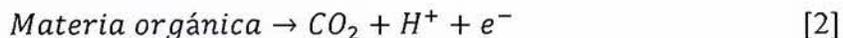
Elaboración propia

**Figura 6.** Diagrama esquemático de una Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire.

### 1.3.4. Cámara anódica

Los microorganismos presentan un papel relevante en la cámara anódica y en los electrones generados. El compartimento anódico anaerobio es una de las partes importantes de las CCM. Todas las condiciones esenciales para degradar materia orgánica se proporcionan en esta cámara, ya que se cuenta con el sustrato, los microorganismos y el

electrodo aceptor de electrones<sup>34</sup>. La reacción general en la cámara anódica se resume en la ecuación [2]:



La energía de activación requerida para esta reacción se disminuye a un medio catalizador proporcional. En este caso el tipo de sustrato y las bacterias disponibles en la cámara anaerobia generalmente funcionan como biocatalizadores.

Los materiales utilizados con mayor frecuencia en el ánodo están hechos de materiales de carbono como: cepillo de fibra de grafito, tela de carbón, varilla de grafito, papel de carbón, carbono vítreo reticulado y fieltro de carbono, por su estabilidad en cultivos microbianos, alta conductividad eléctrica y gran área superficial<sup>20,23,24</sup>.

Uno de los factores que influyen más en el rendimiento de una CCM es la transferencia anódica de los electrones microbianos, ya sea por mediadores de electrones o de manera directa sobre el electrodo<sup>20</sup>.

#### 1.3.5. Microorganismos electrogénicos

El metabolismo bacteriano conduce a la producción de electrones dentro de las células como parte del mecanismo de generación de energía en las mitocondrias<sup>3</sup>. El flujo de electrones a través de los complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC, por sus siglas en inglés) genera electricidad que se almacena como enlaces de alta energía en las moléculas de trifosfato de adenosina (ATP). Durante el metabolismo el oxígeno, nitrato, sulfato o dióxido de carbono son los aceptores terminales de electrones comúnmente encontrados en bacterias<sup>3,35</sup>.

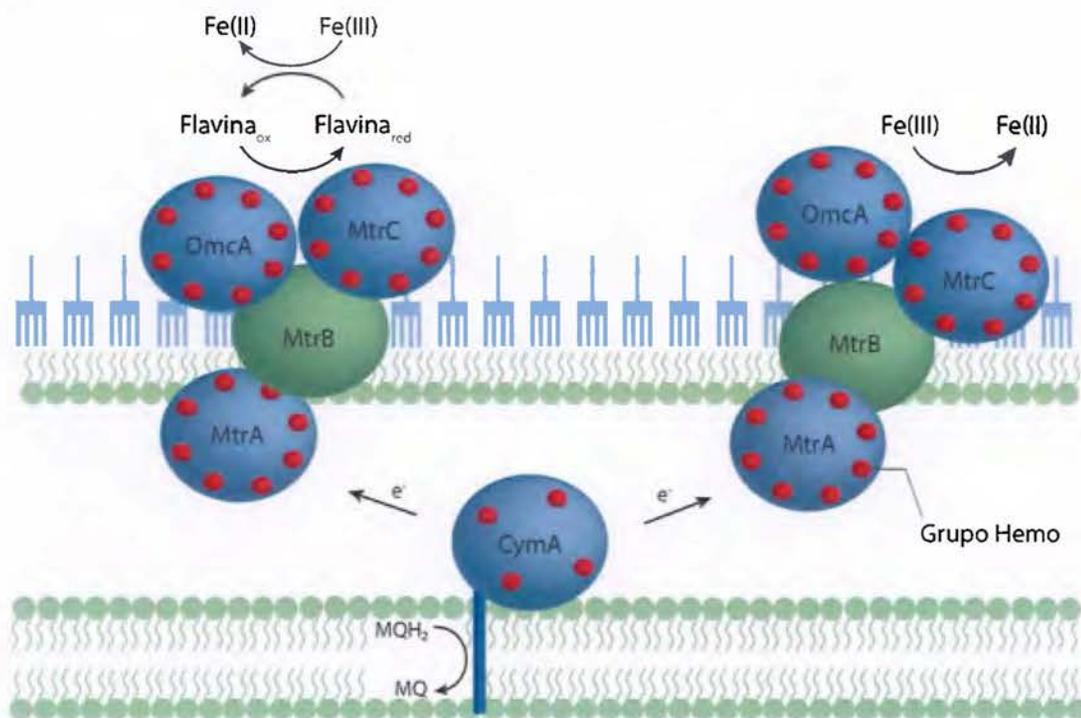
Algunos microorganismos liberan los electrones extracelularmente durante la fosforilación oxidativa, estos se conocen como electrógenos. La tecnología de las CCM se basa en el uso de este tipo de microorganismos<sup>3</sup>.

La bacteria *Shewanella oneidensis* es un miembro metabólicamente versátil de las gammaproteobacterias, dentro las propiedades notables de esta bacteria está su capacidad para transferir electrones a óxidos metálicos sólidos y su versatilidad anaerobia, es decir que puede usar más de diez aceptores de electrones diferentes<sup>36</sup>.

Este fenotipo se ha relacionado con una colección de citocromos multihemo que interaccionan en la membrana interna, espacio periplásmico, y membrana externa. Existe evidencia que muestra que algunos de estos citocromos se encuentran en la superficie de las

estructuras piliformes que se extienden desde la superficie celular<sup>37</sup>. Independientemente de la ubicación final de los citocromos, en todos los modelos de transferencia de electrónica, los electrones son transferidos desde estas proteínas a una superficie sólida o son transferidos a un mediador soluble que puede difundirse a un destino final.

Aunque el mecanismo por el cual la bacteria *Shewanella oneidensis* dona electrones al ánodo de la celda combustible o a la superficie de los óxidos metálicos no se conoce con exactitud, las investigaciones genéticas y bioquímicas generalmente son consistentes en la participación citocromos tipo c multihemo<sup>38,39</sup>: MtrC (también conocido como OmcB) y OmcA, esto se puede apreciar en la *Figura 7*.



Elaboración propia

**Figura 7.** Ruta respiratoria Mtr propuesta de la bacteria *Shewanella oneidensis* para el mecanismo transferencia extracelular de electrones.

Estos citocromos son lipoproteínas que están asociadas con la membrana externa y son translocados a través de la membrana externa por la vía de secreción de proteínas tipo II, donde están expuestas al ambiente extracelular y pueden entrar en contacto directo con superficies minerales o de electrodos<sup>39</sup>.

Las propiedades electroquímicas de los citocromos MtrC son compatibles con el intercambio directo de electrones intermoleculares a superficies sólidas. También se ha

demostrado que la bacteria *Shewanella oneidensis* y otras cepas de *Shewanella* secretan flavinas en el medio, lo que potencialmente puede transportar electrones de los citocromos en la superficie celular a los receptores externos<sup>39</sup>.

## 2. Antecedentes

En Costa Rica, desde hace más de 180 años, la actividad cafetalera es una de las principales actividades agrícolas que contribuye de manera significativa en la economía y en la generación de empleo<sup>12</sup>. Según cifras de la Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica la exportación de café representó para el país en promedio un 2,5 % del total de exportaciones durante el periodo 2018 – 2019<sup>8,9</sup>.

El procesamiento del café en Costa Rica se realiza por beneficiado bajo la técnica de vía húmeda<sup>12</sup>, en el cual se acostumbra a utilizar grandes cantidades de agua para las distintas etapas del proceso. Según datos del Instituto del Café (ICAFFE) en un beneficio de café se producen entre (4 000 – 11 500) fanegas por cosecha y cada fanega consume entre (200 – 1 000) L de agua<sup>16</sup>. En un esfuerzo por minimizar el uso de agua entre (200 – 400) L por fanega se han propuesto sistemas intensivos de recirculación de agua. Sin embargo, esto conlleva a la concentración de los contaminantes que resulta en agua residual con parámetros más elevados a los típicos.

Por otro lado, se reporta que el tratamiento de agua y desechos representa un 6,3 % del costo total del beneficiado de café, antecedido únicamente por los gastos energéticos y de mano de obra<sup>17</sup>. Dentro de este porcentaje se consideran los tratamientos por sistemas aerobios, reactores anaerobios, lagunas anaerobias y aspersión sobre pasto “estrella” o la combinación de lagunas con aspersión. Este último consiste en que las aguas crudas del proceso de beneficiado luego de pasar por un tamiz para la separación de sólidos son dispuestas en un campo para tratamiento con pasto “estrella”<sup>16,17</sup>. Este tratamiento es el de menor costo comparado con los demás tratamientos, sin embargo, este sistema requiere de una modificación en la infraestructura y significa una gran inversión en estudios de viabilidad ambiental.

Con el fin de mitigar este problema, los caficultores e instituciones cafetaleras han tratado de desarrollar estrategias para adaptarse a los cambios tecnológicos. Las Celdas de Combustible Microbiano se han convertido en una tecnología atractiva que logra dos objetivos simultáneos: tratar el agua residual y producir electricidad. Esta tecnología es un tipo de biorreactor que convierte la energía de los enlaces químicos de compuestos orgánicos a energía eléctrica mediante reacciones catalizadas por microorganismos bajo condiciones anaerobias<sup>1,2,40</sup>. Desde 1910 se ha evidenciado que es posible generar electricidad

directamente mediante el uso de bacterias para descomponer los sustratos orgánicos<sup>40</sup>. La reciente crisis energética ha revitalizado los intereses en las CCM entre los investigadores académicos como una forma de generar energía eléctrica o hidrógeno a partir de biomasa sin una emisión neta de carbono en el ecosistema.

El rendimiento de las CCM está determinado por varios factores como los electrodos y el tipo de sustrato. Se han analizado varios sustratos, tales como glucosa, acetato, butirato, cisteína, proteínas y lignocelulosa<sup>5,41,42</sup>. Se ha reportado la alimentación de estas celdas con aguas residuales orgánicas complejas tales como aguas residuales de procesamiento de alimentos, aguas residuales de cervecería, aguas residuales domésticas, aguas residuales químicas, aguas residuales de almidón, purines de estiércol de cerdos, lixiviados de vertederos, aguas residuales de empaque de carne e incluso residuos que contienen celulosa<sup>42-44</sup>. Se informa que la mayoría de las configuraciones de CCM son capaces de proporcionar eficiencias de remoción de DQO que van del 80 % al 95 %<sup>24,42</sup>.

De igual manera, la selección del microorganismo electrogénico, biocatalizador, en la cámara anódica es fundamental. Recientemente ha aumentado el número de publicaciones que discuten la detección e identificación de este tipo de microorganismos. Se ha evaluado el uso de *Shewanella putrefaciens* y *Shewanella oneidensis* como microorganismos en las CCM sin mediador para la transferencia electrónica<sup>45-48</sup>. Se ha mostrado que cepas de *Shewanella putrefaciens* cultivadas anaeróbicamente presentan actividad electroquímica mientras que las mismas cepas cultivadas aeróbicamente no, en el mismo estudio *Escherichia coli* no presentó actividad en ninguno de sus cultivos<sup>49</sup>.

Se conoce que *Shewanella oneidensis* es ideal para su uso en CCM. Esto ha llevado a investigar el efecto de un potencial aplicado en la formación y electroactividad de las biopelículas establecidas por la bacteria. Pinto *et al*<sup>47</sup> observaron que al aplicar un potencial negativo sobre el ánodo se favorece la transferencia de electrones, correlacionado con la formación progresiva de la biopelícula en las fibras y poros del electrodo, mientras que al aplicar un potencial positivo se estimula la transferencia directa de electrones que resulta en la colonización bacteriana rápida, únicamente en las fibras del electrodo.

Otro género de bacterias Gram negativas con resultados prometedores es el de la *Enterobacter*. Se han optimizado diferentes parámetros de trabajo de las CCM, sustrato y temperatura, utilizando *Enterobacter sp.* Se comparó el voltaje generado contra *Enterobacter*

*cloacae* o *Enterobacter aerogens* y se obtuvo que *Enterobacter sp.* tiene una mayor generación de voltaje con sustratos como sacarosa o acetato de sodio<sup>50</sup> y además presenta buenos rendimientos en un rango amplio de temperaturas<sup>51</sup>. Por otro lado, se ha logrado el funcionamiento de una CCM empleando celulosa como sustrato y únicamente *Enterobacter cloacae* como inóculo, sin alguna otra cepa con actividad celulolítica o mediador<sup>52</sup>.

En el *Cuadro IV* se resumen valores de densidad de corriente máxima de las CCM obtenidos con diferentes tipos de sustratos e inóculos.

**Cuadro IV.** Desempeño de diferentes sustratos e inóculos en CCM.

Sustrato	Inóculo	Configuración	Densidad de corriente máxima (mA/cm <sup>2</sup> )	Ref.
Carboximetilcelulosa	<i>Clostridium cellulolyticum</i> y <i>Geobacter sulfurreducens</i>	CCM doble cámara	0,05	53
Ácido glucurónico	Cultivo mixto de bacterias	CCM con cátodo al aire	1,18	54
Almidón	Cultivo puro de <i>Clostridium butyricum</i>	CCM doble cámara	1,3	55
Aguas residuales de cervecería	Consorcio mixto anaeróbico	CCM con cátodo al aire	0,18	56
Aguas residuales de la industria de chocolate	Lodo anaeróbico	CCM doble cámara	0,302	57
Aguas residuales domésticas	Lodo anaeróbico	CCM doble cámara	0,06	58

La característica dual de las CCM las hace atractivas para la obtención de la energía almacenada en los residuos, además se ha investigado ampliamente para desarrollar diferentes configuraciones y modificaciones para maximizar su funcionamiento. En la cámara catódica de las CCM, la cinética de reacción es lenta para el proceso de reducción de oxígeno, que produce pérdidas altas de voltaje dentro de la celda y, por lo tanto, una baja eficiencia coulombica<sup>59</sup>. La configuración con cátodo al aire mejora su desempeño al

disminuir la resistencia interna, ya que el cátodo está expuesto a la atmósfera y permite el suministro directo de oxígeno<sup>3,4</sup>. Este tipo de configuraciones ofrecen diseños más simples y de menor costo<sup>2-4</sup>. Por lo general, sólo poseen una cámara anódica sin necesidad de aireación en una cámara catódica.

En el *Cuadro V* se puede observar un listado de diferentes sistemas de configuración de CCM de una cámara. Esta configuración se investiga con el fin de obtener información con respecto al desempeño de las cámaras, en especial con modificaciones realizadas en el cátodo debido a las limitaciones de la reacción de reducción del oxígeno<sup>4</sup>.

**Cuadro V.** Desempeño de diferentes sistemas de CCM de una cámara.

Configuración	Material del cátodo	Densidad de potencia (mW/m <sup>2</sup> )	Voltaje de circuito abierto (V)	Ref.
Una cámara	Membrana intercambiadora de protones-tela de carbono	262 ± 10	0,44	60
Una cámara cúbica	Tela de carbono sin capas de difusión	400 ± 10 – 480 ± 20	0,50 – 0,60	61
Una cámara cúbica	Tela de carbono con 4 capas de difusión de PTFE	766	0,302 ± 0,04	62
Una cámara cúbica	Tela de carbono	1 060	N. A.	63
Una cámara cátodo al aire	Solución de carbono y electrodo difusivo de gas	1 030,4 ± 47,8	0,7	64
Una cámara cátodo al aire	Solución de carbono sobre fieltro de carbono	643 ± 20	N. A.	65
Una cámara cátodo al aire	Carbón negro sobre tela de carbono y PTFE como capa de difusión	1295 ± 13	N. A.	66

Dentro de los estudios descritos cabe resaltar el de Liu y Logan<sup>60</sup>, ellos diseñaron una CCM que consiste en una cámara cilíndrica con los electrodos dispuestos en cada extremo. El ánodo está compuesto de papel de carbón sin impermeabilización y el cátodo que se encuentra expuesto al aire, compuesto de fieltro de carbono con una capa de Nafion<sup>®</sup> como membrana intercambiadora de protones. En este estudio se examinó la generación de energía para esta configuración en presencia y ausencia de una membrana de intercambio de protones polimérica. Los resultados indican que remover la membrana aumenta la densidad de

potencia de la celda, sin embargo, al removerla se observa una pérdida de sustrato por oxidación aerobia debido a la difusión de oxígeno en la cámara.

En otro estudio realizado por Cheng *et al*<sup>61,62</sup> se trabajó con el mismo diseño propuesto por Liu y Logan<sup>60</sup> con algunas modificaciones en la estructura del cátodo. Ellos proponen la aplicación de capas sucesivas de politetrafluoroetileno (PTFE) como capas de difusión en el lado expuesto al aire en el cátodo. Con este diseño se observó que remover la membrana intercambiadora de protones aumenta la densidad de potencia, y las capas de difusión con PTFE disminuyen las pérdidas de agua y aumentan la eficiencia coulombica, al no evidenciarse difusión de oxígeno en la cámara anódica.

Actualmente, las aplicaciones comerciales de las CCM están limitadas debido a su bajo nivel de densidad de potencia de  $W/m^2$ , pero se está llevando a cabo una investigación intensiva para optimizar los parámetros operativos y disminuir los costos de construcción y operación de las celdas<sup>59,66,67</sup>.

Con el fin de mejorar la generación de potencia en las celdas de una cámara, se han propuesto tratamientos sencillos y de bajo costo para aumentar el área superficial en los electrodos. Varios estudios señalan que activar el cátodo mediante un tratamiento ácido de oxidación aumenta su eficiencia y generación de corriente<sup>21,23,68,69</sup>.

Varios materiales basados en carbono<sup>70-72</sup>, metales<sup>73</sup>, metal-carbono<sup>74</sup>, complejos de metal-carbono-nitrógeno<sup>75</sup> han sido estudiados como catalizadores en la cámara del cátodo. Estos materiales facilitan la conductividad eléctrica, presentan mayor área superficial, buena resistencia mecánica, durabilidad y estabilidad en ambientes ácidos y básicos<sup>25</sup>. Liu *et al*<sup>75</sup> reportaron complejos de carbono-nitrógeno con excelentes propiedades catalíticas en comparación con Pt/C al observar una transferencia de 3.86 electrones por molécula de oxígeno, lo que evidencia la vía de la reacción de reducción de oxígeno a agua.

Sin embargo, la síntesis de materiales a base de carbono, como el carbón negro, carbón activado, grafeno y los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (CNT, por sus siglas en inglés), a partir de reactivos químicos comerciales es un proceso costoso y lento<sup>25</sup>.

Por otro lado, los óxidos de tipo perovskitas son interesantes catalizadores en celdas de combustible de óxido sólido debido a su vacante en la red de aniones y excelente movilidad de oxígeno<sup>30</sup>. Se ha reportado el uso de este tipo de óxidos en diferentes tipos de celdas, como en baterías<sup>30,76</sup> electrolíticas no acuosas de  $Li-O_2$  y en CCM<sup>29,31,77,78</sup>. Se han

explorado diferentes metales en los sitios A y B de la estructura. Esta versatilidad permite evaluar el desempeño de diferentes combinaciones de elementos, lo que ha llevado a resultados alentadores.

En cuanto al ánodo, estudios como el desarrollado por Feng *et al*<sup>79</sup>, Chen *et al*<sup>80</sup> y Cheng *et al*<sup>81</sup> demuestran que tratamientos eficientes y simples como el empleo de ácido, calentamiento o una combinación de ambos, mejora la generación de energía utilizando cepillos de fibra de carbono como electrodos.

Mohamed *et al*<sup>82</sup> investiga tres estrategias diferentes para el tratamiento de la superficie del ánodo mediante el dopaje de grupos de nitrógenos en las superficies del ánodo: tratamiento con amoníaco, una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico, y urea sólida. Los resultados mostraron que la potencia y las densidades de corriente se vieron afectadas significativamente por las técnicas de modificación de la superficie. La estrategia con amoníaco alcanzó la densidad de potencia más alta y reveló un aumento en la potencia del 115 % comparado con el electrodo sin modificar.

Si bien con el estado actual del conocimiento no es posible utilizar las CCM para la generación de una cantidad importante de energía, ya que las densidades de potencia son aún bastante bajas, mediante su uso se puede recuperar parte de la energía empleada durante procesos como en el beneficiado de café. Además, permite la remoción de materia orgánica convirtiéndose en una alternativa interesante para el tratamiento de aguas residuales.

Según la literatura consultada y mencionada anteriormente, las CCM se perfilan como una posible solución a la problemática de la industria del café en Costa Rica. Dado a que las CCM son una opción novedosa, es de vital importancia continuar bajo una línea de investigación donde se busquen nuevos sustratos y aplicaciones de este tipo de dispositivos. Por lo que, desarrollar este trabajo e implementarlo al agua residual del procesamiento del café implicaría conocer más sobre esta tecnología, además de una búsqueda de una solución sostenible para este residuo en el país.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar el desempeño de una Celda de Combustible Microbiano (CCM) con cátodo al aire para el tratamiento del agua residual del procesamiento del café.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- 3.2.1. Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente el sustrato de agua residual del procesamiento del café para su uso en la Celda de Combustible Microbiano (CCM) con cátodo al aire.
- 3.2.2. Establecer las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una Celda de Combustible Microbiano (CCM) con cátodo al aire empleando lactato como sustrato control y *Shewanella oneidensis* como bacteria tipo.
- 3.2.3. Evaluar el desempeño de una Celda de Combustible Microbiano (CCM) con cátodo al aire y condiciones de trabajo adecuadas empleando agua residual del procesamiento del café como sustrato para su tratamiento.

## 4. Metodología

El desarrollo del Trabajo Final de Graduación se efectuó en las instalaciones del CELEQ y CIA de la Universidad de Costa Rica, en el marco del proyecto B8265 titulado *Celdas Microbianas Combustibles con cátodo de perovskitas aplicadas en aguas residuales de beneficio de café, Costa Rica*. Los ensayos del contenido de fibra y humedad los realizó el Laboratorio de Química y el Laboratorio de Bromatología del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA). El ensayo de la relación carbono y nitrógeno lo realizó el Laboratorio de Suelos y Foliaves del CIA.

### 4.1. Caracterización fisicoquímica del agua residual del procesamiento del café

Se empleó agua residual del procesamiento del café proporcionada por el beneficio CoopeTarrazú R.L., San Marcos de Tarrazú. El agua residual fue recolectada el día 19/02/2019, fue tamizada para eliminar partículas de gran tamaño y posteriormente se almacenó a -3 °C. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### 4.1.1. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Se siguió el método *HACH 8000*<sup>83</sup> de digestión por reactor. Se tomó una muestra de 300 mL de agua residual y se homogenizó con agitación. Se realizaron dos diluciones diferentes, en la primera se tomó una alícuota de 1 mL y se llevó a 100 mL, y en la segunda se tomaron 5 mL y se llevaron a 250 mL. En ambas diluciones se tomó una alícuota de 2 mL y se colocó en el tubo reactor de alto rango inclinándolo en un ángulo de 45 ° y se homogenizó. Se colocaron los tubos en el reactor, precalentado a 150 °C, durante 2 h. Se dejaron enfriar durante 20 min hasta 120 °C y se agitaron, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Para el blanco se tomaron 2 mL de agua destilada y se siguió el mismo procedimiento. Se utilizó ftalato ácido de potasio (KHP) como patrón (99,9 %), para esto se pesaron ( $0,4250 \pm 0,0001$ ) g del sólido desecado a 100 °C y se disolvieron en 250 mL, se realizó una dilución 18/25 y se siguió el mismo procedimiento de las muestras.

Para la medición colorimétrica del patrón, blanco y muestras se limpió el tubo y se colocó en el soporte de celda y se leyeron los resultados en mg/L.

#### 4.1.2. Contenido de sólidos

Se siguió el método *1684 de la Agencia de Protección Ambiental*<sup>84</sup> (EPA, por sus siglas en inglés). Se colocaron crisoles en una mufla a 550 °C durante 1 h, se dejaron enfriar durante 15 min y se pesaron hasta obtener masa constante.

*Sólidos totales*: se midieron con exactitud 25 g de la muestra homogenizada en los crisoles. Se evaporó a 60 °C durante 2 h y luego a 103 °C durante 24 h en estufa. Se dejaron enfriar durante 15 min y se pesaron hasta obtener masa constante.

*Sólidos fijos y volátiles*: se calcinaron los residuos de sólidos totales a 550 °C durante 2 h en mufla. Se dejaron enfriar durante 15 min y se pesaron hasta obtener masa constante.

#### 4.1.3. Porcentaje de humedad

Se siguió el método *J. Anim. Sci. 81:3255-3266*<sup>85</sup> de humedad por liofilización. Se secó la muestra en un horno de vacío a 20 mmHg y 70 °C.

#### 4.1.4. Contenido de fibra

*Fibra detergente neutro*: se siguió el método *AOAC 2002.04*<sup>86</sup>. Para la preparación de la disolución de detergente neutro (ND) se midieron 990 mL de agua, la mitad se agregó a un Erlenmeyer y se agregó 4,0 g de hidróxido de sodio (NaOH), 1,46 g de ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), 4,56 g de hidrógeno fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 6,81 g de borato de sodio decahidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>\*10H<sub>2</sub>O), y se mezcló hasta disolver. A esta disolución, se le añadieron 30 g de lauril sulfato de sodio y el remanente de agua, se mezcló hasta disolver el detergente y se agregaron 10 mL de trietilenglicol para suprimir la espuma.

Para la determinación de fibra se secaron los crisoles a 105 °C durante 4 h y se pesaron hasta obtener masa constante. Se homogenizó la muestra y se pesó 0,50 g de agua residual en base seca, y se agregó al crisol para reflujo. Se obtuvo la masa de la muestra en el crisol. Se precalentó la unidad y se agregó 0,5 g de sulfito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) y 50 mL de ND a cada muestra. Se calentó hasta observar ebullición durante 4-5 min. se añadió 2 mL de una disolución de amilasa (estandarizada para consumir 0,5 g de harina de maíz en dos adiciones de 2 mL) y se dejó el sistema en reflujo durante 60 min de forma vigorosa.

Al finalizar el reflujo, se removió la mezcla del calor y se dejó reposar durante 1 min. Se verificó que la muestra no se observara lechosa y se eliminó el exceso de líquido con filtración al vacío. Se llenó el crisol hasta la mitad con agua caliente y se agregó 2 mL de la disolución de amilasa, se reposó durante 1 min y seguidamente se filtró en frío para remover

fácilmente los remanentes de agua con amilasa, se repitió hasta obtener una disolución traslúcida.

Se agregaron 50 mL de acetona, se agitó y se dejó en reposo durante 3-5 min, se repitió la extracción de la fibra y se secó al vacío hasta sequedad.

Se colocaron los crisoles en una estufa a 105 °C durante 8 h y se pesó. Se calcinó la muestra en una mufla a 500 °C durante 5 h hasta eliminar el carbón residual. Se temperaron los crisoles en una estufa a 105 °C durante 1 h. Se dejaron enfriar y se pesaron hasta obtener masa constante.

*Fibra detergente ácido:* se siguió el método AOAC 973.18<sup>87</sup>. Para la preparación de la disolución de detergente ácido se agregaron 20 g de bromuro de cetil trimetilamonio (grado técnico) a 1 L de una disolución de ácido sulfúrico (1,000 ± 0,005) N.

Para la determinación de fibra por detergente ácido se secó la muestra en estufa a 55 °C hasta obtener un 85 % de humedad y se pasó la muestra por un tamiz de 1 mm.

Se colocaron crisoles con vidrio fritado en una estufa a 100 °C durante al menos 8 h hasta obtener masa constante. Se pesó con exactitud 0,9 g de muestra y se colocó en un beaker Berzelius. Se añadió 100 mL de la disolución de detergente ácido y se reflujo la mezcla durante 60 min, con un previo hervor durante 10 min; al finalizar la hora de reflujo se removió el beaker de la plantilla, se agitó y se filtró a un crisol previamente preparado. Se trasvasó con enjuagues de agua caliente.

Se remojó el residuo con agua hirviendo dos veces durante 30 s y se filtró al vacío. Seguidamente, se enjuagó dos veces el residuo con 40 mL de acetona con un tiempo de remoción de 30 s en cada uno. Se secó el residuo al vacío y se colocó en una estufa durante la noche a 100 °C. Se dejaron enfriar y se pesaron hasta obtener masa constante.

*Lignina detergente ácido:* se siguió el método AOAC 973.18<sup>87</sup>. Se colocó el crisol que contiene la fibra detergente ácido en un beaker de 50 mL y se cubrió el contenido del crisol con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 72 % hasta la mitad y a una temperatura de 15 °C, y se agitó en intervalos de 1 h hasta drenar los ácidos durante 3 h. Se mantuvo la temperatura del crisol entre 20 °C – 23 °C. Se filtró y se lavó con agua caliente hasta pH neutro. Se secó a 100 °C, se dejó enfriar y se pesaron hasta obtener masa constante. Se calcinó en mufla a 500 °C durante 2 h, se enfrió a 100 °C durante 1 h, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó hasta obtener masa constante.

#### 4.1.5. Relación carbono y nitrógeno (C:N)

Se siguió el método del *Handbook of reference methods for plant analysis*<sup>88</sup> de nitrógeno por digestión seca, método de Dumas. Se pesaron con exactitud 0,12 g de muestra y se determinó el % C total y % N total con un autoanalizador C:N por combustión seca. El % C total se correlaciona muy bien con el % de materia orgánica, con un factor de 1,43.

### **4.2. Caracterización microbiológica de las bacterias previamente aisladas del agua residual del procesamiento del café**

Se realizó un estudio preliminar de la ruta respiratoria de transferencia extracelular directa de los electrones por medio de la reducción de especies químicas para identificar bacterias electrogénicas. Se emplearon las bacterias *Enterobacter asburiae* y *Lactobacillus harbinensis* previamente aisladas y secuenciadas del agua residual de procesamiento del café<sup>89</sup>. El control se realizó con *Shewanella oneidensis*, bacteria tipo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### 4.2.1. Preparación del medio de cultivo

Se siguió la metodología descrita por Coursolle *et al*<sup>37,38</sup>. Las bacterias se cultivaron durante 1 día en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB). Posteriormente se inocularon en un medio mínimo anaerobio descrito por Baron *et al*<sup>36</sup>. Se preparó una disolución *stock* que contiene (por litro) 0,46 g de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), 0,12 g de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,22 g de sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 34 g de hidrógeno fosfato de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y 42 g de dihidrógeno fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Después de autoclavar la disolución *stock*, se agregaron 5 mL de una mezcla de minerales y 5 mL de una mezcla de vitaminas, filtradas por 0,2  $\mu\text{m}$ . La mezcla de minerales contiene (por litro) 1,5 g de ácido nitrilotriacético, 0,11 g de cloruro de manganeso(II) tetrahidratado ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 0,17 g de cloruro de cobalto(II) hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 0,13 g de cloruro de zinc(II) ( $\text{ZnCl}_2$ ), 0,036 g de sulfato de cobre(II) pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 0,0055 g de alumbre de potasio ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 0,0054 g de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 0,13 g de cloruro de níquel(II) ( $\text{NiCl}_2$ ) y 0,022 g de tungstato de sodio dihidratado ( $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). La mezcla de vitaminas contiene (por litro) 0,021 g de hidrocloreuro de piridoxina (vitamina B6), 0,012 g de hidrocloreuro de tiamina, 0,0054 g de ácido nicotínico, 0,0001 g de cianocobalamina (vitamina B12) y 0,011 g de ácido *p*-aminobenzoico.

#### 4.2.2. Estudio preliminar de la ruta respiratoria de transferencia extracelular directa de electrones

Cada una de las bacterias se inoculó con 1 mL de la bacteria cultivada en caldo LB, un tubo de ensayo que contenía 10 mL de disolución *stock* con mezcla de minerales y vitaminas, 4 mL de fuente de carbono y 5 mL de disolución aceptora terminal de electrones. El medio anaerobio se obtuvo añadiendo una capa de 2 mL de aceite mineral al tubo de ensayo. El ensayo tuvo una duración de 7 días bajo condiciones de 30 °C y 200 rpm, y se realizó por triplicado.

Se empleó una disolución de lactato de sodio, acetato de sodio y glucosa en una concentración de 0,25 mol/L cada una, como fuente de carbono para *Shewanella oneidensis*, *Enterobacter asburiae* y *Lactobacillus harbinensis*, respectivamente.

Se empleó una disolución de cloruro de hierro(III) ( $\text{FeCl}_3$ ) y citrato de hierro(III) ( $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$ ) en una concentración de  $(0,020 \pm 0,004)$  mol/L y  $(0,020 \pm 0,003)$  mol/L, respectivamente, como aceptor terminal de electrones. Por otro lado, se empleó  $(0,00800 \pm 0,00001)$  g óxido de hierro(III) ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) como sólido aceptor de electrones. En este caso se inoculó 1 mL de bacteria cultivada en caldo LB a un tubo de ensayo que contenía 15 mL de disolución *stock* con mezcla de minerales y vitaminas, y 4 mL de fuente de carbono.

Para el control de medio se agregaron 11 mL de disolución *stock* con mezcla de minerales y vitaminas, 4 mL de fuente de carbono y 5 mL disolución aceptora de electrones. Para el control de medio sólido, se agregaron 16 mL disolución *stock* con mezcla de minerales y vitaminas, y 4 mL de fuente de carbono. Los controles se incubaron bajo condiciones de anaerobiosis, 30 °C y 200 rpm durante 7 días.

#### 4.2.3. Cuantificación de $\text{Fe}^{2+}$

Previo a la cuantificación de  $\text{Fe}^{2+}$ , se realizó un rayado en un plato de medio sólido para confirmar el crecimiento en cultivo puro de la bacteria en el medio mínimo, agar nutritivo (AN) para *Shewanella oneidensis* y *Enterobacter asburiae*, y MRS para *Lactobacillus harbinensis*. Por otro lado, se determinó la densidad óptica (O.D.) espectrofotométricamente a una longitud de onda de 600 nm.

Se realizó un control espectrofotométrico para el estudio del aumento de la concentración de la especie reducida. Para esto se centrifugaron las muestras para evitar la interferencia por el crecimiento de la bacteria en el medio. La generación de color se realizó

directamente en la celda, se agregaron exactamente 1,600 mL de muestra, 0,500 mL de 1,10-fenantrolina y 0,400 mL de disolución amortiguadora (HOAc/OAc, pH = 4). La medición se realizó utilizando un espectrofotómetro ThermoScientific™ Genesys™ 10S UV-Vis, en una longitud de onda de 510 nm y la concentración se interpoló de una curva de calibración de (0,100 – 1,500) mg/L Fe(II), a partir de una disolución patrón de concentración (100 ± 1) mg/L de Fe(II).

Se descartó alguna interferencia por la disolución aceptora terminal de electrones obteniendo el espectro de absorción de dos disoluciones de cloruro de hierro(III) y citrato de hierro(III) en una concentración de 4,5 mg/L. Ambas disoluciones contenían 5 mL de 1,10-fenantrolina y 4 mL de disolución amortiguadora, a una de las disoluciones se le agregó 4 mL de cloruro de hidroxilamina y se dejó reposar. Se corrió el espectro de absorción en un rango de longitud de onda de (350 – 850) nm y se obtuvo la longitud de onda máxima.

### **4.3. Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire**

Se realizó un estudio individual de la cámara catódica y anódica de la CCM para establecer las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una configuración de celda con cátodo al aire. Se emplearon celdas de vidrio Pyrex® de volumen aproximado de 125 mL. Se utilizó como ánodo un electrodo de cepillo de fibras de carbono y como cátodo electrodos de tela de carbono, fieltro de carbono y electrodo comercial catalizado con MnO<sub>2</sub> (ver *Cuadro VI* para su descripción). Se empleó como membrana intercambiadora de protones una lámina de Nafion® activada con ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 10%.

#### **4.3.1. Estudio del cátodo**

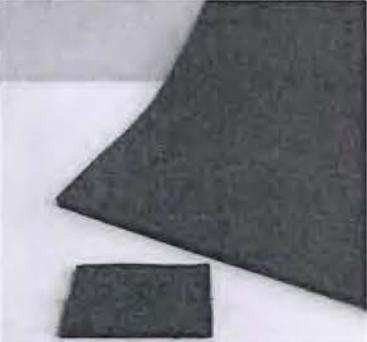
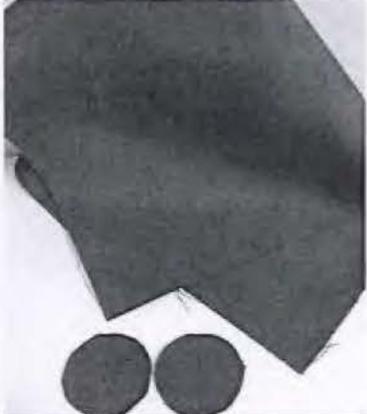
Se ensambló una Celda de Combustible Electroquímica (CCE) con doble cámara y posteriormente una CCE con cátodo al aire para evaluar el correcto funcionamiento de la cámara catódica, específicamente el electrodo de tela de carbono. el flujo electrónico desde el ánodo hasta el cátodo, y el suministro y consumo de oxígeno en la cámara catódica.

Se empleó en la cámara anódica una disolución de sulfato de hierro(II) heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O) en una concentración de 0,1 mol/L, y en la cámara catódica una disolución de bromo líquido (Br<sub>2</sub>) y una disolución de ácido clorhídrico (HCl), ambas en una concentración de 0,1 mol/L.

Primero se ensambló la CCE con doble cámara con la disolución de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en la cámara anódica y la disolución de  $\text{Br}_2$  en la cámara catódica. Posteriormente, se ensambló la CCE con doble cámara con la disolución de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en la cámara anódica y la disolución de  $\text{HCl}$  en la cámara catódica con un suministro directo y constante de aire con motor de aireación como fuente de oxígeno ( $\text{O}_2$ ). En ambos casos se utilizó un electrodo de tela de carbono como ánodo y cátodo. Por último, se ensambló una CCE con cátodo al aire con la disolución de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en la cámara anódica, se utilizó como cátodo el electrodo de tela de carbono y el electrodo comercial catalizado con  $\text{MnO}_2$  como electrodo control. Se registraron datos de voltaje hasta que la celda alcanzara el equilibrio

En todos los casos se agregó nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ) a la cámara anódica durante 10 min para establecer un medio anaerobio. Se registraron los datos de voltaje a través de una resistencia de  $50 \Omega$  mediante un multímetro de precisión Fluke® 289 y se graficaron para obtener el voltaje máximo. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado.

**Cuadro VI.** Descripción de los electrodos empleados como ánodo y cátodo para establecer las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una CCM con cátodo al aire.

Electrodo	Principales características	Imagen
<i>Cepillo de carbono</i>	Fibras de carbono con área superficial alta y estructura abierta que evita bioincrustación	
<i>Filtro de carbono</i>	94 % porosidad < 0,15 $\Omega\text{cm}^2$ resistividad eléctrica Activado térmicamente	
<i>Tela de carbono</i>	30 % impermeable < 6 s permeable al aire < 5 $\text{m}\Omega\text{cm}^2$ resistividad eléctrica	
<i>Electrodo comercial</i>	Carbón catalizado con manganeso y laminado con una película de Teflón® porosa	

#### 4.3.2. Modificación del cátodo

Se emplearon catalizadores tipo perovskita de doble capa  $\text{Cs}_4\text{CuBi}_2\text{Cl}_{12}$  y  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  sintetizados en el Laboratorio de Materiales (NanoFEM) del CELEQ y con la colaboración de Marisol Ledezma-Gairaud, Ph.D. Se realizó un estudio para recubrir efectivamente los electrodos de tela de carbono y fieltro de carbono, y así estudiar su actividad catalítica y comprobar su funcionamiento en una CCE con cátodo al aire.

Se evaluó la utilización de hexano, acetona, acetonitrilo y DMSO para disolver los catalizadores y recubrir los electrodos a partir de una disolución del catalizador y Nafion<sup>®</sup>. Se pesaron 60 mg de ambas perovskitas y se les realizó una prueba de solubilidad en un volumen de 1 mL en los diferentes disolventes.

Para el estudio de la actividad catalítica se realizó una voltametría cíclica a ambos electrodos recubiertos con catalizadores en medio aerobio y anaerobio. El recubrimiento catalítico se realizó con una disolución de 30 mg de cada perovskita en 1,500 mL de DMSO, los electrodos de 1 cm<sup>2</sup> se sumergieron y se dejaron 48 h secando al aire. Se empleó un electrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol/L) como electrodo de referencia, electrodo de carbón vítreo como electrodo auxiliar y el electrodo de tela de carbono o fieltro de carbono modificado como electrodo de trabajo. Se empleó la disolución amortiguadora PBS (0,1/1,5 mol/L y pH = 6,67) como electrolito soporte y una velocidad de barrido de 25 mV/s. Las disoluciones se burbujearon durante 20 min con aire como fuente de oxígeno (O<sub>2</sub>) y nitrógeno (N<sub>2</sub>), para obtener el medio aerobio y anaerobio, respectivamente. Se utilizó tela de carbono y fieltro de carbono sin modificar como control. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se empleó un Potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT128N.

Se ensambló una CCE con cátodo al aire para evaluar el desempeño del catalizador tipo perovskita. Se utilizó un electrodo de tela de carbono modificado con  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$ , el recubrimiento catalítico se realizó con una disolución del catalizador con Nafion<sup>®</sup> según el procedimiento descrito por Suntivich *et al*<sup>90</sup> de inmovilización por la técnica *drop casting*. Se midió exactamente ( $0,01068 \pm 0,00001$ ) g de catalizador y se disolvió en 1,000 mL de DMSO (ACS  $\geq 99,9$  %) empleando un baño ultrasónico a temperatura ambiente durante 1 h. Se le agregó 40,0  $\mu\text{L}$  de una disolución de Nafion<sup>®</sup> (5 % en masa) y se agitó. Se pesaron los electrodos de tela de carbono antes de la modificación y se delimitó un área de 4,5 cm<sup>2</sup> en el electrodo con Teflón<sup>®</sup>. Se les agregó 0,2250 mL de la disolución de catalizador con Nafion<sup>®</sup>.

sobre el electrodo y se secó el disolvente en estufa a 50 °C durante 4 h y luego a temperatura ambiente durante 48 h.

En la cámara anódica se empleó una disolución de sulfato de hierro(II) heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en una concentración de 0,1 mol/L y se agregó nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ) durante 10 min para establecer un medio anaerobio. Se registraron los datos de voltaje a través de una resistencia de 50  $\Omega$  mediante un multímetro de precisión Fluke® 289 hasta que la celda alcanzara el equilibrio y se graficaron para obtener el voltaje máximo. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado.

#### 4.3.3. Estudio del ánodo

Se ensambló una CCM con doble cámara para evaluar la correcta generación de biopelícula en el electrodo de fibra de carbono por medio de la generación de corriente. Se inocularon 5 mL de la bacteria previamente cultivada en el caldo LB, en la cámara anódica. Se empleó la disolución *stock* con mezcla de minerales y vitaminas preparada en 4.2.1, y disolución de acetato de sodio y lactato de sodio en una concentración final de 0,05 mol/L cada una, como fuente de carbono para *Enterobacter asburiae* y *Shewanella oneidensis*, respectivamente. En la cámara catódica se utilizó tela de carbono sin modificar como cátodo y se empleó la disolución amortiguadora PBS y se suministró de manera continua aire con motor de aireación como fuente oxígeno ( $\text{O}_2$ ).

Se agregó nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ) a la cámara anódica durante 10 min para establecer un medio anaerobio. Se registraron los datos de voltaje a través de una resistencia de 50  $\Omega$  mediante un multímetro de precisión Fluke® 289 y se graficaron para obtener el voltaje máximo. Concluidos los ensayos se realizó un rayado en un plato de medio sólido para confirmar que en la biopelícula formada en el electrodo se encontrara únicamente la bacteria inoculada. Para el control se empleó la disolución *stock* con mezcla de minerales y vitaminas preparada en 4.2.1, con las respectivas fuentes de carbono sin el inóculo. Todos los ensayos se realizaron con una duración de 7 días, a 30 °C y por duplicado.

#### 4.3.4. Tratamiento del ánodo

Se siguió el procedimiento descrito por Mohamed *et al*<sup>82</sup> para la activación del ánodo con amoníaco ( $\text{NH}_3$ ). Se lavaron los electrodos de cepillo de fibra de carbono con acetona y se dejaron en reposo 24 h. Se sumergieron los electrodos en 100 mL de amoníaco al 30 %, se dejaron en ebullición a 180 °C durante 3 h y se lavaron con agua destilada.

Se ensambló una CCM con doble cámara para evaluar el desempeño del tratamiento de activación por medio de la generación de corriente. Se inocularon 5 mL de la bacteria, previamente cultivada en caldo LB, en la cámara anódica. Se empleó la disolución *stock* con mezcla de minerales y vitaminas preparada en 4.2.1, y disolución de acetato de sodio y lactato de sodio en una concentración final de 0,05 mol/L cada una, como fuente de carbono para *Enterobacter asburiae* y *Shewanella oneidensis*, respectivamente. En la cámara catódica se utilizó tela de carbono sin modificar como cátodo y se empleó la disolución amortiguadora PBS y se suministró de manera continua aire con motor de aireación como fuente oxígeno (O<sub>2</sub>).

Se agregó nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) a la cámara anódica durante 10 min para establecer un medio anaerobio. Se registraron los datos de voltaje a través de una resistencia de 50 Ω mediante un multímetro de precisión Fluke® 289 y se graficaron para obtener el voltaje máximo. Concluidos los ensayos se realizó un rayado en un plato de medio sólido para confirmar el crecimiento único de la bacteria en el electrodo. Para el control se empleó la disolución *stock* con mezcla de minerales y vitaminas preparada 4.2.1, con las respectivas fuentes de carbono sin inóculo. Todos los ensayos se realizaron con una duración de 7 días, a 30 °C y por duplicado.

#### **4.4. Tratamiento del agua residual del procesamiento del café mediante el uso de CCM con cátodo al aire**

Se ensambló una CCM con cátodo al aire para evaluar el desempeño de la celda cuando se utiliza agua residual del procesamiento del café como sustrato. Se empleó agua residual diluida al 50 % con la disolución amortiguadora PBS. Se utilizó el electrodo comercial catalizado con MnO<sub>2</sub> como cátodo y electrodo de cepillo de fibras de carbono con tratamiento de NH<sub>3</sub> como ánodo. Se agregó nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) a la cámara anódica durante 10 min para establecer un medio anaerobio.

Se registraron los datos de voltaje a través de una resistencia de 50 Ω mediante un multímetro de precisión Fluke® 289 y se graficaron para obtener el voltaje máximo. Se determinó el DQO antes y después del ensayo para calcular el % de remoción de DQO y la eficiencia coulombica con ayuda del software MATLAB®. Todos los ensayos se realizaron con una duración de 5 días, a temperatura ambiente y por duplicado.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Caracterización fisicoquímica del agua residual del procesamiento del café

La limitación en la generación de corriente en una CCM está directamente relacionada con la comunidad microbiana que se establece en ánodo, y su eficiencia para degradar la materia orgánica empleada como sustrato para la transferencia extracelular de los electrones al electrodo<sup>91</sup>. La caracterización fisicoquímica del agua residual permite cuantificar la facilidad con que este sustrato puede ser oxidado por los microorganismos presentes en la cámara anódica de una CCM.

En este caso, el agua residual proviene directamente de un proceso de beneficiado de café bajo la vía húmeda con remoción mecánica de mucílago, por lo que está compuesto de agua de despulpado, restos de pulpa y mucílago<sup>10,11,16</sup>. Estos componentes corresponden a azúcares sencillos como fructuosa y glucosa de la pulpa, así como carbohidratos complejos como las pectinas y material lignocelulósico que forma parte del mucílago y restos de pulpa<sup>13</sup>.

**Cuadro VII.** Resultados de los diferentes parámetros de la caracterización del agua residual del procesamiento del café.

Parámetro	Resultado
pH	(4,1 ± 0,1)
DQO	(74 200 ± 100) mg/L
Sólidos suspendidos totales, base fresca	(5,08 ± 0,03) %
Sólidos fijos, base seca	(6,8 ± 0,3) %
Sólidos volátiles, base seca	(93,2 ± 0,3) %
Fibra detergente ácido, base seca	(37 ± 1) g/100 g
Fibra detergente neutro, base seca	(54 ± 1) g/100 g
Lignina detergente ácido, base seca	(9 ± 1) g/100 g
Carbono total	(41,54 ± 0,01) % en masa
Nitrógeno total	(1,43 ± 0,01) % en masa
Relación C:N	29,0

Incertidumbre según método EURACHEM. k = 2

Como se muestra en el *Cuadro VII*, el sustrato presenta un pH ácido. La mayoría de los carbohidratos que componen el agua residual presentan procesos de oxidación que generan varios tipos de ácidos orgánicos volátiles como el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, responsables del pH bajo<sup>92</sup>. El pH es un parámetro importante que delimita el tipo de microorganismo que se puede establecer en el sustrato, así como los cambios en el metabolismo si las condiciones ambientales se alteran<sup>93</sup>. Miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Acetobacter* son capaces de sobrevivir a pH bajos<sup>94</sup>.

Por otro lado, la reacción neta en la cámara anódica produce protones que se consumen en la cámara catódica durante la reducción del oxígeno. Una operación continua de la celda resulta en una acumulación de los protones en la cámara anódica debido a la difusión y migración incompleta a través de la membrana. A su vez, se observa la alcalinización de la cámara catódica debido a la falta de reemplazo de protones. Estos fenómenos conducen a un gradiente de concentración de pH en la membrana que pone una limitación electroquímica y termodinámica en el rendimiento de CCM<sup>22,95</sup>. En ese sentido, disminuir el pH operativo puede beneficiar a la reacción de reducción de oxígeno y, en consecuencia, la generación de corriente en la celda.

Con respecto al contenido de sólidos, se puede observar que el contenido total en la muestra de agua residual del procesamiento del café es bastante bajo y de esos sólidos totales la mayor parte corresponden a sólidos volátiles. Se espera que el agua residual contenga pocos sólidos debido a que la mayoría de la pulpa es removida y los restos de mucílago representa un porcentaje bajo de la masa del total del grano que es procesado, al presentar un contenido menor al 15 % se considera un digestor líquido<sup>96</sup>.

Contenidos bajos de sólidos totales son desfavorables en digestores anaerobios ya que la generación de metano requiere una gran cantidad de biomasa para poder llevar a cabo la reacción<sup>97</sup>. Este factor no es limitante para las CCM, ya que el producto de la oxidación en la cámara anódica no es metano sino dióxido de carbono, generado a partir de los ácidos orgánicos producidos por la degradación microbiana<sup>98</sup>.

El análisis de fibra mediante detergente ácido y detergente neutro permite diferenciar el tipo de polímero que lo conforma. De esta manera se determinó que 17,5 g/100 g corresponde a hemicelulosa, 28 g/100 g a celulosa y 8,6 g/100 g a lignina y cutina, esto demuestra que el sustrato es rico en celulosa y sus derivados. El contenido de biomasa

lignocelulósica dificulta la degradación anaerobia microbiana, ya que esta presenta abundante celulosa, hemicelulosa y ligninas, que los microorganismos electrógenos no pueden utilizar directamente y que primero deben convertir en monosacáridos u otros compuestos de bajo peso molecular<sup>22</sup>. Por lo tanto, se necesita un proceso de hidrólisis y fermentación de biomasa lignocelulósica antes de ser empleados para la generación de electricidad.

Sin embargo, los procesos de fermentación e hidrolizado durante el procesamiento del café bajo la vía húmeda permiten la generación de azúcares, que actúan como la fuente primaria de energía para los microorganismos. En la tesis titulada *Evaluación de la generación eléctrica de una Celda de Combustible Microbiana con electrodo de grafito modificado para el tratamiento de agua miel de café*<sup>99</sup> se determinó el contenido de azúcares en el agua residual del procesamiento del café del beneficio CoopeTarrazú R.L., ( $1,45 \pm 0,02$ ) g/100 mL de glucosa y ( $1,44 \pm 0,02$ ) g/100 mL de fructosa. Estos azúcares pueden ser totalmente degradados al final de cada ciclo de operación de la CCM<sup>98</sup>.

La relación C:N del sustrato se encuentra en el rango de condiciones ideales para el desarrollo de microorganismos que son fundamentales para la degradación de la materia orgánica. Para sustratos biodegradables, la relación C:N óptima está en el rango de 25 a 35<sup>92</sup>, sin embargo, para los materiales que son resistentes a la degradación microbiana, esta relación puede llegar a valor tan altos como 40. De hecho, una relación C:N excesivamente alta provoca un aumento en la formación de ácido que inhibe la producción de metano y ocasiona que el proceso de descomposición sea más lento. Esto influye directamente sobre el rendimiento de digestores anaerobios<sup>92,97</sup>, pero no sobre las CCM.

Actualmente algunos beneficios de café disponen el agua residual sobre pasto “estrella”. sin embargo, el estudio fisicoquímico demuestra que este residuo posee bajo valor nutricional, además de bajo pH, para suelos ya que relaciones C:N muy bajas hacen que se pierda N por falta de estructuras de carbono que permiten retener el N. Se reportan pérdidas de nitrógeno por volatilización en el caso de relaciones C:N de 18 – 30, comparadas con una relación de 52 – 110 para sustratos con alto material lignocelulósico<sup>94</sup>. De esta manera se puede aprovechar este residuo al degradarse en un sistema electroquímico y así no perjudicar los suelos en los que se aplican.

La sumatoria de todos estos componentes oxidables en el agua residual resulta en una alta demanda química de oxígeno, que engloba la principal problemática del residuo. De acuerdo con el límite máximo permisible de vertido de aguas residuales del beneficiado de café en cuerpos receptores, establecidos en el Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales<sup>18</sup>, es necesario disminuir el DQO del sustrato hasta 1 400 mg/L, por lo que su valor debe disminuir hasta 50 veces. Esta es una de las principales características por las cuales las CCM se han convertido en una tecnología atractiva, ya que se puede tratar el agua residual al bajar su carga orgánica y producir electricidad simultáneamente.

## **5.2. Caracterización microbiológica de las bacterias previamente aisladas del agua residual del procesamiento del café**

Por medio de un aislamiento e identificación de bacterias presentes en el ánodo de las CCM empleando como sustrato agua residual del procesamiento del café del beneficio CoopeTarrazú R.L., en la tesis titulada *Búsqueda de bacterias electrogénicas en Celdas de Combustible Microbiano a partir de miel de café*<sup>89</sup> se encontró una dominancia del género *Lactobacillus* (*L. harbinensis*, *L. casei sub casei*, *L. paracasei sub tolerans* y *L. paracasei sub paracasei*) además de una bacteria perteneciente al género *Enterobacter* (*E. asburiae*) y de levaduras del género *Pichia* y *Saccharomyces*.

En dicho trabajo se analizaron los parámetros de corriente máxima, densidad de corriente máxima, porcentaje de remoción de carga orgánica y eficiencia coulombica de la CCM al comparar el valor generado por un electrodo control y un electrodo inoculado con *Enterobacter asburiae* y *Lactobacillus harbinensis*, y se demostró que la inoculación de las diferentes bacterias no generó una diferencia significativa en los parámetros estudiados. Por lo tanto, no se logró comprobar el efecto del inóculo en el rendimiento de la CCM.

En un esfuerzo por abordar con mayor profundidad este tema, se propuso realizar un estudio preliminar de la ruta respiratoria de transferencia extracelular directa de los electrones de las bacterias empleadas como inóculo de estas CCM, y evidenciar la capacidad de reducir especies químicas en un medio anaerobio como indicio de ser bacterias electrogénicas.

La principal característica de una bacteria electrogénica es su capacidad de liberar los electrones extracelularmente como parte de su metabolismo en medio anaerobio. Con el propósito de identificar este tipo de microorganismos, se propuso emplear especies de hierro

en estado de oxidación +3 solubles e insolubles en agua como aceptores terminales de electrones.

Se empleó  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$  ambos solubles en agua, y el  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  insoluble<sup>100</sup> debido a que la respiración de estas especies sugiere que los microorganismos presentan un mecanismo para transferir electrones desde el espacio citoplasmático a aceptores de electrones que no pueden cruzar la membrana externa. Si se compara la especiación en medio acuoso de estos compuestos, en ambos casos se dificultaría el cruce de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  a través de la membrana externa de la bacteria. El cloruro de hierro(III) forma una esfera de hidratación del agua alrededor del hierro y los iones cloruro<sup>101</sup>. Mientras que el citrato de hierro(III) forma complejos y especies multinucleares, en particular complejos trinucleares<sup>102</sup>.

En el *Cuadro VIII* se observan los valores de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  reducido por las diferentes bacterias en medio anaerobio, así como la densidad óptica (O.D.) para confirmar el crecimiento de los microorganismos en los diferentes medios de cultivo.

**Cuadro VIII.** Densidad óptica (O.D.) y concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  reducido por las diferentes bacterias en los medios de cultivo anaerobios con disolución aceptora de electrones de especies  $\text{Fe}^{3+}$ .

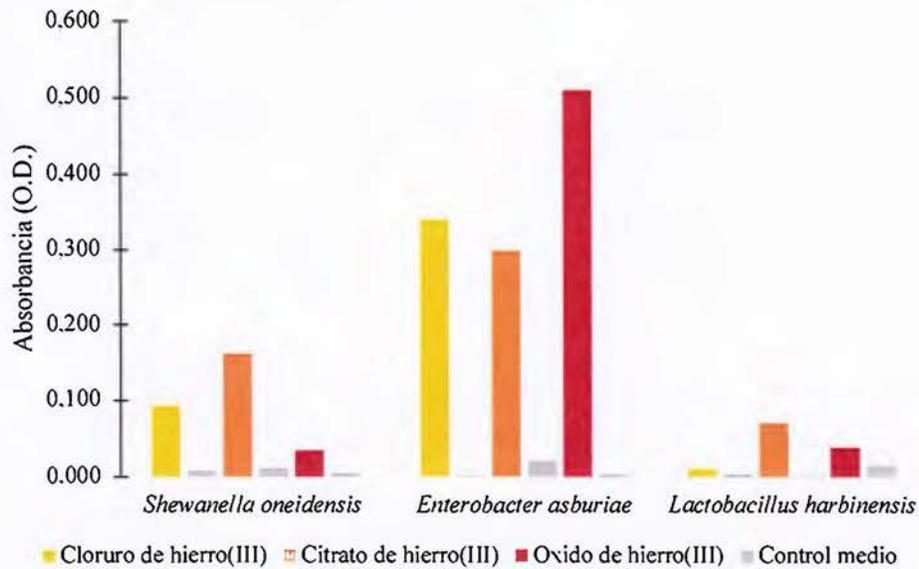
Aceptor de electrones	<i>Shewanella oneidensis</i>		<i>Enterobacter asburiae</i>		<i>Lactobacillus harbinensis</i>	
	O.D.	$\text{Fe}^{2+}$ (mg/L)	O.D.	$\text{Fe}^{2+}$ (mg/L)	O.D.	$\text{Fe}^{2+}$ (mg/L)
$\text{FeCl}_3$	0,092 (0,03)	0,982 (0,6)	0,340 (0,2)	0,765 (0,4)	0,010 (0)	0,085 (0,05)
Control	0,008	0,063	0,001	0,078	0,003	0,086
$\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$	0,161 (0,02)	18,934 (5)	0,298 (0,09)	0,373 (0,04)	0,070 (0,09)	0,475 (0,4)
Control	0,011	0,123	0,032	0,033	0,001	0,318
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	0,034 (0,01)	0,366 (0,04)	0,509 (0,02)	0,501 (0,1)	0,038 (0,03)	0,391 (0,5)
Control	0,004	0,000	0,003	0,000	0,014	0,513

\*Valores de desviación estándar entre paréntesis ().

Se trabajó con *S. oneidensis*, bacteria tipo, para controlar y optimizar las condiciones del ensayo. En los tres medios de cultivo se observó un crecimiento adecuado, así como su

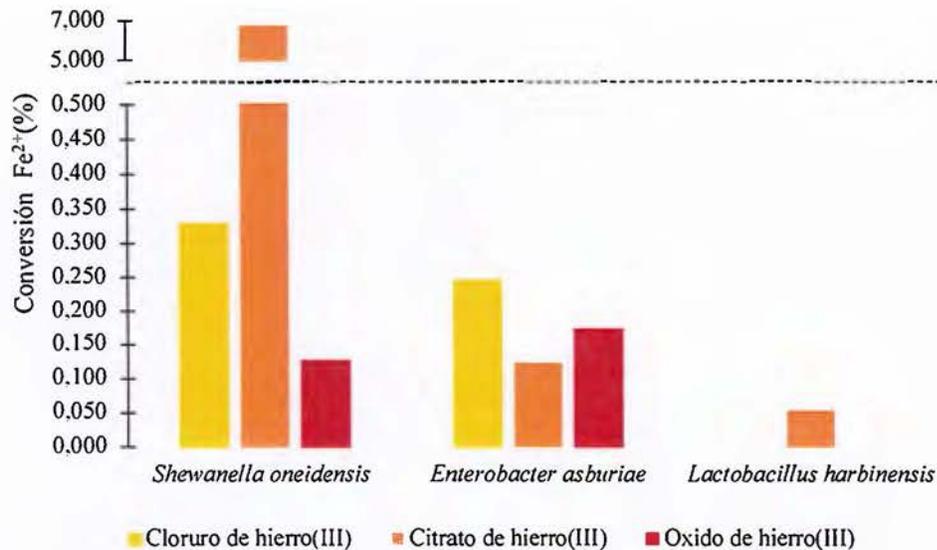
capacidad de reducir una cantidad importante de hierro, tanto en disolución como en la especie química insoluble.

Si se compara el crecimiento de *S. oneidensis* con el de *E. asburiae* y *L. harbinensis* se puede observar (Figura 8) como *E. asburiae* tuvo el mejor rendimiento y *L. harbinensis* tuvo el menor rendimiento. Sin embargo, ese crecimiento no es un factor limitante para la reducción de las especies químicas. Esto se evidencia en el medio de cultivo con óxido de hierro(III) donde *S. oneidensis* logra reducir esta especie mientras de *L. harbinensis* no fue capaz, a pesar de presentar una O.D. similar.



**Figura 8.** Promedio de la densidad óptica (O.D.) de las diferentes bacterias en los medios de cultivo anaerobios con disolución aceptora de electrones con especies  $Fe^{3+}$ .

En la Figura 9 se puede observar que al igual que *S. oneidensis*, *E. asburiae* logra reducir con éxito las 3 especies de hierro. Inclusive en el medio con  $Fe_2O_3$  se observa que *E. asburiae* logró reducir en una mayor proporción esta especie en comparación a la bacteria tipo.



**Figura 9.** Porcentaje de conversión  $Fe^{2+}$  reducido por las diferentes bacterias en los medio de cultivo anaerobios con disolución receptora de electrones con especies químicas  $Fe^{3+}$ .

Por otro lado, para *L. harbinensis* en ninguno de los medios se logra cuantificar de manera adecuada hierro(II), el control de medio descarta que lo que se logra detectar es producto del microorganismo. Se corroboró la presencia de la bacteria mediante rayado en un plato MRS.

De esta manera *L. harbinensis* no evidencia una respiración extracelular de las especies de hierro en medio anaerobio. Mientras que para *E. asburiae* los resultados sugieren que en medio anaerobio su metabolismo presenta alguna ruta extracelular de transporte electrónico. Esta característica es importante para la transferencia directa de electrones desde el microorganismo al electrodo de una CCM. Por otro lado, este hallazgo le da un valor agregado al agua residual del procesamiento de café<sup>22,103</sup>.

### 5.3. Condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire

La cámara catódica y anódica, así como los electrodos que se utilizan en estas juegan un rol importante en el rendimiento de las CCM. Con la necesidad de establecer las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una CCM con cátodo al aire, para su posterior implementación al tratamiento del agua residual del procesamiento

del café; se realizaron diferentes ensayos para la selección del electrodo en la cámara catódica, evaluar el desempeño del cátodo modificado con catalizador tipo perovskita y, por último, evaluar el efecto de un tratamiento de  $\text{NH}_3$  en el ánodo en la generación de corriente.

### 5.3.1. Electrodos

La generación de corriente en un CCM depende de la tasa de degradación del sustrato, la resistencia del circuito, las condiciones externas de operación y el rendimiento de los electrodos<sup>2,19</sup>. Los diferentes materiales de los electrodos varían en sus propiedades físicas y químicas; por ejemplo, área superficial, conductividad eléctrica y estabilidad química<sup>104</sup>. Y esas propiedades a su vez varían en su impacto sobre la generación de la biopelícula, la transferencia de electrones y la velocidad de reacción en la superficie del electrodo<sup>22</sup>. Por lo tanto, es de gran importancia seleccionar materiales de electrodos adecuados para optimizar y promover el rendimiento de las CCM.

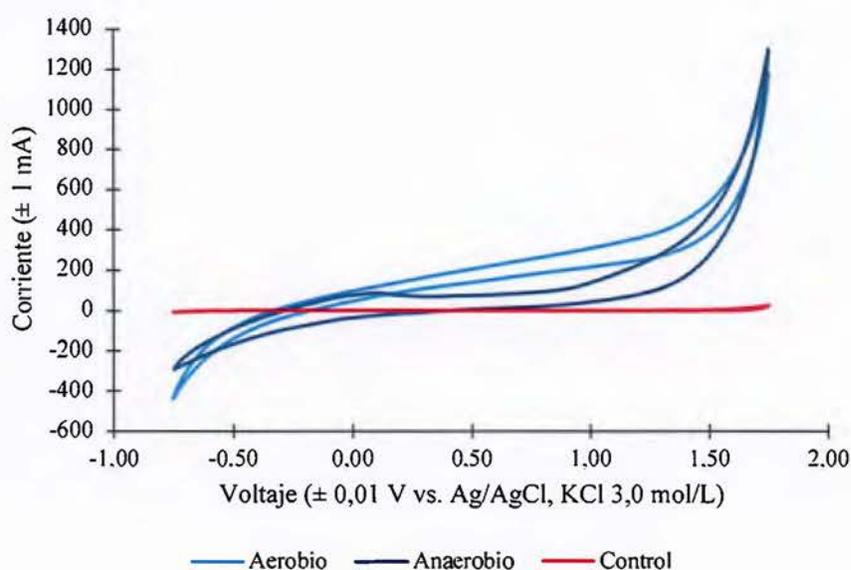
Para la cámara anódica se seleccionó un electrodo de cepillo de fibras de carbono debido a que presenta una alta área superficial y baja resistencia<sup>2</sup>. Mientras que para la cámara catódica se seleccionó el electrodo entre fieltro de carbono y tela de carbono. Ambos electrodos tienen la ventaja de presentar alta porosidad, lo que incrementa el área superficial a pesar de exhibir alta resistencia<sup>104</sup>. Se planteó la necesidad de modificar el cátodo con catalizador, por lo que, el electrodo que presentara la mejor actividad catalítica a través de una voltametría cíclica se emplearía en la cámara catódica de la CCM para comprobar su correcto funcionamiento.

En la tesis titulada *Caracterización de la reducción fotocatalítica de  $\text{CO}_2$  utilizando un catalizador de perovskita de bismuto inmovilizado en un microreactor*<sup>105</sup> se sintetizaron diferentes fotocatalizadores de tipo perovskita. Los catalizadores tipo perovskita de doble capa de bismuto normalmente se emplean en celdas fotovoltaicas por su amplio rango de absorción y bajo *band gap*<sup>32</sup>, sin embargo, también se consideran electrocatalizadores activos para la reacción de reducción de oxígeno<sup>27</sup>.

De esta manera se eligieron las perovskitas de  $\text{Cs}_4\text{CuBi}_2\text{Cl}_{12}$  y  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  como catalizadores para la ORR en la cámara catódica. Ambas perovskitas son parcialmente solubles en DMSO mientras que en hexano, acetona y acetonitrilo son insolubles. por lo que, se realizó una disolución del catalizador con Nafion<sup>®</sup> en DMSO. Es clave que el catalizador se suspenda de manera uniforme ya que se requiere un recubrimiento homogéneo y de

película delgada sobre el electrodo que sea suficientemente estrecha para que la resistencia al transporte de  $O_2$  dentro de la fase del Nafion<sup>®</sup> sea insignificante<sup>90</sup>.

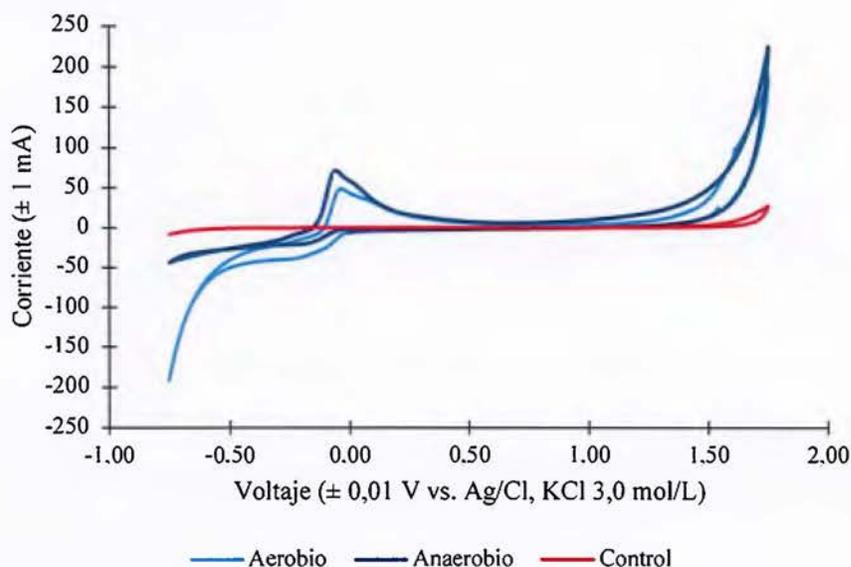
La voltametría cíclica en ambos electrodos modificados permitió descartar el uso del fieltro de carbono ya que esta no fue satisfactoria y no se observó actividad catalítica con ninguno de los dos compuestos. En la *Figura 10* se observa la voltametría cíclica en el electrodo de tela de carbono modificado con  $Cs_4CuBi_2Cl_{12}$  y al igual que en el electrodo de fieltro de carbono no se distinguen señales que evidencien su capacidad de catalizar la ORR. De igual manera, en medio anaerobio y aerobio, el voltagrama presenta la misma forma y no se diferencian señales catalíticas de adsorción de oxígeno en el compuesto.



**Figura 10.** Voltametría cíclica vs. (Ag/AgCl) de un electrodo de tela de carbono empleando PBS (pH = 6,67 y 0,1/1,5 mol/L) como electrolito soporte y velocidad de barrido de 25 mV/s: (a) electrodo modificado perovskita  $Cs_4CuBi_2Cl_{12}$  aireado, (b) electrodo modificado con perovskita  $Cs_4CuBi_2Cl_{12}$  con purga de nitrógeno y (c) electrodo sin modificar.

Caso contrario, en el voltagrama del electrodo de tela de carbono modificado con  $Cs_4NiBi_2Cl_{12}$  (*Figura 11*) se puede observar durante el experimento saturado con oxígeno una señal de corriente catódica a un voltaje de -0,20 V vs. Ag/AgCl correspondiente a la oxidación del catalizador. Este valor es común para catalizadores que adsorben oxígeno reversiblemente. También a un potencial de -0,01 V vs. Ag/AgCl se distingue un pico de corriente anódico de reducción de la perovskita. Se puede apreciar además en la misma

figura, que el voltagrama en condiciones saturadas con nitrógeno no muestra señales de actividad catalítica del compuesto, con ausencia casi nula de picos catódicos en el rango de -0,20 V a 0,00 V vs. Ag/AgCl, mientras que el experimento saturado con oxígeno permite dar paso a la reacción de reducción de oxígeno. Por otro lado, se evidencia un desplazamiento de la señal hacia la derecha, es decir, hacia potenciales más positivos lo que favorece la corriente de reducción catalítica.



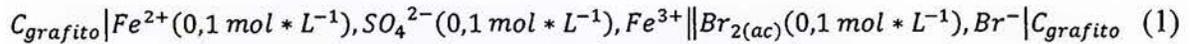
**Figura 11.** Voltametría cíclica vs. (Ag/AgCl) de un electrodo de tela de carbono empleando PBS (pH = 6,67 y 0,1/1,5 mol/L) como electrolito soporte y velocidad de barrido de 25 mV/s: (a) electrodo modificado perovskita  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  aireado, (b) electrodo modificado con perovskita  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  con purga de nitrógeno y (c) electrodo sin modificar.

Al evidenciar una actividad electrocatalítica para la ORR de la perovskita de doble capa  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  en tela de carbono; se selecciona este electrodo para utilizarse en la cámara catódica, así mismo se empleó esta perovskita para recubrir el cátodo por medio de la técnica *drop casting* y evaluar su desempeño en una configuración de celda con cátodo al aire.

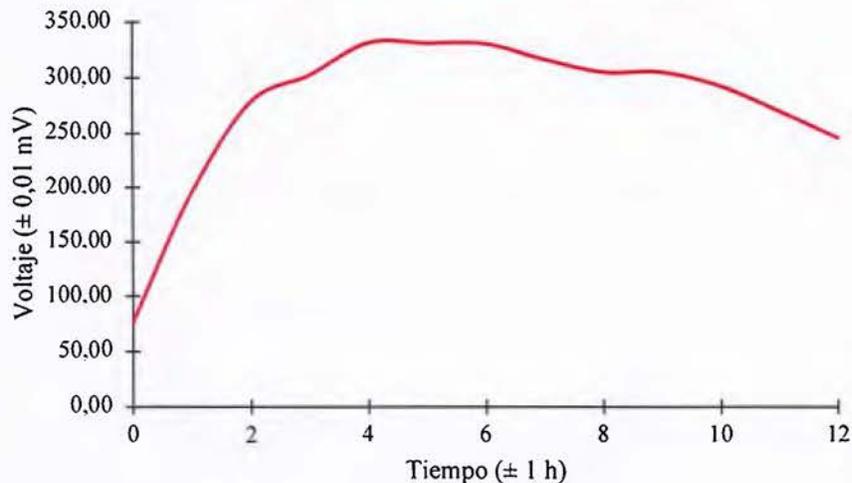
### 5.3.2. Cámara catódica

Con el propósito de establecer los parámetros de trabajo adecuados en la cámara catódica de una CCM se planteó el ensamblaje de una Celda Combustible Electroquímica (CCE) para evaluar el sistema de recolección de datos, así como de los electrodos de tela de carbono, su modificación con catalizador y la cámara en general. Primero se trabajó con una

configuración con cámara doble, cuya reacción electroquímica se describe en el diagrama (1), ya que esta permite un mejor control de los parámetros de funcionamiento de la celda.



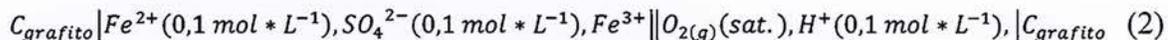
Según el diagrama (1), en la cámara anódica se empleó una disolución de  $Fe^{2+}$ , cuya hemireacción presenta un  $E^0 = +0,771 \text{ V}$  vs. EEH, y en la cámara catódica se empleó una disolución de  $Br_2$ , cuya hemireacción presenta un  $E^0 = +1,087 \text{ V}$  vs. EEH. En total el potencial de celda ( $E_{celda}$ ) resulta en un valor teórico de  $+0,316 \text{ V}$  vs. EEH. Como se puede observar en la *Figura 12*, el voltaje máximo promedio experimental para la celda control se encuentra en un rango entre  $(0,280 - 0,379) \text{ V}$ . De esta manera, se puede confirmar el correcto funcionamiento del electrodo de tela de carbono y del circuito en general, ya que no se evidencian pérdidas de voltaje por resistencia en los electrodos o en la disolución. Por otro lado, este ensayo permite establecer que la lectura de voltaje a través de la resistencia de  $50 \Omega$  se está realizando correctamente.



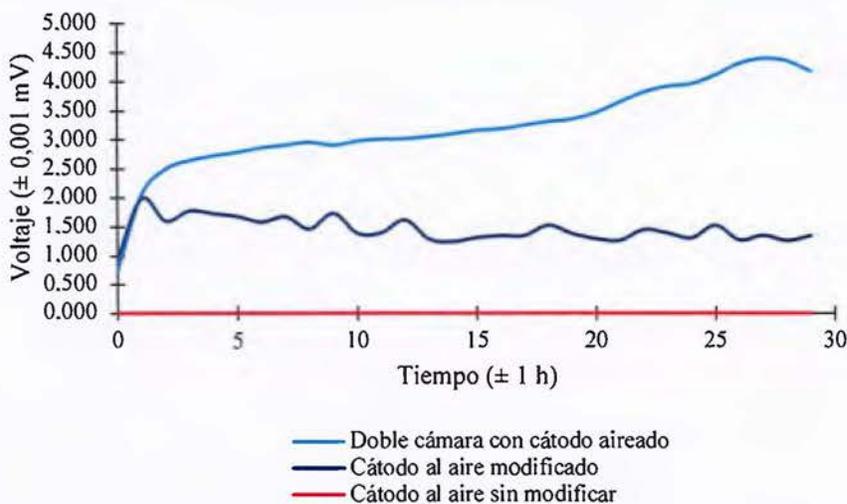
**Figura 12.** Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo de una CCE con doble cámara  $Fe^{2+}/Br_2$  para evaluar el correcto funcionamiento del electrodo de tela de carbono sin modificar.

Para evaluar el correcto funcionamiento de la configuración de celda con cátodo al aire se ensambló una CCE con doble cámara y el cátodo aireado sin modificar, y una CCE con cátodo al aire sin modificar. Se trabajó con una celda electroquímica, según el diagrama

(2), ya que esta permite un mejor control de los parámetros de salida para así poder establecer la limitación de la ORR al comparar la densidad de corriente máxima generada por ambas configuraciones.



En la *Figura 13* se compara la generación de voltaje de una celda con doble cámara y una con cátodo al aire sin modificar. Se puede apreciar como la configuración con cátodo al aire sin modificar no logra generar voltaje. Esta limitación se puede deber a la difusión de oxígeno en la cámara anódica de la celda, ya que se genera una pérdida del sustrato por oxidación aerobia<sup>22</sup>. En un esfuerzo por disminuir esta difusión se colocó Teflón® sobre la superficie externa el cátodo, sin embargo, los valores de voltaje caían a valores iguales a cero e inclusive a valores negativos al igual que el cátodo sin este recubrimiento. De igual manera, una poca exposición del cátodo al aire puede significar una limitación de más para la ORR.



**Figura 13.** Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo de una CCE con doble cámara y cátodo aireado, una CCE con cátodo al aire modificado con perovskita, y una CEE con cátodo al aire sin modificar para evaluar el correcto funcionamiento de la configuración de celda con cátodo al aire.

Por otro lado, el ensamblaje de la CCE con doble cámara y cátodo aireado sin modificar permite evidenciar la limitación intrínseca de la ORR en este tipo de celdas. Es decir, que la configuración con cátodo al aire no solo presenta el reto de superar el

sobrepotencial de la ORR, sino también esta configuración permite una mayor difusión del oxígeno hacia la cámara anódica que aporta al detrimento del voltaje por la oxidación aerobia del sustrato.

En un esfuerzo por superar estas barreras y generar voltaje con una celda con cátodo al aire se ensambló una CCE con cátodo al aire modificado con  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$ . El recubrimiento catalítico se realizó bajo la técnica *drop casting*, esta permitió una adecuada uniformidad. Se modificaron 3 electrodos y se logró cuantificar por diferencia la masa de catalizador inmovilizado por unidad de área en el electrodo de tela de carbono. En el *Cuadro IX* se observa la masa de catalizador por unidad de área que se impregna en los electrodos después de evaporar el disolvente en la estufa a 50 °C durante 4h, y se destaca la repetibilidad entre las muestras. En promedio los electrodos se recubrieron con una masa de  $(0,46 \pm 0,07)$   $\text{mg}/\text{cm}^2$  de  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  con una desviación estándar de  $0.04 \text{ mg}/\text{cm}^2$ .

**Cuadro IX.** Masa de la perovskita de  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  por unidad de área inmovilizada en los electrodos de tela de carbono posterior al recubrimiento bajo la técnica *drop casting*.

Electrodo	Masa del catalizador por unidad de área ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ )
1	0,46
2	0,50
3	0,42

En la *Figura 13* se observa como la celda con cátodo al aire modificado sí genera un valor de voltaje, con mejor resultado que la celda con cátodo al aire sin modificar. En este caso, la configuración cátodo al aire modificado después de una hora de haber iniciado la operación alcanza un máximo y fluctúa de manera constante en este valor de voltaje. La fluctuación del voltaje generado es común en este tipo de celdas y se puede atribuir a diferentes factores. En este caso en específico al ser una CCE, se le atribuye directamente a la difusión del oxígeno hacia la cámara anódica<sup>22</sup>.

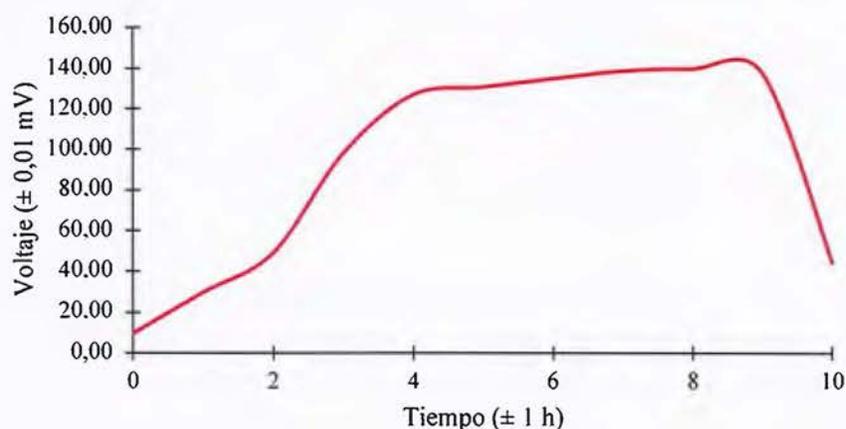
En el *Cuadro X* se pueden distinguir que a pesar de que la configuración con doble cámara presenta una mayor salida de voltaje, al considerar la generación de corriente por unidad de área, la densidad de corriente máxima generada por la configuración con cátodo al aire es mayor. Con la necesidad de evaluar el desempeño de la configuración de celda con cátodo al aire modificado con perovskita se ensambló una CCE con cátodo al aire comercial catalizado con  $\text{MnO}_2$  como electrodo control.

**Cuadro X.** Promedio de la densidad de corriente máxima como parámetro de desempeño del correcto funcionamiento del electrodo en la cámara catódica en una CCE configuración con doble cámara y con cátodo al aire.

Configuración	Electrodo	Área (cm <sup>2</sup> )	Densidad de corriente máxima (μA/cm <sup>2</sup> )
Doble cámara	Tela de carbono	12,6	(7,0 ± 0,3)
Cátodo al aire	Tela de carbono sin modificar	4,5	N. A.
	Tela de carbono modificado con perovskita	4,5	(9,5 ± 0,2)
	Electrodo comercial catalizado con MnO <sub>2</sub>	4,5	(630 ± 30)

Incertidumbre según método EURACHEM. k = 2

El electrodo control está diseñado para la reducción de oxígeno en aplicaciones de baja y alta potencia. Está catalizado con manganeso y actualmente se usa en aplicaciones comerciales en baterías de metal-aire y baterías despolarizadas por aire<sup>106</sup>. En la *Figura 14* se puede observar que luego 2 horas de iniciar la operación se genera voltaje y se mantiene en crecimiento, sin fluctuar, hasta alcanzar un valor máximo. Según el diagrama (2), la celda presenta un potencial estándar teórico de +0,458 V vs. EEH y experimentalmente la celda genera un potencial máximo en un rango de (0,108 – 0,182) V, esto representa el 31 % del potencial teórico, el cual es un porcentaje alto considerando el sobrepotencial de la ORR y las diferentes restricciones por la difusión de oxígeno en el cátodo.



**Figura 14.** Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo de una CCE con cátodo al aire comercial catalizado con MnO<sub>2</sub> para evaluar el desempeño del electrodo de tela de carbono modificado con perovskita.

Por otro lado, en el *Cuadro X* se puede observar que la densidad de corriente máxima generada por el electrodo control supera por dos órdenes de magnitud al electrodo de tela de carbono en ambas configuraciones. De esta manera, a pesar de que el electrodo de tela de carbono modificado con  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  presenta un correcto funcionamiento en la configuración con cátodo al aire, su desempeño es menor que el del electrodo control en la misma configuración.

Estos ensayos permitieron determinar el correcto funcionamiento del electrodo de tela de carbono modificado con  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$ , sin embargo, la difusión del oxígeno hacia la cámara anódica, así como hacia el electrodo son factores limitantes que puede favorecer y desfavorecer simultáneamente el desempeño de la celda. Un medio anaerobio es fundamental para el accionar de los microorganismos electrogénicos y a su vez un suministro directo de oxígeno es necesario para la ORR.

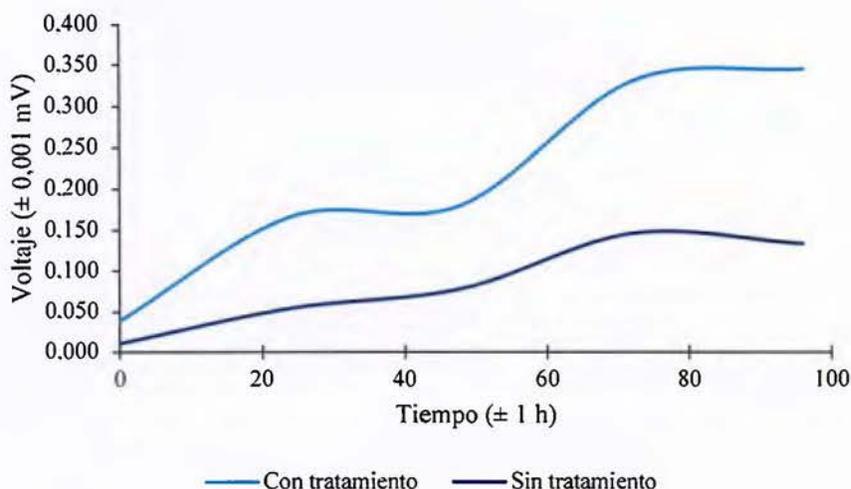
La elección del cátodo en las CCM con cátodo al aire es primordial ya que no se cuenta con dos cámaras separadas por una membrana; sino todos los elementos interaccionan en una sola, por lo que, los mismos factores afectan tanto el cátodo como el ánodo. La dificultad de esto se resume en que los rendimientos de ambos electrodos se favorecen en distintos ambientes. De esta manera, se descartó el electrodo de tela de carbono modificado con  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  para su uso en el tratamiento del agua residual del procesamiento del café con la configuración de celda con cátodo al aire.

### 5.3.3. Cámara anódica

La generación de corriente eléctrica es relativamente limitada en las CCM utilizadas en el tratamiento de residuos, y un aspecto de esta limitación está directamente relacionado con la comunidad microbiana que se establece en el ánodo y su eficiencia en la transferencia extracelular de electrones. El tratamiento del electrodo anódico, el enriquecimiento de biopelículas anódicas y los procesos de selección microbiana son prometedores para mejorar el rendimiento de las CCM.

En este caso se realizó un tratamiento de amoníaco al ánodo con el propósito de mejorar el establecimiento del microorganismo en las fibras de carbono. Se utilizó *S. oneidensis* como bacteria tipo ya que esta se emplea normalmente para la evaluación del desempeño de diferentes configuraciones de CCM<sup>49,107</sup>. En la *Figura 15* se muestra una diferencia significativa en la generación de voltaje entre la CCM con el ánodo sometido al

tratamiento de  $\text{NH}_3$  y la CCM con el ánodo sin tratamiento. También se observa un aumento progresivo del voltaje en ambas celdas debido a la colonización del ánodo por la bacteria que deriva la generación de un sólido conductor.



**Figura 15.** Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo en una CCM con doble cámara inoculada con *Shewanella oneidensis* empleando como ánodo cepillo de carbono con y sin tratamiento de  $\text{NH}_3$ .

Existen diferentes modelos que explican la conducción a través de la biopelícula, estos consideran la distribución de la biomasa y la variación de su grosor<sup>7</sup>. Las reacciones electroquímicas en la superficie del electrodo requieren energía de activación para la transferencia de electrones desde el donante de electrones hasta el ánodo. Las pérdidas de energía en el ánodo de las CCM son diferentes de aquellas para una CCE, porque la formación de la biopelícula del ánodo crea un entorno único. Primero, el metabolismo microbiano implica pérdida de energía. Las bacterias deben capturar energía de la diferencia de potencial entre su donante de electrones y el aceptor terminal de electrones para apoyar su crecimiento y mantenimiento. Segundo, la biopelícula tiene su propia resistencia óhmica para la conducción de electrones desde las células microbianas a la superficie del electrodo, y el transporte masivo dentro del sólido conductor también consume energía<sup>22</sup>.

El tratamiento de  $\text{NH}_3$  pretende disminuir la resistencia de carga y mejorar la transferencia electrónica a través de la biopelícula. La adición de grupos de nitrógeno en la superficie del ánodo atrae microorganismos electroactivos y disminuye el contenido de oxígeno unido al carbono, lo que interfiere con la transferencia de carga de las bacterias al

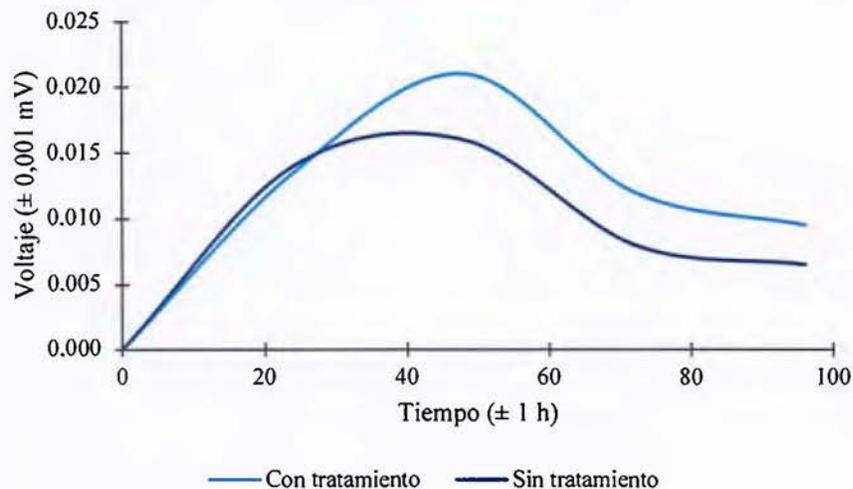
ánodo<sup>79,82</sup>. En el *Cuadro XI* se muestra que la CCM inoculada con *S. oneidensis* mejoró al doble su densidad de corriente máxima al emplear el tratamiento sobre el electrodo.

**Cuadro XI.** Promedio de la densidad de corriente máxima como parámetro de desempeño del correcto funcionamiento del electrodo de fibras de carbono en la cámara anódica en una CCM configuración con doble cámara y el efecto de un tratamiento de NH<sub>3</sub>.

Electrodo	Densidad de corriente máxima (μA/cm <sup>2</sup> )	
	CCM inoculada con <i>Shewanella oneidensis</i>	CCM inoculada con <i>Enterobacter asburiae</i>
Sin tratamiento de NH <sub>3</sub>	(0,28 ± 0,05)	(0,025 ± 0,002)
Con tratamiento de NH <sub>3</sub>	(0,6 ± 0,2)	(0,033 ± 0,004)

Incertidumbre según método EURACHEM, k = 2

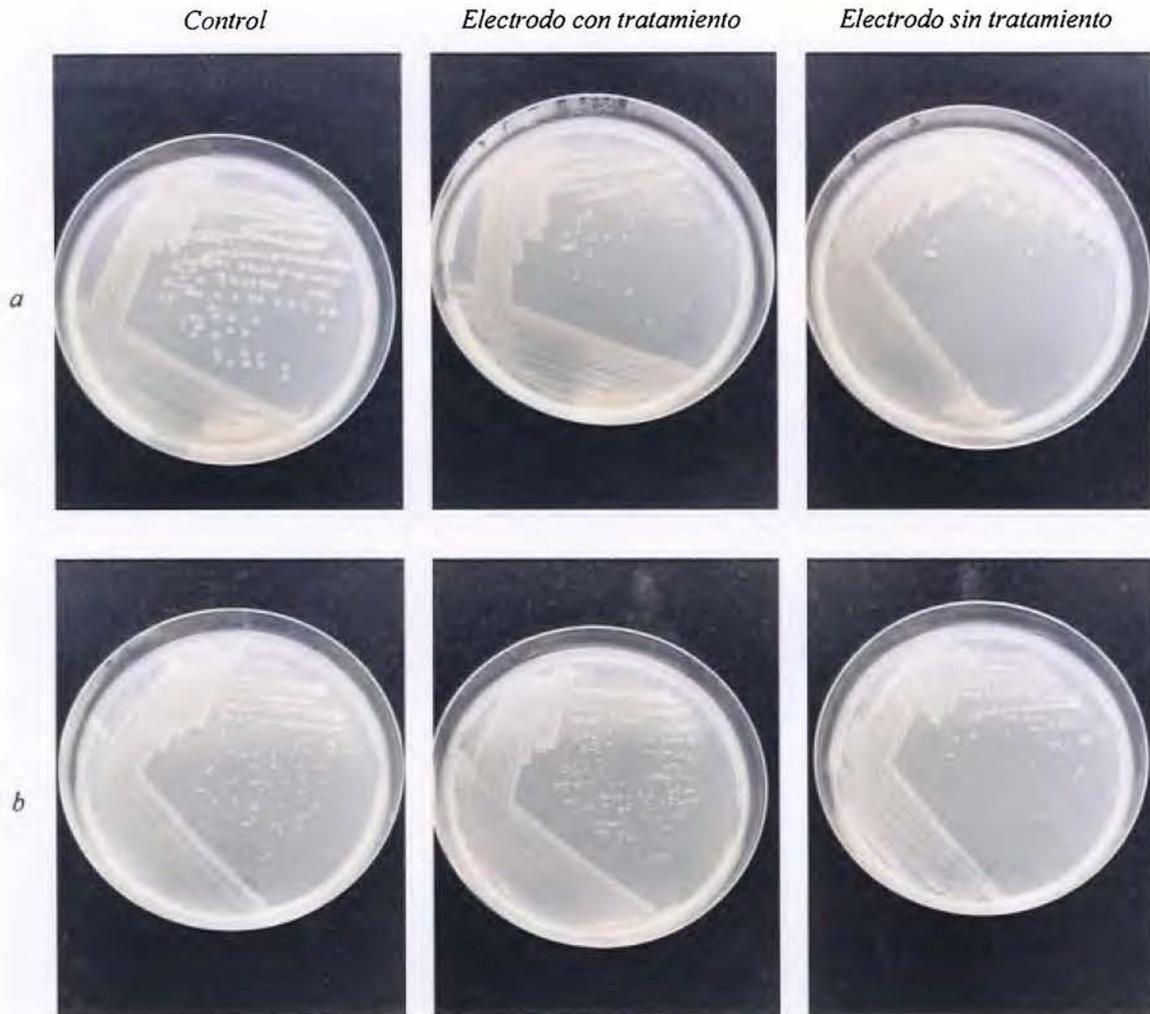
Con el interés profundizar en el estudio electrogénico de las bacterias aisladas del agua residual del procesamiento del café, se inoculó de igual manera que la bacteria tipo una CCM con *E. asburiae* ya que esta presentó en el estudio preliminar evidencia para reducir directamente especies químicas en medio anaerobio. En la *Figura 16* se observa que la generación de voltaje máximo no es satisfactoria, sin embargo, se logra percibir una diferencia entre las celdas de electrodo con y sin tratamiento.



**Figura 16.** Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo en una CCM con doble cámara inoculada con *Enterobacter asburiae* empleando como ánodo cepillo de carbono con y sin tratamiento de NH<sub>3</sub>.

A diferencia de *S. oneidensis*, *E. asburiae* luego de 50 h iniciada la operación y después de alcanzar un valor de voltaje máximo; decae a un mínimo sin alguna tendencia hacia al aumento. Por otro lado, al comparar la densidad de corriente máxima generada por ambas bacterias se muestra como la generada por *E. asburiae* presenta un orden de magnitud menor que la generada por *S. oneidensis*. Al desensamblar la celda se logra observar el crecimiento y la generación de biopelícula en la superficie del ánodo de la CCM inoculada con *E. asburiae*. Es decir que el microorganismo logró establecerse en el electrodo, sin embargo, a pesar de presentar evidencia de transferencia electrónica extracelular, no presenta una transferencia directa de electrones eficiente hacia el electrodo de una CCM.

Es importante mencionar que al finalizar cada operación la biopelícula presente en el electrodo se rayó en medio de cultivo puro con el objetivo de confirmar que la biopelícula establecida correspondía a la bacteria inoculada y no se estableció otro microorganismo que pudiera contaminar y así afectar la generación de voltaje en la celda. En la *Figura 17* se puede comparar el medio control rayado con el medio rayado de los electrodos con y sin tratamiento inoculados con las diferentes bacterias. En ambos casos y con los diferentes electrodos no se observa que la celda se haya contaminado por lo que se puede confirmar que el voltaje generado fue del accionar único de la bacteria inoculada y en el caso de *E. asburiae* no existió algún agente externo que afectara la salida de voltaje. En ambos casos el control negativo que consistía en las CCM sin bacteria inoculada no evidenció generación de voltaje, tanto para el electrodo con y sin tratamiento.



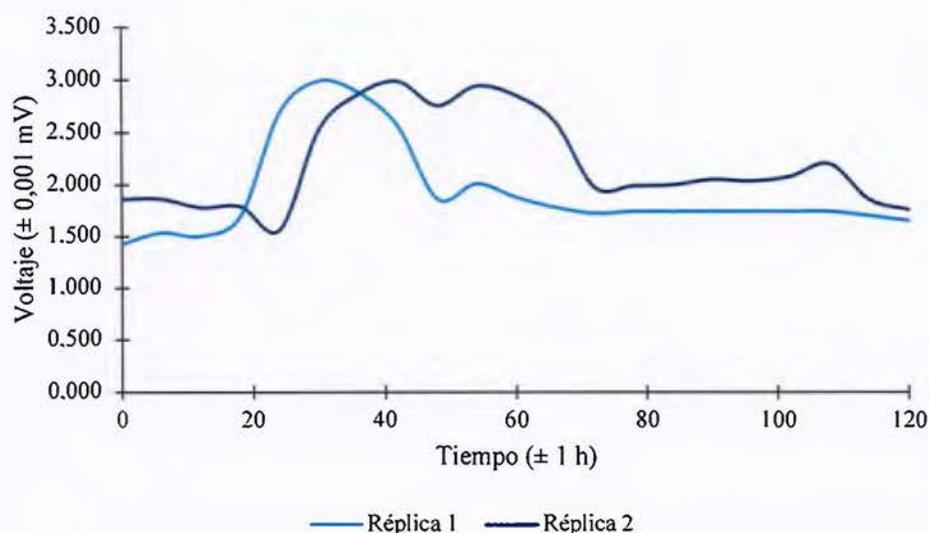
**Figura 17.** Rayado de bacteria: (a) *S. oneidensis* y (b) *E. asburiae* inoculadas en un CCM con doble cámara empleando ánodo con y sin tratamiento de  $\text{NH}_3$  en platos de AN.

De esta manera se logró determinar que un tratamiento con amoníaco en el electrodo de cepillo de fibras de carbono disminuye la resistencia óhmica propia de la biopelícula al reflejar un aumento en el voltaje generado. Así mismo, se evidencia que *E. asburiae* no presenta un buen desempeño en la transferencia directa de electrones hacia el electrodo en una CCM. Pocas cepas bacterianas con características electrogénicas tienen la capacidad de producir una alta densidad de corriente cuando se utilizan en cultivo puro, a diferencia de las cepas que se inoculan en comunidades mixtas<sup>1</sup>. Lo que señala que algunas células no interactúan directamente con el ánodo sino a través de las interacciones con otras bacterias que contribuyen indirectamente a la producción de electricidad. Las bacterias pueden facilitar

la transferencia de electrones a través de un mecanismo directo o indirecto. La transferencia directa requiere una conexión física entre la célula microbiana y la superficie del electrodo (nanocables o proteínas activas REDOX). La transferencia indirecta de electrones no requiere una conexión física, sino que este mecanismo se basa en moléculas de transferencia de electrones o mediadores REDOX<sup>1,2,42</sup>.

#### 5.4. Desempeño de una Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire en el tratamiento del agua residual del procesamiento del café

De acuerdo con el estudio de ambas cámaras de un CCM se establecieron las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de la configuración con cátodo al aire; se seleccionó el electrodo comercial catalizado con  $MnO_2$  y el ánodo con tratamiento de  $NH_3$  para ser empleados como electrodos en el tratamiento del agua residual del procesamiento del café. En la *Figura 18* se observa el comportamiento del voltaje en un periodo de 5 días, la CCM presenta un incremento progresivo hasta alcanzar un máximo después de 24 h y posteriormente decae lentamente a un mínimo que se estabiliza durante el resto de la operación.



**Figura 18.** Variación del voltaje máximo promedio respecto al tiempo en una CCM con cátodo al aire empleando agua residual del procesamiento del café como sustrato.

El aumento de la corriente ocurre en los dos primeros días de operación debido a la fermentación de los compuestos de carbono como parte del proceso de descomposición anaerobia<sup>11</sup>, así como del crecimiento de la comunidad microbiana y su establecimiento en el electrodo. De igual manera al inicio se diferencia una pequeña estabilización debida a que el biocatalizador debe superar la alta barrera de activación que se produce en el cátodo por la ORR, una causante de las principales pérdidas de energía en las CCM. A pesar de que el establecimiento del microorganismo es clave para la transferencia electrónica, la biopelícula varía según el crecimiento y la descomposición microbiana. De acuerdo con la transferencia de electrones, mejorar la disponibilidad de biocatalizador efectivo mejoraría el rendimiento hasta que la transferencia de masa dentro de un espesor y densidad se vuelve limitante<sup>7</sup>. Se puede inferir que el decaimiento del voltaje se debe a una excesiva colonización bacteriana que provoca una alta resistencia en la difusión del sustrato y transferencia de carga.

Con respecto al voltaje máximo, la limitación termodinámica hace que la CCM sea un sistema de baja potencia en comparación con otros sistemas de energía renovable, como las celdas solares y eólicas. El mecanismo de recolección de energía por medio de las CCM emplea oxígeno como aceptor terminal de electrones en el cátodo, lo que proporciona un potencial estándar de +0,805 V vs. Electrodo Estándar de Hidrógeno (EEH) en condiciones de operación típicas de las CCM<sup>4</sup>. En el ánodo, los microorganismos consumen el sustrato que genera el potencial reductor intracelular almacenado en el portador de electrones NADH. Así, el ánodo debe tener un potencial mayor que el NADH para permitir el transporte de electrones desde los microorganismos hacia el electrodo. Dado que el potencial de reducción del NADH es -0,320 V vs. EEH<sup>35</sup>, se espera una diferencia de potencial menor o igual a +1,125 V vs. EEH entre los electrodos de una CCM, independientemente del sustrato.

**Cuadro XII.** Desempeño de una CCM con cátodo al aire empleando electrodo comercial catalizado con MnO<sub>2</sub> y agua residual del procesamiento del café como sustrato con DQO inicial 27 g/L.

Réplica	Remoción de DQO (%)	Densidad de corriente máxima (μA/cm <sup>2</sup> )	Eficiencia coulombica (%)
1	29	13,29	0,173
2	28	13,27	0,209

Con el objetivo de evaluar el desempeño de la capacidad energética de la CCM con cátodo al aire se compararon los parámetros de remoción de DQO, eficiencia coulombica y densidad de corriente máxima. La eficiencia coulombica (CE) es el parámetro que evalúa la conversión de energía química en carga eléctrica y se calcula según la ecuación [3]<sup>108</sup>:

$$CE = \frac{8 \int_0^{t_0} I dt}{F V_{An} \Delta DQO} \quad [3]$$

Donde  $F$  es la constante de Faraday,  $V_{An}$  es el volumen del sustrato en el ánodo, la remoción de DQO o  $\Delta DQO$  se utiliza como la variable que sustituye el mol de donador de electrones que reaccionó (en sustratos complejos) y el valor 8 es la constante calculada a partir de la división de la masa molar del oxígeno y el número de electrones intercambiados por mol de oxígeno, que el caso de la ORR es de 4 electrones. Al observar el valor de eficiencia coulombica (*Cuadro XII*) para una CCM con cátodo al aire empleando agua residual del procesamiento del café como sustrato, se puede distinguir un porcentaje bajo en comparación a otros sustratos, sin embargo, se debe de considerar que la CE está relacionada con la corriente eléctrica pero una alta corriente no necesariamente implica una alta potencia de salida<sup>22,108</sup>.

La CE está normalizada para representar la cantidad de electrones entregados por el sustrato en forma de corriente. La corriente empleada para este cálculo varía según el área del electrodo, concentración del sustrato y resistencia óhmica en el seno de la disolución<sup>108</sup>. Se ha reportado para este mismo sustrato que la CE aumenta en concentraciones diluidas pero la remoción de DQO disminuye, mientras que en altas concentraciones la CE disminuye, pero la remoción de DQO aumenta<sup>89</sup>. La dilución del sustrato permite que la conductividad en el seno de la disolución aumente y se refleje una mayor generación de voltaje. Contrario a esto, la remoción de carga orgánica depende de la cantidad de microorganismos y del número de procesos metabólicos que se pueden llevar a cabo y que permiten la degradación del sustrato<sup>22</sup>. En este caso, el DQO inicial de operación es de 27 g/L ya que se pretende replicar las condiciones que se presentan en el campo y evaluar el desempeño para su posterior aplicación.

Pandey *et al*<sup>109</sup> en una revisión bibliográfica enlista alrededor de 100 sustratos empleados en CCM con diferentes configuraciones y electrodos. Si bien la mayoría presenta valores de CE y remoción de DQO altos se debe de considerar que los datos reportados involucran sistemas con concentraciones de DQO y volúmenes de trabajo bajos, y estos

según la ecuación [3] son inversamente proporcionales por lo que se logran obtener valores altos de CE. Pocos trabajan con concentraciones altas de sustratos complejos, además de que la gran mayoría utilizan sustratos simples con concentración de crecimiento idóneas. Esto dificulta comparar el desempeño de esta CCM con los de la literatura. Por su lado, el agua residual del procesamiento del café es un sustrato complejo que está compuesto por celulosa y lignina que limitan el crecimiento bacteriano, los procesos de degradación de este tipo de compuestos no están directamente relacionados con la generación de electricidad<sup>22</sup>.

Con respecto a la remoción de DQO se puede observar en el *Cuadro XII* que la celda logra una remoción de carga orgánica promedio del 28 % en un periodo de 5 días. El valor de DQO luego de la operación de la celda se aproxima al límite máximo permitido de vertido de aguas residuales de beneficiado de café en cuerpos receptores según la normativa del país<sup>18</sup>. Esta capacidad para remover la carga orgánica del sistema eficientemente contrarresta su bajo rendimiento eléctrico.

La densidad de corriente es un parámetro de uso común para describir el rendimiento de generación de electricidad en una CCM. Representa la corriente en términos de superficie del electrodo unitario o volumen del reactor. Por lo general, la corriente se normaliza por el área de superficie geométrica del ánodo, mientras que el área de superficie del cátodo a veces se usa cuando la reacción del cátodo es el paso limitante<sup>108</sup>. Se puede observar que la densidad de corriente máxima respecto al cátodo alcanza un valor de  $(13,28 \pm 0,04) \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , este valor es bajo en comparación a otros sustratos, lo que se atribuye a su complejidad. Sin embargo, una CCM con doble cámara empleando el mismo sustrato<sup>89</sup> reporta un valor de  $8,14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , lo que confirma el funcionamiento de la configuración con cátodo al aire para mejorar el desempeño de la celda.

El agua residual del procesamiento del café al ser considerado agua residual compleja presenta la ventaja que el uso de un electrodo como aceptor de electrones es atractivo, ya que los microorganismos responsables de la degradación se ubicarán junto con los contaminantes en el ánodo. La CCM alimentada con agua residual del procesamiento del café exhibe una baja CE al ser operada en concentraciones altas del sustrato, sin embargo, esta concentración favorece el % de remoción de carga orgánica. La densidad de corriente máxima permite confirmar el correcto desempeño de la configuración con cátodo al aire. El tipo de sustrato y las reacciones electroquímicas seguirán limitando el rendimiento de las celdas, además que

es importante reconocer que muchos residuos no pueden ser adecuados para su alimentación. no obstante, existen diferentes estrategias y oportunidades para mejorar aún más la capacidad de generación de energía en las CCM.

## Conclusiones y recomendaciones

El estudio realizado permitió evaluar el desempeño de una Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire para el tratamiento del agua residual del procesamiento del café del beneficio CoopeTarrazú R.L. Con la necesidad de establecer la funcionalidad de implementar esta tecnología al agua residual de la industria del café, primero se realizó una caracterización fisicoquímica y microbiológica del sustrato, y luego se realizó un estudio para el correcto funcionamiento de ambas cámaras de una CCM.

La caracterización fisicoquímica permitió establecer que el sustrato es rico en lignocelulosa. El contenido de biomasa lignocelulósica dificulta la degradación anaerobia microbiana, ya que esta presenta abundante celulosa, hemicelulosa y ligninas, que los microorganismos electrógenos no pueden utilizar directamente para la generación de electricidad. El bajo contenido de sólidos totales clasifica a la CCM como un digestor de tipo líquido; debido a la naturaleza de una celda combustible esto permite el transporte de masa en el seno de la disolución y así una adecuada conductividad. La relación C:N del sustrato se encuentra en el rango de condiciones ideales para el desarrollo de microorganismos que son fundamentales para la degradación de la materia orgánica, sin embargo, esta es lo suficientemente baja como para reportar pérdidas de nitrógeno por volatilización. Al sumar el bajo pH y alta carga orgánica este residuo presenta bajo valor nutricional para los suelos. De esta manera se puede aprovechar este residuo al degradarse en un sistema electroquímico y así no perjudicar los suelos en los que actualmente se disponen.

La caracterización microbiológica descartó a la bacteria *Lactobacillus harbinensis* con capacidad de una respiración extracelular de las especies químicas en medio anaerobio. Se evidenció la presencia de la bacteria *Enterobacter asburiae* con la capacidad de reducir especies químicas solubles e insoluble en medio anaerobio. Esta característica está presente en microorganismos electrogénicos y es de gran relevancia ya que se pueden utilizar satisfactoriamente en este tipo de tecnologías debido a la liberación extracelular de los electrones al electrodo.

El estudio individual de la cámara catódica y anódica permitió establecer las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una CCM con cátodo al aire. La caracterización electroquímica por medio de una voltametría cíclica permitió seleccionar el electrodo de tela de carbono sobre el electrodo de fieltro de carbono, ya que la

tela de carbono modificada con perovskita presentaba señales catalíticas para la ORR. Específicamente en el voltagrama del catalizador  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  se diferencian señales de adsorción de oxígeno en el compuesto y señales que permiten dar paso a la reacción de reducción de oxígeno. Un desplazamiento de la señal hacia potenciales más positivos favorece la corriente de reducción catalítica.

Si bien se realizó un adecuado recubrimiento catalítico bajo la técnica *drop casting* y se determinó el correcto funcionamiento del electrodo de tela de carbono modificado en una celda con cátodo al aire, presentó bajo desempeño en comparación con el electrodo comercial catalizado con  $\text{MnO}_2$  (electrodo control). La difusión del oxígeno hacia la cámara anódica y hacia el cátodo es un factor limitante. Recubrimientos con PTFE en el lado externo del cátodo se plantean como capas de difusión que permiten el contacto del oxígeno con el electrodo y a la vez formar una barrera contra la difusión excesiva hacia la cámara anódica. La optimización de las capas de difusión de oxígeno, así como del recubrimiento con catalizador es una opción para mejorar la densidad de corriente máxima en la configuración con cátodo al aire.

Se seleccionó el electrodo de cepillo de fibras de carbono como ánodo por su alta área superficial. Se logró determinar que un tratamiento con amoníaco en el ánodo disminuye la resistencia óhmica propia de la biopelícula al reflejar un aumento en el voltaje generado. Así mismo, se evidencia que la bacteria *Enterobacter asburiae* a pesar de presentar evidencia electrogénica no presenta un buen desempeño en la transferencia directa de electrones hacia el electrodo en una CCM. Comunidades bacterianas mixtas o el uso de mediadores contribuyen indirectamente a la producción de electricidad por lo que no se descarta esta bacteria en la implementación de las CCM.

La remoción de DQO, eficiencia coulombica y densidad de corriente máxima permitieron evaluar el desempeño de esta tecnología al tratamiento del agua residual del procesamiento del café. Las CCM presentan la capacidad para remover eficientemente la carga orgánica, lo que contrarresta su bajo rendimiento eléctrico. El agua residual del procesamiento del café es un sustrato complejo que limita la degradación microbiana relacionado con la generación de electricidad. sin embargo, es altamente biodegradable. Esta relación causa que exhiba baja eficiencia coulombica mas no implica que su alimentación en una CCM se debe descartar.

Es importante reconocer que no todos los residuos pueden ser adecuados para alimentar directamente las CCM desde el punto de vista de producción de energía, así como, que existen oportunidades para mejorar la generación de energía al mejorar la biodegradabilidad del sustrato y, eliminar los compuesto inhibidores y competitivos por medio de un pretratamiento. La optimización de un pretratamiento, tiempo de operación, agitación del sustrato y sustitución de los electrodos por acumulación de biopelícula son opciones para mejorar la generación de electricidad.

En principio, el objetivo principal de la implementación de las CCM al tratamiento de aguas residuales no es lograr una alta potencia sino remover la carga orgánica. El potencial de las CCM para recuperar energía a partir de sustratos complejos continúa sin conocerse claramente, sin embargo, es claro que se requiere de la energía total que han demostrado generar para aprovechar exitosamente el tratamiento de aguas residuales complejas con esta tecnología.

## Referencias bibliográficas

- (1) Slate, A. J.; Whitehead, K. A.; Brownson, D. A. C.; Banks, C. E. Microbial Fuel Cells: An Overview of Current Technology. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *101*, 60–81. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.09.044>.
- (2) Santoro, C.; Arbizzani, C.; Erable, B.; Ieropoulos, I. Microbial Fuel Cells: From Fundamentals to Applications. A Review. *J. Power Sources* **2017**, *356*, 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>.
- (3) Tamboli, E.; Eswari, J. S. *Microbial Fuel Cell Configurations*; Elsevier B.V., 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64052-9.00016-9>.
- (4) Wang, X.; Li, N. Air-Cathodes. *Microb. Electrochem. Technol.* **2018**, 99–115. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64052-9.00005-4>.
- (5) Feng, C.; Sharma, S. C. D.; Yu, C. P. Microbial Fuel Cells for Wastewater Treatment. *Biotechnol. Biomimetics Civ. Eng.* **2015**, 411–437. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-09287-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09287-4_18).
- (6) Pant, D.; Van Bogaert, G.; Diels, L.; Vanbroekhoven, K. A Review of the Substrates Used in Microbial Fuel Cells (MFCs) for Sustainable Energy Production. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (6), 1533–1543. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.017>.
- (7) Xia, C.; Zhang, D.; Pedrycz, W.; Zhu, Y.; Guo, Y. Models for Microbial Fuel Cells: A Critical Review. *J. Power Sources* **2018**, *373*, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.11.001>.
- (8) ICAFE. *Informe Sobre La Actividad Cafetalera de Costa Rica*; Heredia, 2019.
- (9) Alpízar, M.; Apuy, E.; Medaglia, C.; Mora, E.; Moreira, L.; Segura, S.; López, K.; Ulloa, E. *Estadísticas de Comercio Exterior: Costa Rica 2017*; San José, 2018.
- (10) MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). *Lineamientos a Seguir Conducentes a Un Programa de Buenas Prácticas de Manufactura (Beneficiado)*; Costa Rica, 2010.
- (11) Alemayehu, Y. A.; Asfaw, S. L.; Tirfie, T. A. Management Options for Coffee Processing Wastewater. A Review. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* **2020**, *22* (2), 454–469. <https://doi.org/10.1007/s10163-019-00953-y>.
- (12) Montero Mora, A.; Morales, S.; Aurelio, J. La Contaminación de Las Aguas Mieles En Costa Rica: Un Conflicto de Contenido Ambiental (1840-1910). *Rev. Electrónica Hist.* **2009**, *10* (1), 4–15.
- (13) Zarrinbakhsh, N.; Wang, T.; Rodriguez-Uribe, A.; Misra, M.; Mohanty, A. K. Characterization of Wastes and Coproducts from the Coffee Industry for Composite Material Production. *BioResources* **2016**, *11* (3), 7637–7653. <https://doi.org/10.15376/biores.11.3.7637-7653>.
- (14) Audet, J. ¿Café lavado, natural o miel? Los 3 métodos principales de procesamiento de café explicados <https://sainthenri.ca/blogs/news/cafe-lave-naturel-ou-miel-les-3-principales-methodes-de-traitement-du-cafe-expliquees> (accessed Mar 25, 2020).
- (15) Javier, Á.; Smeltekop, H.; Manuel, L.; Artículo, D. ( Coffea Arabica ) Implementado En La Comunidad Carmen Pampa Provincia Nor Yungas Del Departamento de La Paz Evaluation of a Treatment System Wastewater Prebeneficiado of Coffee ( Coffea Arabica ) Implemented in the Community Carmen Pampa Province of Nor . **2011**, 34–42.
- (16) Chacón Araya, R. Sistema de Tratamiento de Las Aguas Residuales Del Beneficiado Por Aspersión Sobre Pasto Extrella. *PROMECAFE* **2011**, No. 127, 7–11.
- (17) Araya, M. A. *Costos de Beneficiado de Café Aceptados Por Ley N° 2762 Cosecha*

2014-2015; San José, 2015.

- (18) MINAE. *Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales*; Costa Rica, 2007.
- (19) Rahimnejad, M.; Adhami, A.; Darvari, S.; Zirepour, A.; Oh, S.-E. Microbial Fuel Cell as New Technology for Bioelectricity Generation: A Review. *Alexandria Eng. J.* **2015**, *54* (3), 745–756. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2015.03.031>.
- (20) Nandy, A.; Kundu, P. P. Configurations of Microbial Fuel Cells. In *Progress and Recent Trends in Microbial Fuel Cells*; Elsevier, 2018; pp 25–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64017-8.00003-8>.
- (21) Bajracharya, S.; ElMekawy, A.; Srikanth, S.; Pant, D. *Cathodes for Microbial Fuel Cells*; Elsevier Ltd., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-375-1.00006-X>.
- (22) Sun, M.; Zhai, L.-F.; Li, W.-W.; Yu, H.-Q. Harvest and Utilization of Chemical Energy in Wastes by Microbial Fuel Cells. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (10), 2847–2870. <https://doi.org/10.1039/C5CS00903K>.
- (23) Wei, J.; Liang, P.; Huang, X. Recent Progress in Electrodes for Microbial Fuel Cells. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (20), 9335–9344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.019>.
- (24) Zhou, M.; Chi, M.; Luo, J.; He, H.; Jin, T. An Overview of Electrode Materials in Microbial Fuel Cells. *J. Power Sources* **2011**, *196* (10), 4427–4435. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.01.012>.
- (25) Gautam, R. K.; Verma, A. Electrocatalyst Materials for Oxygen Reduction Reaction in Microbial Fuel Cell. In *Microbial Electrochemical Technology*; Elsevier, 2019; pp 451–483. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64052-9.00018-2>.
- (26) Hwang, J.; Rao, R. R.; Giordano, L.; Katayama, Y.; Yu, Y.; Shao-Horn, Y. Perovskites in Catalysis and Electrocatalysis. *Science (80-. )*. **2017**, *358* (6364), 751–756. <https://doi.org/10.1126/science.aam7092>.
- (27) Xu, X.; Zhong, Y.; Shao, Z. Double Perovskites in Catalysis, Electrocatalysis, and Photo(Electro)Catalysis. *Trends Chem.* **2019**, *1* (4), 410–424. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.05.006>.
- (28) Santomauro, F. G.; Grilj, J.; Mewes, L.; Nedelcu, G.; Yakunin, S.; Rossi, T.; Capano, G.; Al Haddad, A.; Budarz, J.; Kinschel, D.; et al. Localized Holes and Delocalized Electrons in Photoexcited Inorganic Perovskites: Watching Each Atomic Actor by Picosecond X-Ray Absorption Spectroscopy. *Struct. Dyn.* **2017**, *4* (4), 044002. <https://doi.org/10.1063/1.4971999>.
- (29) Dong, H.; Yu, H.; Wang, X.; Zhou, Q.; Sun, J. Carbon-Supported Perovskite Oxides as Oxygen Reduction Reaction Catalyst in Single Chambered Microbial Fuel Cells. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2013**, *88* (5), 774–778. <https://doi.org/10.1002/jctb.3893>.
- (30) Sun, N.; Liu, H.; Yu, Z.; Zheng, Z.; Shao, C. Mn-Doped La<sub>0.6</sub>Sr<sub>0.4</sub>CoO<sub>3</sub> Perovskite Catalysts with Enhanced Performances for Non-Aqueous Electrolyte Li–O<sub>2</sub> Batteries. *RSC Adv.* **2016**, *6* (16), 13522–13530. <https://doi.org/10.1039/C5RA25289J>.
- (31) Nourbakhsh, F.; Mohsennia, M.; Pazouki, M. Highly Efficient Cathode for the Microbial Fuel Cell Using LaXO<sub>3</sub> (X = [Co, Mn, Co<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.5</sub>]) Perovskite Nanoparticles as Electrocatalysts. *SN Appl. Sci.* **2020**, *2* (3), 391. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2048-1>.
- (32) Zhang, C.; Gao, L.; Teo, S.; Guo, Z.; Xu, Z.; Zhao, S.; Ma, T. Design of a Novel and Highly Stable Lead-Free Cs<sub>2</sub>NaBi<sub>1/6</sub> Double Perovskite for Photovoltaic Application. *Sustain. Energy Fuels* **2018**, *2* (11), 2419–2428.

- <https://doi.org/10.1039/C8SE00154E>.
- (33) Xu, J.; Xu, C.; Liu, J.-B.; Bellaiche, L.; Xiang, H.; Liu, B.-X.; Huang, B. Prediction of Room-Temperature Half-Metallicity in Layered Halide Double Perovskites. *npj Comput. Mater.* **2019**, *5* (1), 114. <https://doi.org/10.1038/s41524-019-0252-6>.
- (34) Song, H.-L.; Zhu, Y.; Li, J. Electron Transfer Mechanisms, Characteristics and Applications of Biological Cathode Microbial Fuel Cells – A Mini Review. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12* (8), 2236–2243. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.01.008>.
- (35) Bartlett, P. N. Bioenergetics and Biological Electron Transport. In *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*; 2008; pp 1–37. <https://doi.org/10.1002/9780470753842.ch1>.
- (36) Baron, D.; LaBelle, E.; Coursolle, D.; Gralnick, J. A.; Bond, D. R. Electrochemical Measurement of Electron Transfer Kinetics by *Shewanella Oneidensis* MR-1. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (42), 28865–28873. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.043455>.
- (37) Coursolle, D.; Baron, D. B.; Bond, D. R.; Gralnick, J. A. The Mtr Respiratory Pathway Is Essential for Reducing Flavins and Electrodes in *Shewanella Oneidensis*. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (2), 467–474. <https://doi.org/10.1128/JB.00925-09>.
- (38) Coursolle, D.; Gralnick, J. A. Modularity of the Mtr Respiratory Pathway of *Shewanella Oneidensis* Strain MR-1. *Mol. Microbiol.* **2010**, *77* (4), 995–1008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07266.x>.
- (39) Fredrickson, J. K.; Romine, M. F.; Beliaev, A. S.; Auchtung, J. M.; Driscoll, M. E.; Gardner, T. S.; Nealson, K. H.; Osterman, A. L.; Pinchuk, G.; Reed, J. L.; et al. Towards Environmental Systems Biology of *Shewanella*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6* (8), 592–603. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1947>.
- (40) Du, Z.; Li, H.; Gu, T. A State of the Art Review on Microbial Fuel Cells: A Promising Technology for Wastewater Treatment and Bioenergy. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25* (5), 464–482. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.004>.
- (41) Liu, H.; Cheng, S.; Logan, B. E. Production of Electricity from Acetate or Butyrate Using a Single-Chamber Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (2), 658–662. <https://doi.org/10.1021/es048927c>.
- (42) Scott, K. *An Introduction to Microbial Fuel Cells*; Elsevier Ltd., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-375-1.00001-0>.
- (43) Lu, N.; Zhou, S. gui; Zhuang, L.; Zhang, J. tao; Ni, J. ren. Electricity Generation from Starch Processing Wastewater Using Microbial Fuel Cell Technology. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *43* (3), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.005>.
- (44) Huang, L.; Logan, B. E. Electricity Generation and Treatment of Paper Recycling Wastewater Using a Microbial Fuel Cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80* (2), 349–355. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1546-7>.
- (45) Manohar, A. K.; Mansfeld, F. The Internal Resistance of a Microbial Fuel Cell and Its Dependence on Cell Design and Operating Conditions. *Electrochim. Acta* **2009**, *54* (6), 1664–1670. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.06.047>.
- (46) Sanchez, D.; Jacobs, D.; Gregory, K.; Huang, J.; Hu, Y.; Vidic, R.; Yun, M. Changes in Carbon Electrode Morphology Affect Microbial Fuel Cell Performance with *Shewanella Oneidensis* MR-1. *Energies* **2015**, *8* (3), 1817–1829. <https://doi.org/10.3390/en8031817>.
- (47) Pinto, D.; Coradin, T.; Laberty-Robert, C. Effect of Anode Polarization on Biofilm Formation and Electron Transfer in *Shewanella Oneidensis*/Graphite Felt Microbial Fuel Cells. *Bioelectrochemistry* **2018**, *120*, 1–9.

- <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.10.008>.
- (48) Bretschger, O.; Obraztsova, A.; Sturm, C. A.; Chang, I. S.; Gorby, Y. A.; Reed, S. B.; Culley, D. E.; Reardon, C. L.; Barua, S.; Romine, M. F.; et al. Current Production and Metal Oxide Reduction by *Shewanella Oneidensis* MR-1 Wild Type and Mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (21), 7003–7012. <https://doi.org/10.1128/AEM.01087-07>.
- (49) Kim, H. J.; Park, H. S.; Hyun, M. S.; Chang, I. S.; Kim, M.; Kim, B. H. A Mediator-Less Microbial Fuel Cell Using a Metal Reducing Bacterium, *Shewanella Putrefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30* (2), 145–152. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00478-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00478-1).
- (50) Masih, S. A.; Srivastava, R. Enterobacter Species Specific Microbial Fuel Cells Show Increased Power Generation with High Coulombic Efficiency. *Trends Biosci.* **2012**, *5* (2), 114–118.
- (51) Tkach, O.; Liu, L.; Wang, A. Electricity Generation by *Enterobacter* Sp. of Single-Chamber Microbial Fuel Cells at Different Temperatures. *J. Clean Energy Technol.* **2015**, *4* (1), 36–42. <https://doi.org/10.7763/JOCET.2016.V4.250>.
- (52) Rezaei, F.; Xing, D.; Wagner, R.; Regan, J. M.; Richard, T. L.; Logan, B. E. Simultaneous Cellulose Degradation and Electricity Production by *Enterobacter Cloacae* in a Microbial Fuel Cell. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (11), 3673–3678. <https://doi.org/10.1128/AEM.02600-08>.
- (53) Ren, Z.; Steinberg, L. M.; Regan, J. M. Electricity Production and Microbial Biofilm Characterization in Cellulose-Fed Microbial Fuel Cells. *Water Sci. Technol.* **2008**, *58* (3), 617–622. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.431>.
- (54) Catal, T.; Li, K.; Bermek, H.; Liu, H. Electricity Production from Twelve Monosaccharides Using Microbial Fuel Cells. *J. Power Sources* **2008**, *175* (1), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.09.083>.
- (55) Niessen, J.; Schröder, U.; Scholz, F. Exploiting Complex Carbohydrates for Microbial Electricity Generation - A Bacterial Fuel Cell Operating on Starch. *Electrochem. commun.* **2004**, *6* (9), 955–958. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2004.07.010>.
- (56) Wen, Q.; Wu, Y.; Cao, D.; Zhao, L.; Sun, Q. Electricity Generation and Modeling of Microbial Fuel Cell from Continuous Beer Brewery Wastewater. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (18), 4171–4175. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.058>.
- (57) Patil, S. A.; Surakasi, V. P.; Koul, S.; Ijmulwar, S.; Vivek, A.; Shouche, Y. S.; Kapadnis, B. P. Electricity Generation Using Chocolate Industry Wastewater and Its Treatment in Activated Sludge Based Microbial Fuel Cell and Analysis of Developed Microbial Community in the Anode Chamber. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (21), 5132–5139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.041>.
- (58) Wang, X.; Feng, Y.; Ren, N.; Wang, H.; Lee, H.; Li, N.; Zhao, Q. Accelerated Start-up of Two-Chambered Microbial Fuel Cells: Effect of Anodic Positive Poised Potential. *Electrochim. Acta* **2009**, *54* (3), 1109–1114. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.07.085>.
- (59) Othman, R.; Dicks, A. L.; Zhu, Z. Non Precious Metal Catalysts for the PEM Fuel Cell Cathode. *Int. J. Hydrogen Energy* **2012**, *37* (1), 357–372. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.08.095>.
- (60) Liu, H.; Logan, B. E. Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38* (14), 4040–4046. <https://doi.org/10.1021/es0499344>.

- (61) Cheng, S.; Liu, H.; Logan, B. E. Power Densities Using Different Cathode Catalysts (Pt and CoTMPP) and Polymer Binders (Nafion and PTFE) in Single Chamber Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (1), 364–369. <https://doi.org/10.1021/es0512071>.
- (62) Cheng, S.; Liu, H.; Logan, B. E. Increased Performance of Single-Chamber Microbial Fuel Cells Using an Improved Cathode Structure. *Electrochem. commun.* **2006**, *8* (3), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.01.010>.
- (63) Zhang, F.; Cheng, S.; Pant, D.; Bogaert, G. Van; Logan, B. E. Power Generation Using an Activated Carbon and Metal Mesh Cathode in a Microbial Fuel Cell. *Electrochem. commun.* **2009**, *11* (11), 2177–2179. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.09.024>.
- (64) Zhang, J. N.; You, S. J.; Yuan, Y. X.; Zhao, Q. L.; Zhang, G. D. Efficient Electrocatalysis of Cathodic Oxygen Reduction with Pt-Fe Alloy Catalyst in Microbial Fuel Cell. *Electrochem. commun.* **2011**, *13* (9), 903–905. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.03.023>.
- (65) Birry, L.; Mehta, P.; Jaouen, F.; Dodelet, J. P.; Guioot, S. R.; Tartakovsky, B. Application of Iron-Based Cathode Catalysts in a Microbial Fuel Cell. *Electrochim. Acta* **2011**, *56* (3), 1505–1511. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.08.019>.
- (66) Wei, B.; Tokash, J. C.; Chen, G.; Hickner, M. A.; Logan, B. E. Development and Evaluation of Carbon and Binder Loading in Low-Cost Activated Carbon Cathodes for Air-Cathode Microbial Fuel Cells. *RSC Adv.* **2012**, *2* (33), 12751–12758. <https://doi.org/10.1039/c2ra21572a>.
- (67) Hernández-Flores, G.; Poggi-Varaldo, H. M.; Solorza-Feria, O.; Ponce-Noyola, M. T.; Romero-Castañón, T.; Rinderknecht-Seijas, N.; Galíndez-Mayer, J. Characteristics of a Single Chamber Microbial Fuel Cell Equipped with a Low Cost Membrane. *Int. J. Hydrogen Energy* **2015**, *40* (48), 17380–17387. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.10.024>.
- (68) Milner, E. M.; Scott, K.; Head, I. M.; Curtis, T.; Yu, E. H. Evaluation of Porous Carbon Felt as an Aerobic Biocathode Support in Terms of Hydrogen Peroxide. *J. Power Sources* **2017**, *356*, 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.079>.
- (69) Hulicova-Jurcakova, D.; Seredych, M.; Lu, G. Q.; Bandosz, T. J. Combined Effect of Nitrogen- and Oxygen-Containing Functional Groups of Microporous Activated Carbon on Its Electrochemical Performance in Supercapacitors. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (3), 438–447. <https://doi.org/10.1002/adfm.200801236>.
- (70) Duteanu, N.; Erable, B.; Senthil Kumar, S. M.; Ghangrekar, M. M.; Scott, K. Effect of Chemically Modified Vulcan XC-72R on the Performance of Air-Breathing Cathode in a Single-Chamber Microbial Fuel Cell. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (14), 5250–5255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.120>.
- (71) Dong, H.; Yu, H.; Wang, X. Catalysis Kinetics and Porous Analysis of Rolling Activated Carbon-PTFE Air-Cathode in Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (23), 13009–13015. <https://doi.org/10.1021/es303619a>.
- (72) Liu, Y.; Liu, H.; Wang, C.; Hou, S.-X.; Yang, N. Sustainable Energy Recovery in Wastewater Treatment by Microbial Fuel Cells: Stable Power Generation with Nitrogen-Doped Graphene Cathode. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (23), 13889–13895. <https://doi.org/10.1021/es4032216>.
- (73) Park, H. Il; Mushtaq, U.; Perello, D.; Lee, I.; Cho, S. K.; Star, A.; Yun, M. Effective and Low-Cost Platinum Electrodes for Microbial Fuel Cells Deposited by Electron Beam Evaporation. *Energy & Fuels* **2007**, *21* (5), 2984–2990.

- <https://doi.org/10.1021/ef070160x>.
- (74) Zhang, P.; Li, K.; Liu, X. Carnation-like MnO<sub>2</sub> Modified Activated Carbon Air Cathode Improve Power Generation in Microbial Fuel Cells. *J. Power Sources* **2014**, *264*, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.04.098>.
- (75) Liu, L.; Xiong, Q.; Li, C.; Feng, Y.; Chen, S. Conversion of Straw to Nitrogen Doped Carbon for Efficient Oxygen Reduction Catalysts in Microbial Fuel Cells. *RSC Adv.* **2015**, *5* (109), 89771–89776. <https://doi.org/10.1039/C5RA15235F>.
- (76) Suntivich, J.; Gasteiger, H. A.; Yabuuchi, N.; Nakanishi, H.; Goodenough, J. B.; Shao-Horn, Y. Design Principles for Oxygen-Reduction Activity on Perovskite Oxide Catalysts for Fuel Cells and Metal–Air Batteries. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (7), 546–550. <https://doi.org/10.1038/nchem.1069>.
- (77) Nourbakhsh, F.; Pazouki, M.; Mohsennia, M. Impact of Modified Electrodes on Boosting Power Density of Microbial Fuel Cell for Effective Domestic Wastewater Treatment: A Case Study of Tehran. *Ranliao Huaxue Xuebao/Journal Fuel Chem. Technol.* **2017**, *45* (7), 871–879. [https://doi.org/10.1016/s1872-5813\(17\)30041-5](https://doi.org/10.1016/s1872-5813(17)30041-5).
- (78) Seyfi, B.; Baghalha, M.; Kazemian, H. Modified LaCoO<sub>3</sub> Nano-Perovskite Catalysts for the Environmental Application of Automotive CO Oxidation. *Chem. Eng. J.* **2009**, *148* (2–3), 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.08.041>.
- (79) Feng, Y.; Yang, Q.; Wang, X.; Logan, B. E. Treatment of Carbon Fiber Brush Anodes for Improving Power Generation in Air-Cathode Microbial Fuel Cells. *J. Power Sources* **2010**, *195* (7), 1841–1844. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.10.030>.
- (80) Chen, W.; Cannon, F. S.; Rangel-Mendez, J. R. Ammonia-Tailoring of GAC to Enhance Perchlorate Removal. I: Characterization of NH<sub>3</sub> Thermally Tailored GACs. *Carbon N. Y.* **2005**, *43* (3), 573–580. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.10.024>.
- (81) Cheng, S.; Logan, B. E. Ammonia Treatment of Carbon Cloth Anodes to Enhance Power Generation of Microbial Fuel Cells. *Electrochem. commun.* **2007**, *9* (3), 492–496. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.10.023>.
- (82) Mohamed, H. O.; Sayed, E. T.; Cho, H.; Park, M.; Obaid, M.; Kim, H. Y.; Barakat, N. A. M. Effective Strategies for Anode Surface Modification for Power Harvesting and Industrial Wastewater Treatment Using Microbial Fuel Cells. *J. Environ. Manage.* **2018**, *206*, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.022>.
- (83) HACH Company. *Oxygen Demand, Chemical*; 2014.
- (84) EPA. METHOD 1684 Total , Fixed , and Volatile Solids in Water , Solids , and Biosolids Draft January 2001 U . S . Environmental Protection Agency Office of Water Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division ( 4303 ). **2001**, No. January, 1–13.
- (85) Thiex, N.; Richardson, C. R. Challenges in Measuring Moisture Content of Feeds. *J. Anim. Sci.* **2003**, *81* (12), 3255–3266. <https://doi.org/10.2527/2003.81123255x>.
- (86) Mertens, D. R.; Allen, M.; Carmany, J.; Clegg, J.; Davidowicz, A.; Drouches, M.; Frank, K.; Gambin, D.; Garkie, M.; Gildemeister, B.; et al. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2002**, *85* (6), 1217–1240.
- (87) AOAC Official Method 973.18. Fiber (Acid Detergent) and Lignin (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in Animal Feed. **2000**, 4–5.
- (88) Tabatabai, M. A. *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*; 1998; Vol. 38. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183x003800060050x>.
- (89) Castro Alvarez, J. Y. Búsqueda de Bacterias Electrogénicas En Celdas de Combustible

- Microbiano a Partir de Miel de Café, Universidad de Costa Rica, 2019.
- (90) Suntivich, J.; Gasteiger, H. A.; Yabuuchi, N.; Shao-Horn, Y. Electrocatalytic Measurement Methodology of Oxide Catalysts Using a Thin-Film Rotating Disk Electrode. *J. Electrochem. Soc.* **2010**, *157* (8), B1263. <https://doi.org/10.1149/1.3456630>.
- (91) Paitier, A.; Godain, A.; Lyon, D.; Haddour, N.; Vogel, T. M.; Monier, J.-M. Microbial Fuel Cell Anodic Microbial Population Dynamics during MFC Start-Up. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *92*, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.096>.
- (92) Braguglia, C. M.; Gallipoli, A.; Gianico, A.; Pagliaccia, P. Anaerobic Bioconversion of Food Waste into Energy: A Critical Review. *Bioresour. Technol.* **2018**, *248*, 37–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.145>.
- (93) Ratzke, C.; Gore, J. Modifying and Reacting to the Environmental PH Can Drive Bacterial Interactions. *PLOS Biol.* **2018**, *16* (3), e2004248. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004248>.
- (94) Soto M., G. Abonos Orgánicos: El Proceso de Compostaje. In *Taller de Abonos Orgánicos*; Meléndez, G., Soto, G., Eds.; Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA): Sabanilla, 2003; pp 1–27.
- (95) Oliveira, V. B.; Simões, M.; Melo, L. F.; Pinto, A. M. F. R. Overview on the Developments of Microbial Fuel Cells. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *73*, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.012>.
- (96) Yang, L.; Li, Y. Anaerobic Digestion of Giant Reed for Methane Production. *Bioresour. Technol.* **2014**, *171*, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.051>.
- (97) Bong, C. P. C.; Lim, L. Y.; Lee, C. T.; Klemeš, J. J.; Ho, C. S.; Ho, W. S. The Characterisation and Treatment of Food Waste for Improvement of Biogas Production during Anaerobic Digestion – A Review. *J. Clean. Prod.* **2018**, *172*, 1545–1558. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.199>.
- (98) Ebadinezhad, B.; Ebrahimi, S.; Shokrkar, H. Evaluation of Microbial Fuel Cell Performance Utilizing Sequential Batch Feeding of Different Substrates. *J. Electroanal. Chem.* **2019**, *836*, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.02.004>.
- (99) Cárdenas López, D. Evaluación de La Generación Eléctrica de Una Celda de Combustible Microbiana Con Electrodo de Grafito Modificado Para El Tratamiento de Agua Miel de Café, Universidad de Costa Rica, 2018.
- (100) Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 90th ed.; Francis, C. P. and, Ed.; Boca Raton, FL, 2010.
- (101) Persson, I. Ferric Chloride Complexes in Aqueous Solution: An EXAFS Study. *J. Solution Chem.* **2018**, *47* (5), 797–805. <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0756-6>.
- (102) Silva, A. M. N.; Kong, X.; Parkin, M. C.; Cammack, R.; Hider, R. C. Iron(III) Citrate Speciation in Aqueous Solution. *Dalt. Trans.* **2009**, No. 40, 8616. <https://doi.org/10.1039/b910970f>.
- (103) Hernández-Fernández, F. J.; Pérez de los Ríos, A.; Salar-García, M. J.; Ortiz-Martínez, V. M.; Lozano-Blanco, L. J.; Godínez, C.; Tomás-Alonso, F.; Quesada-Medina, J. Recent Progress and Perspectives in Microbial Fuel Cells for Bioenergy Generation and Wastewater Treatment. *Fuel Process. Technol.* **2015**, *138*, 284–297. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.05.022>.
- (104) Zhou, M.; Chi, M.; Luo, J.; He, H.; Jin, T. An Overview of Electrode Materials in

- Microbial Fuel Cells. *J. Power Sources* **2011**, *196* (10), 4427–4435. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.01.012>.
- (105) Santamaría Cordero, J. A. Caracterización de La Reducción Fotocatalítica de CO<sub>2</sub> Utilizando Un Catalizador de Perovskita de Bismuto Inmovilizado En Un Microreactor, Universidad de Costa Rica, 2019.
- (106) ElectricFuel. Air Electrode <https://electric-fuel.com/rd/zinc-air/air-electrode/> (accessed Jun 13, 2020).
- (107) Pinto, D.; Coradin, T.; Laberty-Robert, C. Effect of Anode Polarization on Biofilm Formation and Electron Transfer in *Shewanella Oneidensis* /Graphite Felt Microbial Fuel Cells. *Bioelectrochemistry* **2018**, *120*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.10.008>.
- (108) Logan, B. E.; Hamelers, B.; Rozendal, R.; Schröder, U.; Keller, J.; Freguia, S.; Aelterman, P.; Verstraete, W.; Rabaey, K. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology †. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (17), 5181–5192. <https://doi.org/10.1021/es0605016>.
- (109) Pandey, P.; Shinde, V. N.; Deopurkar, R. L.; Kale, S. P.; Patil, S. A.; Pant, D. Recent Advances in the Use of Different Substrates in Microbial Fuel Cells toward Wastewater Treatment and Simultaneous Energy Recovery. *Appl. Energy* **2016**, *168*, 706–723. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.01.056>.

## Anexos

### A. Datos experimentales

Caracterización fisicoquímica del agua residual del procesamiento del café

**Cuadro A. I.** Lectura de DQO de las réplicas del agua del procesamiento del café tamizada y diluida, y patrón diluido.

Réplica	DQO leída ( $\pm 1$ mg/L)
1	1485
2	1486
3	1486
4	1482
Patrón	1521

**Cuadro A. II.** Masa de los crisoles, y masa de la muestra fresca, seca e incineradas para el cálculo de sólidos totales, fijados y volátiles.

Réplica	Masa crisol ( $\pm 0,0001$ g)	Masa crisol + muestra ( $\pm 0,0001$ g)	Masa crisol + muestra seca ( $\pm 0,0001$ g)	Masa crisol + muestra incinerada ( $\pm 0,0001$ g)
1	21,0585	46,0698	22,3210	21,1438
2	29,8754	54,9738	31,1528	29,9645
3	27,0029	52,2441	28,2886	27,0875
4	20,0125	45,1462	21,2954	21,1020

Cálculo de sólidos totales, fijados y volátiles según las siguientes ecuaciones:

$$\% ST = \frac{m_{total} - m_{crisol}}{m_{muestra} - m_{crisol}} * 100$$

$$m_{crisol} = \text{masa crisol (g)}$$

$$m_{muestra} = \text{masa crisol} + \text{muestra fresca (g)}$$

$$m_{total} = \text{masa crisol} + \text{muestra seca (g)}$$

$$\% SF = \frac{m_{final} - m_{crisol}}{m_{total} - m_{crisol}} * 100$$

$$m_{crisol} = \text{masa crisol (g)}$$

$$m_{muestra} = \text{masa crisol} + \text{muestra fresca (g)}$$

$$m_{total} = \text{masa crisol} + \text{muestra seca (g)}$$

$$\% SV = \frac{m_{total} - m_{final}}{m_{total} - m_{crisol}} * 100$$

$$m_{crisol} = \text{masa crisol (g)}$$

$$m_{final} = \text{masa crisol} + \text{muestra incinerada (g)}$$

$$m_{total} = masa\ crisol + muestra\ seca\ (g)$$

Caracterización microbiológica de las bacterias previamente aisladas del agua residual del procesamiento del café

**Cuadro A. III.** Masa medida y volumen agregado para la disolución de fuente de carbono para el cultivo de bacterias.

Compuesto	Masa ( $\pm 0,01$ g)	Volumen ( $\pm 0,5$ mL)
Lactato de sodio	-	11,0
Acetato de sodio	5,13	-
Glucosa	11,20	-

**Cuadro A. IV.** Masa medida de compuesto de hierro(III) para la preparación de disoluciones para el cultivo de bacterias.

Compuesto	Masa ( $\pm 0,0001$ g)
FeCl <sub>3</sub>	0,8125
Fe(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	1,2216

**Cuadro A.V.** Masa medida de óxido de hierro(III) para el cultivo de bacterias.

Réplica	Masa ( $\pm 0,00001$ g)
S1	0,00827
S2	0,00820
S3	0,00802
Control	0,00845
E1	0,00845
E2	0,00842
E3	0,00844
Control	0,00813
L1	0,00817
L2	0,00808
L3	0,00845
Control	0,00829

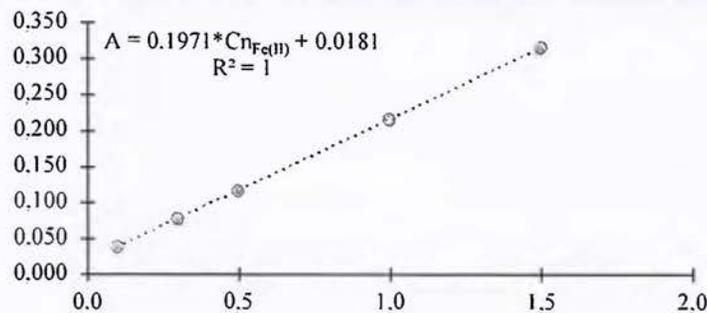
S: *Shewanella oneidensis*.

E: *Enterobacter asburiae*.

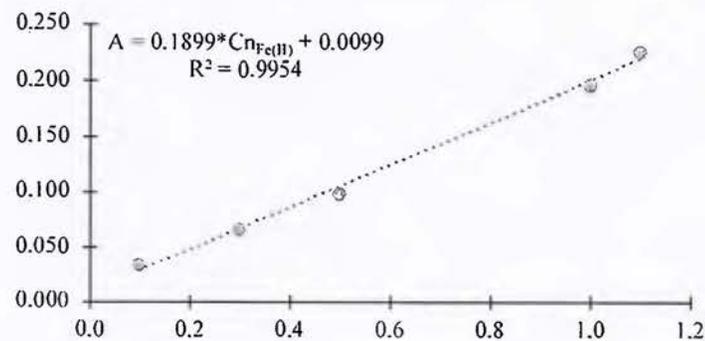
L: *Lactobacillus harbinensis*.

**Cuadro A. VI.** Datos de absorbancia obtenidos a 600 nm para la O.D. y a 510 nm para la cuantificación de Fe(II) con 1,10-fenantrolina en los diferentes medios de cultivos para las diferentes bacterias.

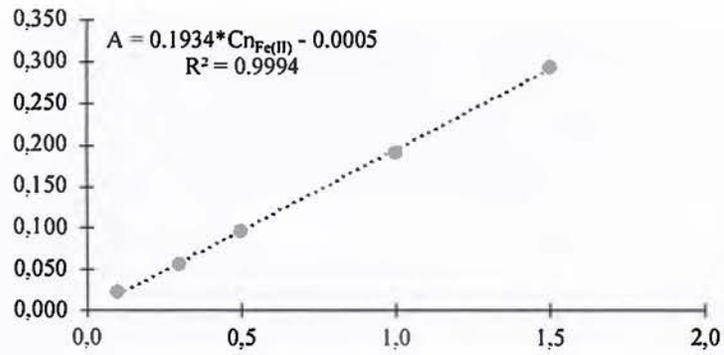
Aceptor de electrones	Réplica	<i>Shewanella oneidensis</i>		<i>Enterobacter asburiae</i>		<i>Lactobacillus harbinensis</i>	
		Absorbancia ( $\pm 0,001$ )					
		A <sub>600</sub>	A <sub>510</sub>	A <sub>600</sub>	A <sub>510</sub>	A <sub>600</sub>	A <sub>510</sub>
FeCl <sub>3</sub>	R1	0,099	0,222	0,105	0,073	0,010	0,011
	R2	0,121	0,119	0,456	0,174	0,010	0,008
	R3	0,056	0,085	0,458	0,097	0,010	-0,001
	<b>Control</b>	<b>0,008</b>	<b>0,026</b>	<b>0,001</b>	<b>0,028</b>	<b>0,003</b>	<b>0,006</b>
Fe(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	R1	0,141	2,921	0,228	0,057	0,010	0,124
	R2	0,167	2,528	0,402	0,050	0,033	0,048
	R3	0,174	2,418	0,264	0,059	0,168	0,015
	<b>Control</b>	<b>0,011</b>	<b>0,025</b>	<b>0,032</b>	<b>0,014</b>	<b>0,001</b>	<b>0,054</b>
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	R1	0,025	0,042	0,492	0,063	0,023	0,005
	R2	0,047	0,050	0,511	0,047	0,077	0,126
	R3	0,031	0,042	0,523	0,074	0,014	0,005
	<b>Control</b>	<b>0,004</b>	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	<b>0,014</b>	<b>0,061</b>



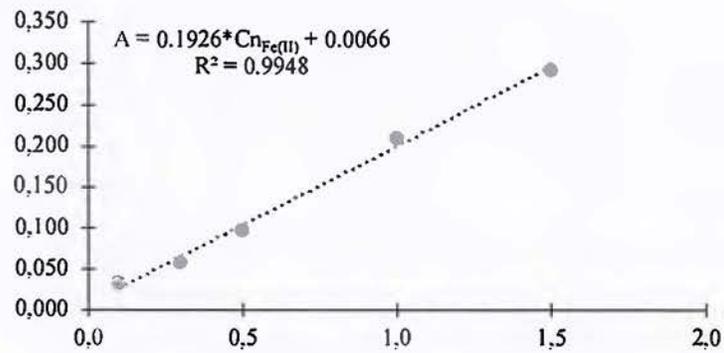
**Figura A. 1.** Curva de calibración de Fe(II) para su cuantificación espectrofotométrica UV-Vis en los medios de cultivos anaerobios (experimento 1).



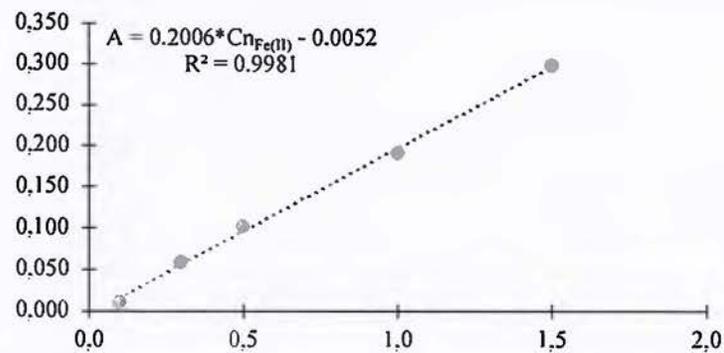
**Figura A. 2.** Curva de calibración de Fe(II) para su cuantificación espectrofotométrica UV-Vis en los medios de cultivos anaerobios (experimento 2).



**Figura A. 3.** Curva de calibración de Fe(II) para su cuantificación espectrofotométrica UV-Vis en los medios de cultivos anaerobios (experimento 3).



**Figura A. 4.** Curva de calibración de Fe(II) para su cuantificación espectrofotométrica UV-Vis en los medios de cultivos anaerobios (experimento 4).



**Figura A. 5.** Curva de calibración de Fe(II) para su cuantificación espectrofotométrica UV-Vis en los medios de cultivos anaerobios (experimento 5).

**Cuadro A. VII.** Densidad óptica (O.D.) y contenido de Fe<sup>2+</sup> reducido por las diferentes bacterias en el medio de cultivo anaerobio con disolución receptora de electrones de cloruro de hierro(III).

Aceptor de electrones	Réplica	<i>Shewanella oneidensis</i>		<i>Enterobacter asburiae</i>		<i>Lactobacillus harbinensis</i>	
		O.D.	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)	O.D.	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)	O.D.	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)
FeCl <sub>3</sub>	R1	0,099	1,616	0,105	0,435	0,010	0,124
	R2	0,121	0,800	0,456	1,236	0,010	0,101
	R3	0,056	0,530	0,458	0,625	0,010	0,031
	<b>Control</b>	<b>0,008</b>	<b>0,063</b>	<b>0,001</b>	<b>0,078</b>	<b>0,003</b>	<b>0,086</b>

**Cuadro A. VIII.** Densidad óptica (O.D.) y contenido de Fe<sup>2+</sup> reducido por las diferentes bacterias en el medio de cultivo anaerobio con disolución receptora de electrones de citrato de hierro(III).

Aceptor de electrones	Réplica	<i>Shewanella oneidensis</i>		<i>Enterobacter asburiae</i>		<i>Lactobacillus harbinensis</i>	
		O.D.	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)	O.D.	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)	O.D.	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)
Fe(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	R1	0,141	23,652	0,228	0,387	0,124	0,947
	R2	0,167	13,106	0,402	0,329	0,033	0,412
	R3	0,174	20,045	0,264	0,403	0,168	0,065
	<b>Control</b>	<b>0,011</b>	<b>0,123</b>	<b>0,032</b>	<b>0,033</b>	<b>0,001</b>	<b>0,318</b>

**Cuadro A. IX.** Densidad óptica (O.D.) y contenido de Fe<sup>2+</sup> reducido por las diferentes bacterias en el medio de cultivo anaerobio con sólido receptor de electrones de óxido de hierro(III).

Aceptor de electrones	Réplica	<i>Shewanella oneidensis</i>		<i>Enterobacter asburiae</i>		<i>Lactobacillus harbinensis</i>	
		O.D.	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)	O.D.	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)	O.D.	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	R1	0,025	0,344	0,492	0,514	0,023	0,078
	R2	0,047	0,409	0,511	0,385	0,077	1,018
	R3	0,031	0,344	0,523	0,603	0,014	0,078
	<b>Control</b>	<b>0,004</b>	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	<b>0,014</b>	<b>0,513</b>

Estudio del correcto funcionamiento del ánodo y cátodo en una Celda de Combustible Microbiano (CCM) con cátodo al aire

**Cuadro A. X.** Masa del electrodo de tela de carbono antes y después de la modificación con catalizador tipo perovskita para determinar la proporción de catalizador depositada sobre el electrodo.

Electrodo	Masa electrodo antes de la modificación ( $\pm 0,0001$ g)	Masa electrodo después de la modificación ( $\pm 0,0001$ g)
1	0,21722	0,21929
2	0,21714	0,21937
3	0,21262	0,21451

**Cuadro A. XI.** Muestra de los datos de voltaje máximo recolectados con multímetro Fluke® 289 en una CCE con doble cámara  $Fe^{2+}/Br_2$ .

Tiempo ( $\pm 1$ h)	Voltaje ( $\pm 0,01$ mV)		
	R1	R2	R3
0	63,49	90,59	75,99
1	143,67	229,53	212,53
2	219,56	296,87	316,80
3	246,67	296,87	362,29
4	278,81	334,70	<b>379,49</b>
5	<b>280,53</b>	338,39	373,47
6	277,02	<b>344,61</b>	368,75
7	267,97	335,25	344,98
8	268,56	314,71	330,89
9	271,83	314,80	327,48
10	276,73	294,13	306,02
11	269,05	262,31	277,90
12	278,08	224,35	233,51

**Cuadro A. XII.** Muestra de los datos de voltaje máximo recolectados con multímetro Fluke® 289 en una CCE con doble cámara  $Fe^{2+}/O_2$ .

Tiempo ( $\pm 1$ h)	Voltaje ( $\pm 0,001$ mV)		
	R1	R2	R3
0	0,791	0,777	0,656
1	2,077	1,930	2,177
2	2,609	2,484	2,395
3	2,752	2,720	2,464
4	2,874	2,797	2,507

5	2,987	2,881	2,492
6	3,171	2,934	2,492
7	3,234	2,969	2,533
8	3,371	2,981	2,532
9	3,217	2,965	2,551
10	3,323	3,045	2,581
11	3,371	3,092	2,581
12	3,494	3,124	2,458
13	3,604	3,084	2,497
14	3,632	3,033	2,666
15	3,582	3,153	2,764
16	3,534	3,244	2,803
17	3,617	3,307	2,844
18	3,713	3,296	2,947
19	3,675	3,349	3,064
20	3,651	3,499	3,274
21	3,827	3,675	3,463
22	3,970	3,818	3,689
23	4,089	3,943	3,748
24	4,095	4,034	3,777
25	4,220	4,177	3,963
26	4,470	4,298	4,182
27	<b>4,550</b>	4,310	<b>4,351</b>
28	4,409	4,345	4,337
29	4,246	<b>4,358</b>	3,952

**Cuadro A. XIII.** Muestra de los datos de voltaje máximo recolectados con multímetro Fluke® 289 en una CCE con cátodo al aire modificado con  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$ ,  $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ .

Tiempo ( $\pm 1$ h)	Voltaje ( $\pm 0,001$ mV)		
	R1	R2	R3
0	0,930	0,925	0,965
1	<b>2,420</b>	1,759	1,785
2	1,248	1,718	1,840
3	1,960	1,688	1,689
4	1,980	1,656	1,555
5	1,990	1,504	1,548
6	1,690	1,431	1,630
7	1,900	1,422	1,710
8	1,630	1,390	1,363

9	1,780	1,487	1,940
10	0,961	1,307	1,900
11	0,896	1,376	1,920
12	0,972	<b>1,990</b>	1,900
13	0,966	0,910	<b>1,990</b>
14	0,873	0,967	1,900
15	0,873	1,590	1,480
16	0,901	1,800	1,340
17	0,891	1,880	1,283
18	0,962	1,880	1,750
19	0,999	1,880	1,276
20	0,942	1,620	1,328
21	0,878	0,939	1,990
22	0,873	1,590	1,900
23	0,901	1,800	1,480
24	0,891	1,790	1,252
25	0,962	1,880	1,750
26	0,999	1,520	1,308
27	0,942	1,800	1,328
28	0,921	1,620	1,256
29	0,891	1,880	1,283

**Cuadro A. XIV.** Muestra de los datos de voltaje máximo recolectados con multímetro Fluke® 289 en una CCE con cátodo al aire (electrodo comercial),  $Fe^{2+}/O_2$ .

Tiempo ( $\pm 1$ h)	Voltaje ( $\pm 0,01$ mV)		
	R1	R2	R3
0	18,70	9,38	0,58
1	31,42	19,42	37,60
2	29,92	44,54	72,01
3	105,03	101,65	86,95
4	158,76	124,39	97,10
5	164,08	127,45	100,34
6	166,12	<b>134,03</b>	103,84
7	174,01	132,70	<b>108,55</b>
8	<b>181,68</b>	132,19	104,60
9	179,66	131,25	102,04
10	2,35	43,43	85,90

**Cuadro A. XV.** Muestra de los datos de voltaje máximo recolectados con multímetro Fluke® 289 en una CCM con doble cámara inoculada con *Shewanella oneidensis* empleando como ánodo cepillo de carbono con y sin tratamiento de NH<sub>3</sub>.

Tiempo (± 1 h)	Voltaje (± 0,001 mV)					
	Con tratamiento			Sin tratamiento		
	R1	R2	Control	R1	R2	Control
0	0,041	0,037	0,000	0,000	0,022	0,000
24	0,147	0,186	-0,009	0,054	0,055	-0,006
48	0,166	0,195	-0,010	0,102	0,055	-0,003
72	<b>0,325</b>	0,336	-0,005	<b>0,168</b>	0,124	-0,003
96	0,300	<b>0,390</b>	-0,006	0,080	<b>0,187</b>	-0,003

**Cuadro A. XVI.** Muestra de los datos de voltaje máximo recolectados con multímetro Fluke® 289 en una CCM con doble cámara inoculada con *Enterobacter asburiae* empleando como ánodo cepillo de carbono con y sin tratamiento de NH<sub>3</sub>.

Tiempo (± 1 h)	Voltaje (± 0,001 mV)					
	Con tratamiento			Sin tratamiento		
	R1	R2	Control	R1	R2	Control
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	0,013	0,014	-0,001	0,014	0,014	-0,007
48	<b>0,023</b>	<b>0,019</b>	-0,005	<b>0,017</b>	<b>0,015</b>	-0,006
72	0,012	0,012	-0,003	0,008	0,008	-0,001
96	0,009	0,010	0,000	0,006	0,007	-0,004

Desempeño de una Celda de Combustible Microbiano con cátodo al aire en el tratamiento del agua residual del procesamiento del café

**Cuadro A. XVII.** Muestra de los datos de voltaje máximo recolectados con multímetro Fluke® 289 en una CCM con cátodo al aire (electrodo control) y cepillo de carbono con tratamiento de NH<sub>3</sub> como ánodo empleando agua residual del procesamiento del café como sustrato.

Tiempo (± 1h)	Voltaje (± 0,001 mV)	
	R1	R2
0	1,428	1,863
6	1,536	1,863
12	1,504	1,780
18	1,694	1,790
24	2,690	1,565

30	2,990	2,530
36	2,880	2,862
42	2,560	2,985
48	1,862	2,755
54	2,009	2,940
60	1,879	2,850
66	1,781	2,600
72	1,723	1,975
78	1,742	1,988
84	1,740	1,998
90	1,741	2,050
96	1,742	2,034
102	1,742	2,080
108	1,741	2,200
114	1,700	1,857
120	1,653	1,758

**Cuadro A. XVIII.** Lectura de DQO de las réplicas del agua del procesamiento del café tamizada y diluida antes y después de su tratamiento en una CCM con cátodo al aire, y patrón diluido.

Réplica	DQO leída antes ( $\pm 1$ mg/L)			DQO leída después ( $\pm 1$ mg/L)		
	M1	M2	Patrón	M1	M2	Patrón
1	1101	1114	1449	830	744	1424
2	1121	1084	1424	821	774	1423

**Cuadro A. XIX.** Cálculo de la eficiencia coulombica de una CCM con cátodo al aire empleando agua residual del procesamiento del café como sustrato.

R	DQO <sub>i</sub> (mg/L)	DQO <sub>r</sub> (mg/L)	$\Delta$ DQO (g/L)	AUC <sub>cal</sub> (mV*h)	$\int idt$ (C)	V <sub>an</sub> (L)	F (C/mol)	k (g/mol)	CE (%)
1	27688	19675	8,013	232,779	16,76	0,100	96485	8	0,173
2	27563	19938	7,625	267,015	19,22				0,209

Cálculo del área bajo la curva por medio del software Matlab®

```
Y = [1.428 1.536 1.504 1.694 2.690 2.990 2.880 2.560 1.862 2.009 1.879
1.781 1.723 1.742 1.740 1.741 1.742 1.742 1.741 1.700 1.653]
X = [0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72 78 84 90 96 102 108 114 120]
figure
plot(X,Y,'-*')
grid on
title('Generación')
xlabel('Time (h)')
```

```

ylabel('Voltaje (mV)')
AUC = trapz(X,Y)
Y =
1.4280    1.5360    1.5040    1.6940    2.6900    2.9900    2.8800
2.5600    1.8620    2.0090    1.8790    1.7810    1.7230    1.7420
1.7400    1.7410    1.7420    1.7420    1.7410    1.7000    1.6530
X =
0     6    12    18    24    30    36    42    48    54    60    66    72
78    84    90    96    102   108   114   120
AUC =
232.7790
Y = [1.863 1.863 1.780 1.790 1.565 2.530 2.862 2.985 2.755 2.940
2.850 2.600 1.975 1.988 1.988 2.050 2.034 2.080 2.200 1.857 1.758]
X = [0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72 78 84 90 96 102 108 114
120]
figure
plot(X,Y,'-*')
grid on
title('Generación')
xlabel('Time (h)')
ylabel('Voltaje (mV)')
AUC = trapz(X,Y)
Y =
1.8630    1.8630    1.7800    1.7900    1.5650    2.5300    2.8620
2.9850    2.7550    2.9400    2.8500    2.6000    1.9750    1.9880
1.9880    2.0500    2.0340    2.0800    2.2000    1.8570    1.7580
X =
0     6    12    18    24    30    36    42    48    54    60    66
72    78    84    90    96    102   108   114   120
AUC =
267.0150

```

**Cuadro A. XX.** Cálculo de la densidad de corriente máxima para las diferentes configuraciones de celdas para establecer las condiciones de trabajo adecuadas para el correcto funcionamiento de una CCM con cátodo al aire.

Celda	V <sub>máx.</sub> (mV)	R (Ω)	i <sub>máx</sub> (mA)	A (m <sup>2</sup> )	Densidad de corriente (μA/cm <sup>2</sup> )
CCE DC1	4,351	50	0,087	12.6	6,91
CCE DC2	4,550		0,091		7,22
CCE DC3	4,358		0,087		6,92
CCE CA1*	181,68		3,634	4,5	807,5
CCE CA2*	134,03		2,681		595,7
CCE CA3*	108,55		2,171		482,4
CCE CA1	1,990		0,040		8,84

CCE CA2	2,420		0,048		10,76
CCE CA3	1,990		0,040		8,84
CCM S1 CT	0,325		0,007	12,6	0,52
CCM S2 CT	0,390		0,008		0,62
CCM E1 CT	0,023		0,000		0,04
CCM E2 CT	0,019		0,000		0,03
CCM S1 ST	0,168		0,003		0,27
CCM S2 ST	0,187		0,004		0,30
CCM E1 ST	0,017		0,000		0,03
CCM E2 ST	0,015		0,000		0,02
CCM AM1	2,990		0,060	4,5	13,29
CCM AM2	2,985		0,000		13,27

DC: Configuración doble cámara Fe<sup>2+</sup>//O<sub>2</sub>.

CA\*: Configuración con cátodo al aire, electrodo de aire.

CA: Configuración con cátodo al aire, tela de carbono modificado con perovskita.

S: *Shewanella oneidensis*.

E: *Enterobacter asburiae*.

CT: Con tratamiento de NH<sub>3</sub>.

ST: Sin tratamiento de NH<sub>3</sub>.

## B. Imágenes de los ensayos

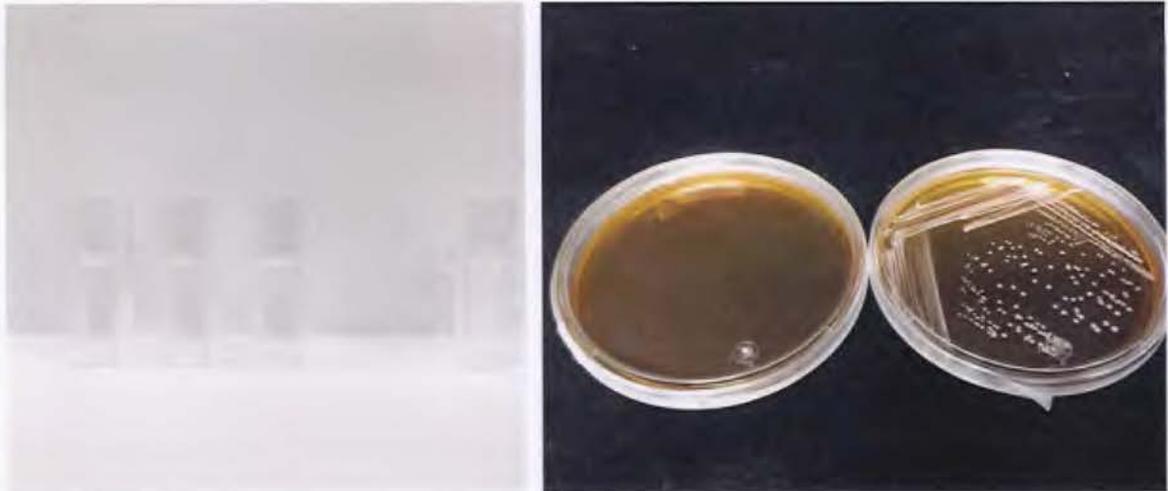
Rayado de las bacterias en medio sólido puro (AN y MRS) luego del estudio de la ruta extracelular de transferencia directa de los electrones



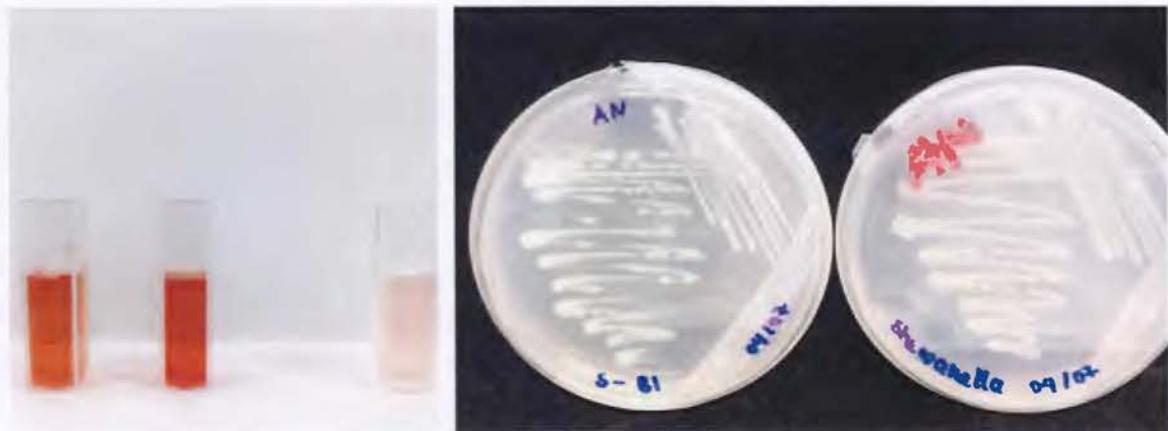
**Figura B. 1.** Cuantificación de Fe(II) en medio mínimo con  $\text{FeCl}_3$  empleando *Shewanella oneidensis* como inóculo.



**Figura B. 2.** Cuantificación de Fe(II) en medio mínimo con  $\text{FeCl}_3$  empleando *Enterobacter asburiae* como inóculo.



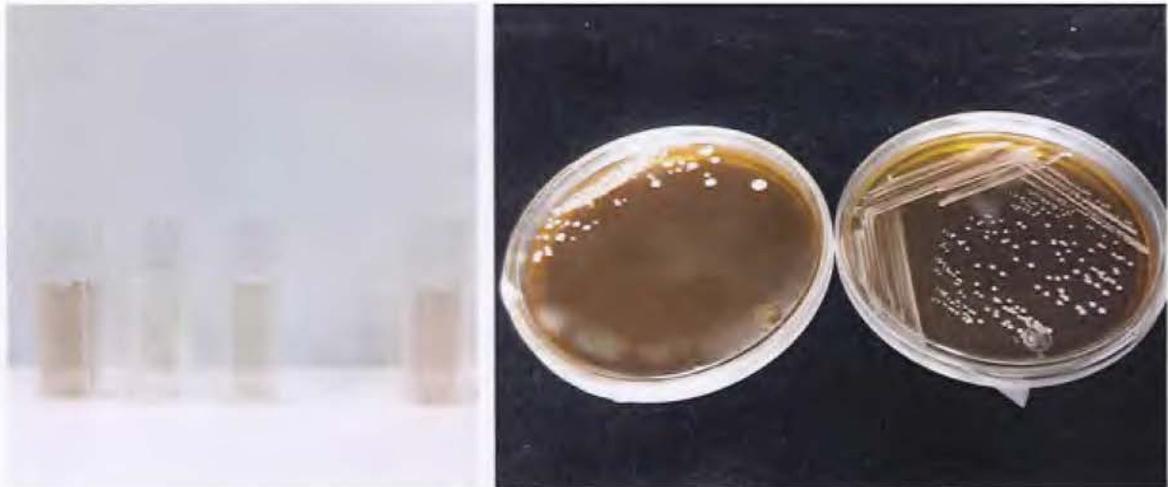
**Figura B. 3.** Cuantificación de Fe(II) en medio mínimo con  $\text{FeCl}_3$  empleando *Lactobacillus harbinensis* como inóculo.



**Figura B. 4.** Cuantificación de Fe(II) en medio mínimo con  $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$  empleando *Shewanella oneidensis* como inóculo.



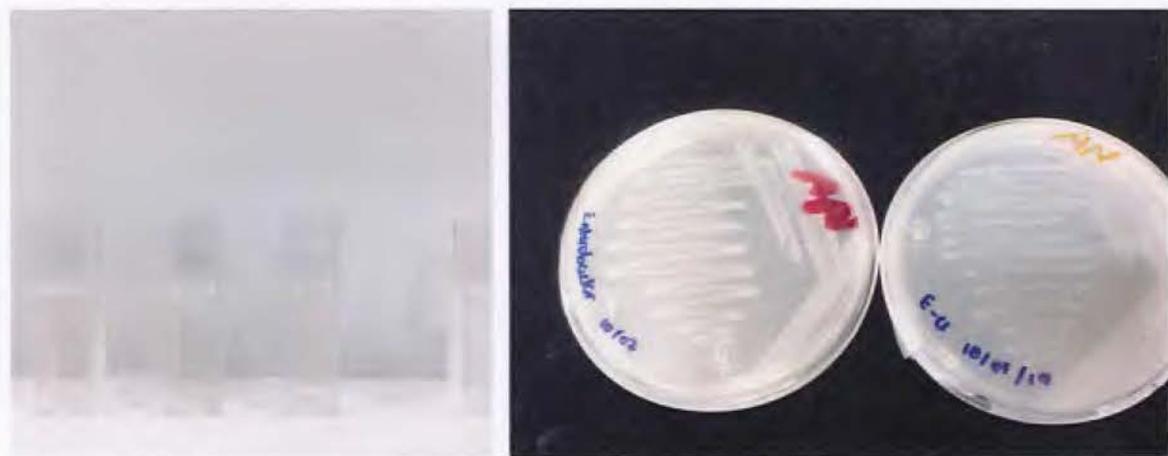
**Figura B. 5.** Cuantificación de Fe(II) en medio mínimo con  $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$  empleando *Enterobacter asburiae* como inóculo.



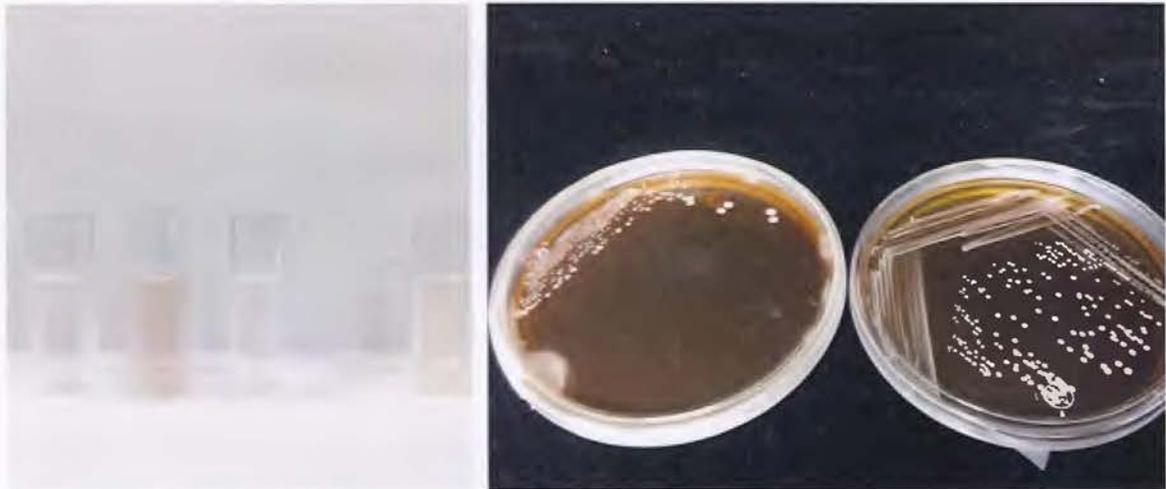
**Figura B. 6.** Cuantificación de Fe(II) en medio mínimo con  $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$  empleando *Lactobacillus harbinensis* como inóculo.



**Figura B. 7.** Cuantificación de Fe(II) en medio mínimo con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  empleando *Shewanella oneidensis* como inóculo.

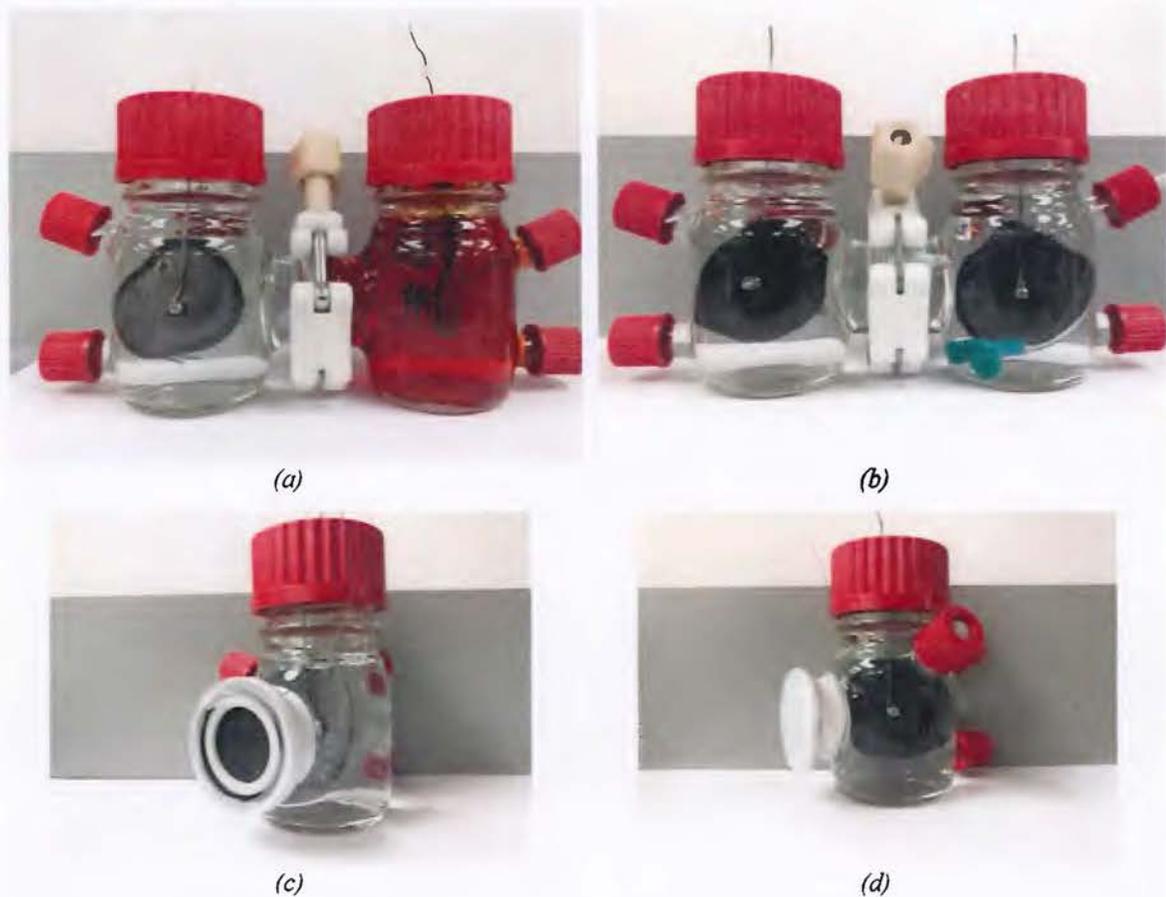


**Figura B. 8.** Cuantificación de Fe(II) en medio mínimo con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  empleando *Enterobacter asburiae* como inóculo.

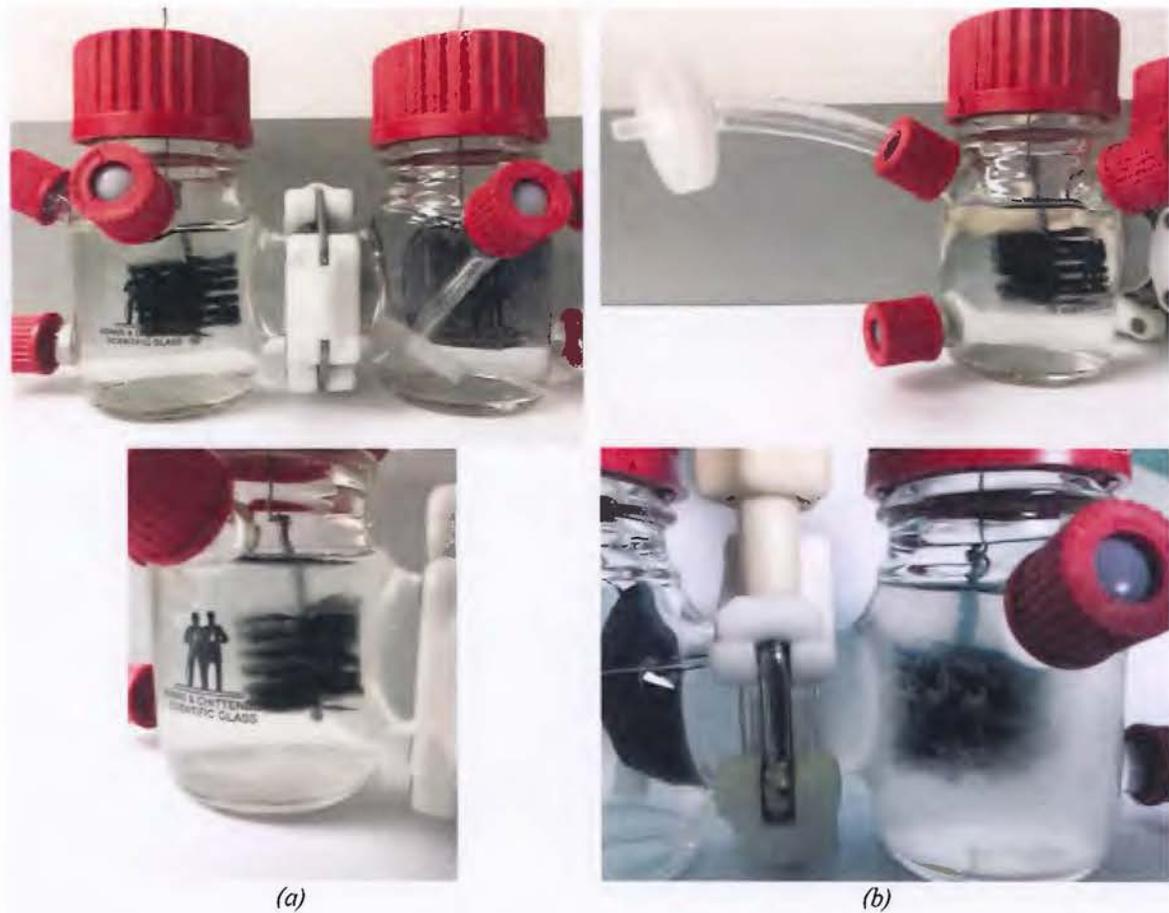


**Figura B. 9.** Cuantificación de Fe(II) en medio mínimo con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  empleando *Lactobacillus harbinensis* como inóculo.

Ensamblaje de las CCE y CCM para el estudio del correcto funcionamiento de la cámara catódica y anódica



**Figura B. 10.** Ensamblaje de celdas: (a) CCE con doble cámara  $\text{Fe}^{2+}/\text{Br}_2$ , (b) CCE con doble cámara  $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ , (c) CCE con cátodo al aire modificado y (d) CCE con cátodo al aire control.



**Figura B. 11.** Ensamblaje de una CCM con doble cámara inoculada con: (a) *S. oneidensis* y (b) *E. asburiae*.

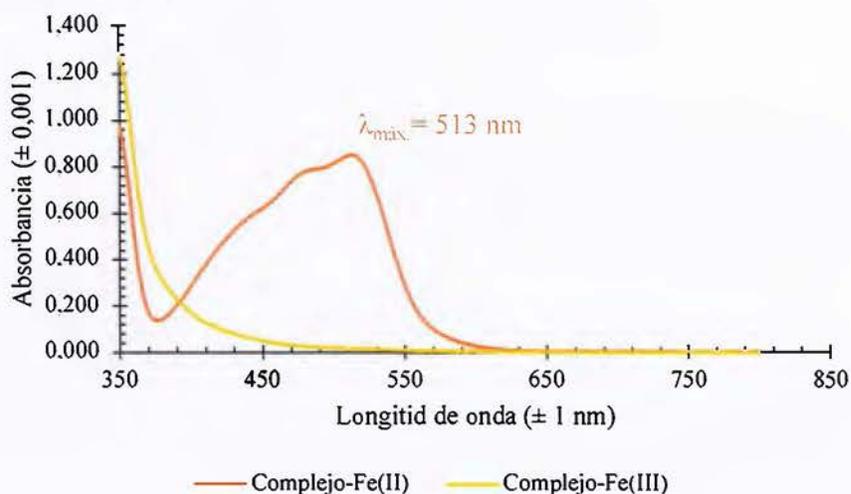
Ensamblaje de las CCM para el uso de una CCM en el tratamiento del agua residual del procesamiento de café



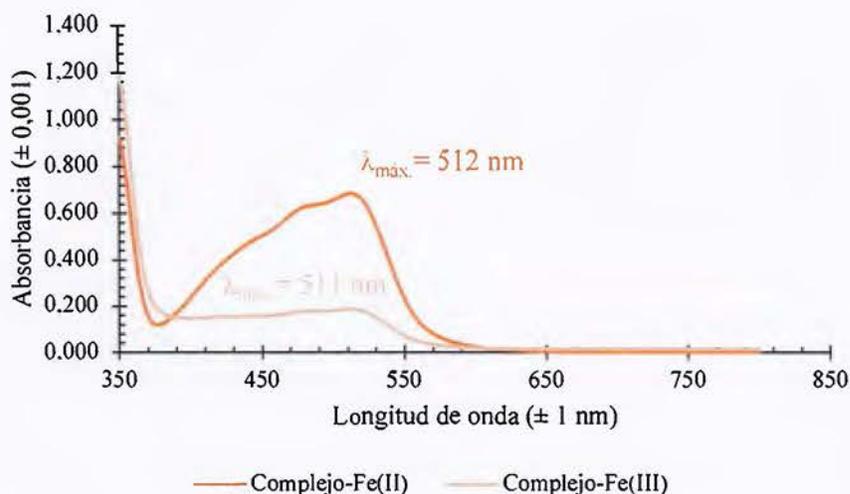
**Figura B. 12.** Ensamblaje de CCM con cátodo al aire empleando agua residual del procesamiento del café como sustrato (antes y después de operación).

## C. Pruebas

Prueba que descarta interferencia del complejo Fe(III) con 1,10-ortofentrolina en la cuantificación de Fe(II)



**Figura C. 1.** Espectro de absorción del complejo formado entre la disolución de cloruro de hierro(III) con una concentración de 4,5 mg/L y 1,10-fenantrolina, reducido con cloruro de hidroxilamina y el complejo sin reducir.



**Figura C. 2.** Espectro de absorción del complejo formado entre la disolución de citrato de hierro(III) con una concentración de 4,5 mg/L y 1,10-fenantrolina, reducido con cloruro de hidroxilamina y el complejo sin reducir.

Estudio de la utilización acetoniitrilo y DMSO para disolver el catalizador y recubrir electrodos de fieltro de carbono y tela de carbono a partir de una disolución del catalizador

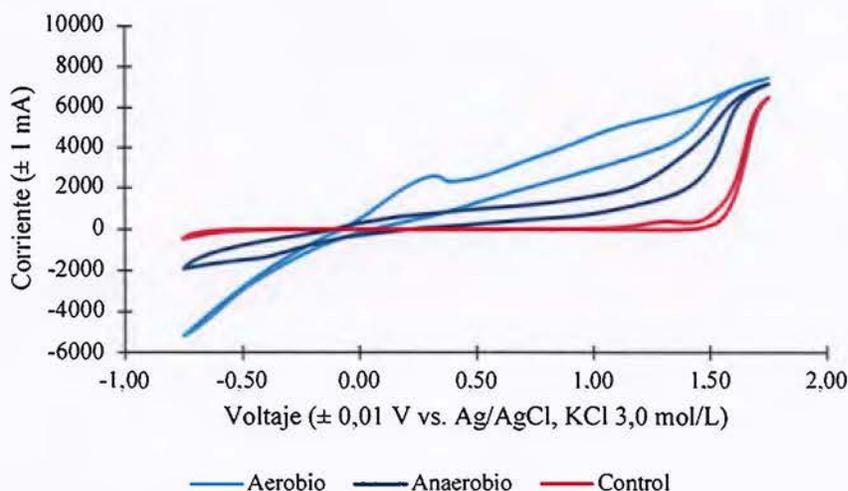
**Cuadro C. I.** Estudio de la utilización de hexano, acetona, acetoniitrilo y DMSO para disolver los catalizadores tipo perovskita para recubrir los electrodos de tela de carbono y fieltro de carbono de una CCM.

Perovskita	Disolvente			
	Hexano	Acetona	Acetoniitrilo	DMSO
$\text{Cs}_4\text{CuBi}_2\text{Cl}_{12}$	In	In	In	S
$\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$	In	In	In	S

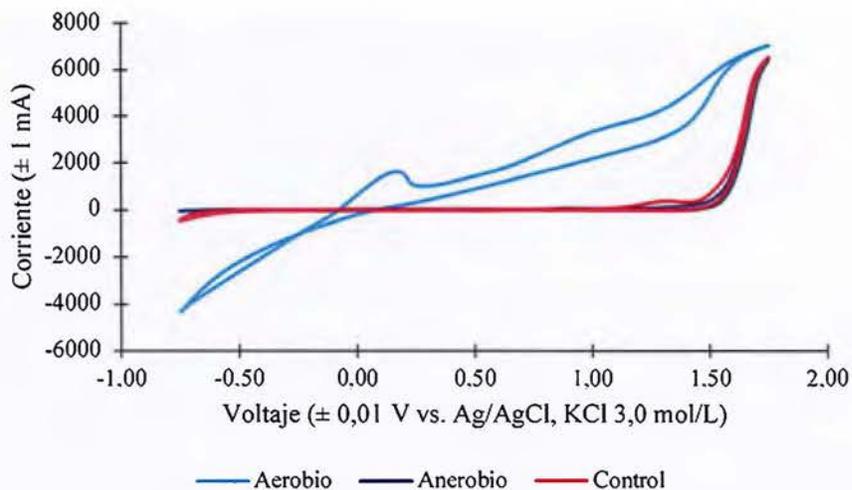
*In: insoluble.*

*S: parcialmente soluble.*

Voltametría cíclica del electrodo de fieltro de carbono modificado con catalizador tipo perovskita de doble capa.



**Figura C. 3.** Voltametría cíclica vs. (Ag/AgCl) de un electrodo de tela de carbono empleando PBS (pH = 6,67 y 0,1/1,5 mol/L) como electrolito soporte y velocidad de barrido de 100 mV/s: (a) electrodo modificado perovskita  $\text{Cs}_4\text{NiBi}_2\text{Cl}_{12}$  aireado, (b) electrodo modificado con perovskita  $\text{Cs}_4\text{CuBi}_2\text{Cl}_{12}$  con purga de nitrógeno y (c) electrodo sin modificar.



**Figura C. 4.** Voltametría cíclica vs. (Ag/AgCl) de un electrodo de tela de carbono empleando PBS (pH = 6,67 y 0,1/1,5 mol/L) como electrolito soporte y velocidad de barrido de 100 mV/s: (a) electrodo modificado perovskita Cs<sub>4</sub>CuBi<sub>2</sub>Cl<sub>12</sub> aireado, (b) electrodo modificado con perovskita Cs<sub>4</sub>CuBi<sub>2</sub>Cl<sub>12</sub> con purga de nitrógeno y (c) electrodo sin modificar.

Rayado de bacteria en medio sólido contaminado



**Figura C. 5.** Ejemplo de un rayado de bacteria en plato AN contaminado para diferenciar entre un plato rayado correctamente.

## D. Documentos adjuntos

### Ensayos físicoquímicos realizados en el CIA



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

CIA Centro de  
Investigaciones  
Agronómicas

CIUDAD DE LA INVESTIGACIÓN  
LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES

#### REPORTE DE ENSAYO

RE-R01 (V2)

Nº DE REPORTE: **70446**

USUARIO: LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
SUBCLIENTE: TESIS RICARDO VILLEGAS (joserikardo.villegas@ucr.ac.cr)  
RESPONSABLE: LIDIETH URIBE  
CORREO: lidieth.uribe@ucr.ac.cr  
TELÉFONO: 2511-2077

PROVINCIA: SAN JOSE  
CANTÓN: MONTES DE OCA  
LOCALIDAD: SABANILLA  
CULTIVO: SIN CULTIVO

ANÁLISIS: QC  
FECHA RECEPCIÓN: 22/03/2019  
EMISIÓN DE REPORTE: 09/04/2019  
Nº DE MUESTRAS TOTAL: 1  
PÁGINA: 1/1

#### ANÁLISIS QUÍMICO DE ABONOS ORGÁNICOS LÍQUIDOS

ID USUARIO	IDLAB	% masa						mg/kg					pH	mS/cm CE	g/mL Dens
		N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B			
LIQ: MUESTRA FILTRADO 27X12 AM - 1902	AO-19-00181	0.06	0.13	0.02	ND	0.13	0.01	1	1	1	2	1	4.1	3.87	1.02

-----ÚLTIMA LÍNEA-----

ND= No detectado.

B.G. Marjanela Blanco M.  
N.I. 2468  
Gestoría de Calidad

Ing. Agr. Michael González A.  
N.I. 7827  
Gestoría Técnica

1. Las unidades están expresadas en masa/masa. Para convertirlas a masa/volumen hay que multiplicar por la densidad. 2. Procedimiento: N por digestión húmeda con Ácido Sulfúrico y determinación Colorimétrica en el Analizador de Inyección de Flujo (FIA) y el resto por digestión con HNO<sub>3</sub> y determinación por Espectrofotometría de Emisión Atómica con Plasma. Molibdeno (Mo) por Espectrometría de masas con Plasma. 3. La muestra es tomada por el interesado y no se custodia. Después de ejecutado el análisis se desecha. 6. El Reporte de Ensayo válido es el original firmado, cuando el usuario solicita el envío del reporte por fax o por correo el Laboratorio no se hace responsable de su confidencialidad.



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

CIUDAD DE LA INVESTIGACIÓN  
LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES  
**REPORTE DE ENSAYO**  
RE-R01 (V2)

CIA Centro de  
Investigaciones  
Agronómicas



Laboratorio de Ensayo  
Alcance de Acreditación N°: LE-033  
Acreditado a partir de: 12.06.2006  
Alcance disponible en [www.eca.or.cr](http://www.eca.or.cr)

N° DE REPORTE: **70976**  
USUARIO: LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
SUBCLIENTE: TESIS RICARDO VILLEGAS ([josecarido.villegas@ucr.ac.cr](mailto:josecarido.villegas@ucr.ac.cr))  
RESPONSABLE: AARON FAJARDO  
CORREO: [fidieth.unbe@ucr.ac.cr](mailto:fidieth.unbe@ucr.ac.cr)  
TELÉFONO: 2511-2077

PROVINCIA: SAN JOSE  
CANTÓN: MONTE S DE OCA  
LOCALIDAD: SABANILLA  
CULTIVO: ABONO SOLIDO

ANÁLISIS: CN  
FECHA RECEPCIÓN: 17/05/2019  
EMISIÓN DE REPORTE: 24/05/2019  
N° DE MUESTRAS TOTAL: 1  
PÁGINA: 1/1

ANÁLISIS QUÍMICO DE ABONOS ORGÁNICOS				
ID USUARIO	IDLAB	%		Relación
		N*	C**	C/N**
SOL: MUESTRA AGUA MIEL CAFE	AO-19-00305	1.43	41.54	29.0

.....ÚLTIMA LÍNEA.....

Nota: - El % C y N totales se determinaron con el Autoanálizador de C/N por combustión seca. Los valores de % C total correlacionan muy bien ( $R^2 \geq 0,95$ ) con el % de MO. Si quiere estimar el valor del % MO a partir del dato de % C total determinado con esta metodología, multiplique el % C total por 1,43.

OBSERVACIÓN: \*ENSAYO ACREDITADO, ver alcance en [www.eca.or.cr](http://www.eca.or.cr) \*\*ENSAYO NO ACREDITADO

B.Q. Mariela Blanco M.  
N.I. 2468  
Gestoría de Calidad

Ing. Agr. Michael González A.  
N.I. 7827  
Gestoría Técnica

1. Las unidades están expresadas en base seca, en masa/masa 2. Procedimiento: en sólido, N por combustión seca en Autoanálizador de acuerdo al M-N; y en líquidos por digestión húmeda; P, Ca, Mg, K, S, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Al por digestión húmeda con HNO<sub>3</sub> y determinación por Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma (ICP) de acuerdo al M-ICP 3. El muestreo es responsabilidad del usuario. 4. Los resultados se refieren únicamente a las muestras ensayadas. 5. El tiempo de custodia de las muestras es de 45 días a partir del ingreso de la muestra. 6. El Reporte de Ensayo con validez legal es el original firmado y sellado que se imprime a solicitud expresa del usuario; cuando el usuario solicita el envío del reporte por correo electrónico se fax libera al Laboratorio de resguardar la integridad

## Ensayos fisicoquímicos realizados en el CINA

	<b>UNIVERSIDAD DE COSTA RICA</b> Centro de Investigación en Nutrición Animal Teléfono (506) 2511-2049 ó (506)2511-2055. Fax: 2234-2415 Ciudad de la Investigación, Sabanita, Montes de Oca, San José, Costa Rica	
	Código: R-TE-18	<b>INFORME DE ENSAYO</b>

INFORMACIÓN GENERAL DE LA SOLICITUD		
N° Contrato	Fecha de recepción de muestras:	Tipo de cliente:
GE-8754	03-07-2019 14.07:26	Particular

INFORMACIÓN GENERAL DEL CLIENTE
Nombre de la empresa: UCR / Proyecto 804-B8-265
Nombre Solicitante: Jose Ricardo Villegas
Teléfono: 8316-7705
Dirección: San Jose
Correo Electrónico: josevillegas1306@gmail.com

INFORMACIÓN GENERAL DE LA(S) MUESTRA(S)
Tipo de muestra: Líquido con sólido suspendido
Nombre o descripción del producto: Agua miel de café
Presentación de la muestra: botella plástica 1.5L
Fecha de toma de la muestra(s): 19-2-19
Proceso de elaboración: líquido
Parte de la planta/animal que compone: N.A.
Procedencia Geográfica: San José-Tarrazú-San Marcos
Importado de: NO
Elaborado por: Coopetarrazú R.L.
Forma de muestreo utilizada: no indica

- El muestreo es responsabilidad del cliente y los resultados en este informe se refieren únicamente a las muestras ensayadas.
- Los resultados químicos se reportan utilizando un factor de cobertura  $k=2$  y una probabilidad de cobertura de 95% y corresponde al método de ensayo utilizado.
- La incertidumbre se expresa de forma relativa o como un intervalo de confianza y reflejan la precisión del muestreo.
- Para el análisis de energía bruta el factor de conversión de 4,184 J/kcal.
- El método de Eschencha col por NMP detecta las cepas indol positivas (95 %)
- Documento no válido sin firmas originales.
- Luego de tres meses se desecharán los informes de ensayo que no hayan sido retirados por el cliente. (El periodo será contado a partir del día en que se informe al cliente la emisión del ensayo)
- Cualquier copia parcial de este documento invalida los resultados presentados en él.
- Se conserva una muestra de respaldo por 3 meses.
- Cualquier duda o consulta sobre los resultados emitidos, por favor comuníquese con servicio al cliente 2511-2049 o 2511-2055.

**RESULTADOS DE LOS ENSAYOS**

Página # 1

Contrato # GE-8754

Únicamente los análisis acreditados se muestran en color verde. Ver alcance de acreditación en [www.eca.or.cr](http://www.eca.or.cr)

Cuando se reporten resultados en base fresca y seca, se muestran entre paréntesis redondos y cuadrados respectivamente. En caso contrario, se reporta solamente un dato entre paréntesis redondos correspondiente al valor tal como ofrecido

Muestra: GE-8754-1 ( aguas mieles de café )			
Fecha de resultados:	Laboratorio:	Análisis:	Resultado:
2019-07-15 10:25:11	Química	Humedad por Liofilización (1)	(79,4 ± 0,5 (20,65 ± 0,14) ) g/100 g
2019-07-17 11 56:24	Bromatología	Lignina Detergente Ácido (2)	(1,78 ± 0,25) g/100 g [8,6 ± 1,2] g/100 g
2019-07-11 10 58:41	Bromatología	Fibra Detergente Neutro (3)	(11,2 ± 0,3) g/100 g [54,1 ± 1,3] g/100 g
2019-07-15 10:16:11	Bromatología	Fibra Detergente Ácida (4)	(7,6 ± 0,3) g/100 g [36,6 ± 1,3] g/100 g
Métodos de referencia: (1)[J. Anim. Sci. 81:3255-3266]; (2)[AOAC 973.18]; (3)[AOAC 2002.04]; (4)[AOAC 973.18]			

**Firmas Responsables**

*Ing. Adrian Martinez Machado*  
Código 5777

*Ing. Adrian Martinez Machado*  
Código 5777

*N.C.*

Responsable Laboratorio Química

Ingeniería Agrícola y Zootecnista Responsable

Responsable Laboratorio Bromatología

*N.C.*

Responsable Laboratorio Microbiología

Las firmas indicadas en cada informe solo corresponden a los análisis solicitados y a los laboratorios que intervienen en su ejecución.

**Firma Recibido**

Nombre

Fecha

Fin del informe de ensayo