



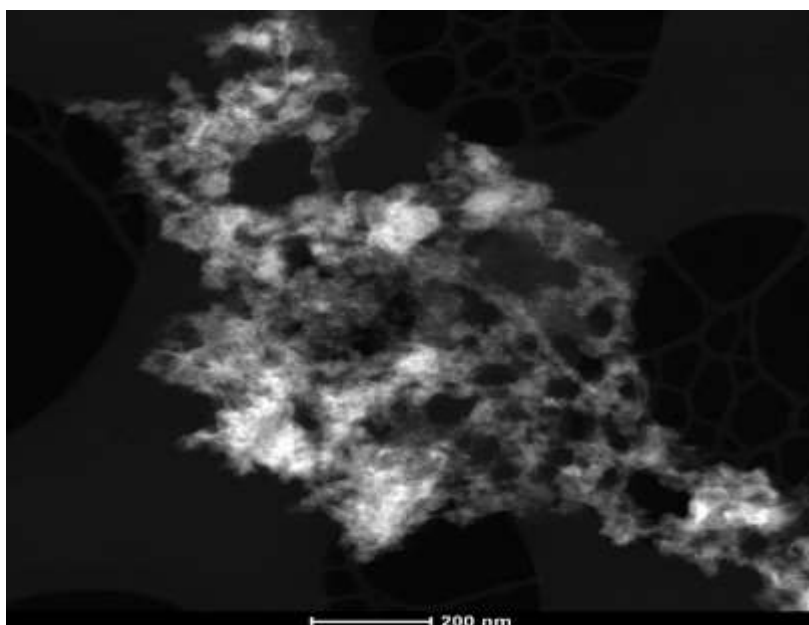
Escola Superior d'Agricultura
de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

TRABAJO FINAL DE GRADO

Grado en Ingeniería de Sistemas Biológicos

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE NANOPARTICULAS DE HIERRO EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE PURÍN DE CERDO



Beatriz Ruiz Conde

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària

Caldes de Montbuí, Barcelona

TUTORES: Miriam Cerrillo Moreno, August Bonmati
Blasi, Teresa Balanyà Martí.



ÍNDICE

1-	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1-	Energías renovables.....	3
1.2-	Biogás.....	3
1.3-	Usos y aplicaciones del biogás: biometano.....	4
1.4-	Digestión anaerobia.....	4
1.5-	Uso de nanopartículas para mejorar la digestión anaerobia.....	7
1.6-	Objetivo del trabajo.....	9
2-	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1-	Configuración del reactor.....	10
2.2-	Operación del reactor.....	11
2.3-	Producción y dosificación de nanopartículas.....	13
2.4-	Ensayos de actividad metanogénica.....	14
2.5-	Métodos analíticos.....	15
3-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
3.1-	Resultados ensayos en continuo.....	17
3.2-	Resultados ensayos de actividad metanogénica.....	23
4-	CONCLUSIONES.....	25
5-	BIBLIOGRAFIA.....	25
	ANEJO 1: Resultados del análisis estadístico de los ensayos en continuo.....	27
	ANEJO 2: Gráficos de los ensayos de actividad.....	38
	ANEJO 3: Resultados del análisis estadístico de los ensayos de actividad metanogénica.....	42

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Energías renovables

El uso de energías renovables (ER) hoy en día, está generando gran interés debido a la cantidad de ventajas que presenta frente a los combustibles fósiles y derivados. Las ER permiten mitigar el cambio climático ya que ayudan a disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero y promueven la sostenibilidad ambiental. Las ER son aquellas que se producen de forma continua y son inagotables a escala humana, como la eólica, la energía solar, la hidráulica, o la biomasa (Merino, 2007).

Los gases combustibles de origen renovable (GCOR) son aquellos generados a partir de materias primas o fuentes de energía que se regeneran a un ritmo parecido o incluso más rápido que su consumo. Su potencial energético los posiciona como posibles sustitutos de gases derivados de combustibles fósiles, así como, son una gran alternativa para el tratamiento, procesamiento y reutilización de residuos orgánicos de forma sostenible. Los tipos de GCOR son el biogás, el gas de síntesis, y el hidrógeno. Todos ellos pueden ser depurados, enriquecidos o transformados en un gas rico en metano (CH_4) denominado biometano (Feliu & Flotats, 2019).

1.2- Biogás

El biogás es una mezcla de gases combustibles compuesta principalmente de metano (50-70% CH_4), dióxido de carbono (30-50% CO_2), ácido sulfhídrico (<2% H_2S) y otros gases (NH_3 , N_2 , H_2 ...)(Feliu & Flotats, 2019). Se produce de forma natural en medios anaerobios, obtenido gracias a la acción de microorganismos tanto heterótrofos, que se encargan de la descomposición de residuos orgánicos, como autótrofos, los cuales pueden producir metano a partir del hidrógeno o de la oxidación de minerales. Ambos tipos de microorganismos dan como producto metano con más o menos impurezas y CO_2 . Podemos encontrar biogás en: sedimentos marinos, antiguos vertederos de residuos orgánicos, fosas sépticas, balsas de deyecciones ganaderas etc... (Feliu & Flotats, 2019).

La tecnología más usada para la obtención de biogás es a partir de biodigestores, donde se lleva a cabo el proceso de digestión en ausencia de oxígeno (anaerobio) utilizando como sustrato diferentes tipos de residuos orgánicos. Por ello, el contenido de nutrientes es muy variable y depende de la especie que lo produce, la edad del animal, su eficiencia digestiva y el tipo de alimentación que recibe (Monteros Curiel et al., 2019).

La producción de biogás en sistemas anaerobios está asociada a la Demanda Química de Oxígeno (DQO) presente en el residuo. La DQO se considera un parámetro conservativo dentro del sistema, ya que la suma de las DQO de entrada debe ser igual a la suma de la DQO de salida. Por ello, considerando un biogás formado por CH_4 y CO_2 ,

debido a que la DQO del CO₂ es nula, la DQO eliminada en el residuo se correspondería con la DQO obtenida en forma de metano (IDAE, 2007). Por ello, el CH₄ es el constituyente más importante del biogás ya que es el que le proporciona el poder calorífico al combustible (Monteros Curiel et al., 2019).

1.3- Usos y aplicaciones del biogás: biometano

El biogás, por su gran potencial energético gracias al alto contenido de CH₄, es de gran interés debido a que es un biocombustible capaz de sustituir en parte a los combustibles fósiles (Souza & Schaeffer, 2013). Para poder darle uso como biocombustible el biogás requiere una “limpieza”, obteniendo así un gas con mayor pureza en metano, el biometano. También se puede obtener a partir del tratamiento de otros GCOR como el gas de síntesis y el hidrógeno, como ya se ha mencionado anteriormente. Este gas purificado se usa tanto para producir biocombustible para vehículos o como sustituto del gas natural, ya que posee características muy similares a este en cuanto a poder calorífico superior (9700 kcal/m³ para el gas natural frente a 8840 kcal/m³ para el biometano, en condiciones normales de presión y temperatura)(Lucía & Lestido, 2018). El biometano se utiliza en diferentes aplicaciones. Su uso más extendido es como combustible en calderas para producir calor, y en motores y turbinas para producir electricidad, así como existen plantas de cogeneración que incluyen ambos procesos. Gracias a su parecido con el gas natural es posible la inyección de biometano a la red de gas natural, y así obtener energía de forma sostenible.

Para poder inyectar biometano a la red de gas natural, se usa como método el incremento del porcentaje de metano mediante el *Upgrading* o enriquecimiento del biogás, obteniendo como producto final biometano(Lucía & Lestido, 2018) . A la hora de purificar el biogás para la obtención de biometano y energía, uno de los principales componentes más perjudiciales es el H₂S, debido a que tiene un gran poder corrosivo y puede llegar a dañar o disminuir la vida útil de maquinarias y equipos (Varnero et al., 2012). Los métodos más usados para realizar esta purificación son a través de técnicas fisicoquímicas como la absorción o a través de membranas, por los cuales el H₂S es retenido en la superficie, ya sea a través de compuestos orgánicos, de hierro o de absorción por agua. A su vez, también existen métodos biológicos para la eliminación de H₂S, ya que existen variedades de bacterias capaces de oxidarlo.

1.4- Digestión anaerobia

La digestión anaerobia consiste en un proceso de descomposición biológica en ausencia de oxígeno que da lugar al biogás, compuesto que se ha descrito en los apartados anteriores de esta memoria. Otro de los productos obtenidos es una suspensión acuosa de “lodo”, llamada **digestato**, que contiene los residuos de materia orgánica obtenidos en el proceso y que pueden ser utilizados como fertilizantes en suelos agrícolas (Flotats et al., 2001).



Este proceso consta de cuatro etapas representadas en la **Figura 1**, donde se observa el proceso de transformación de la materia orgánica a biogás.

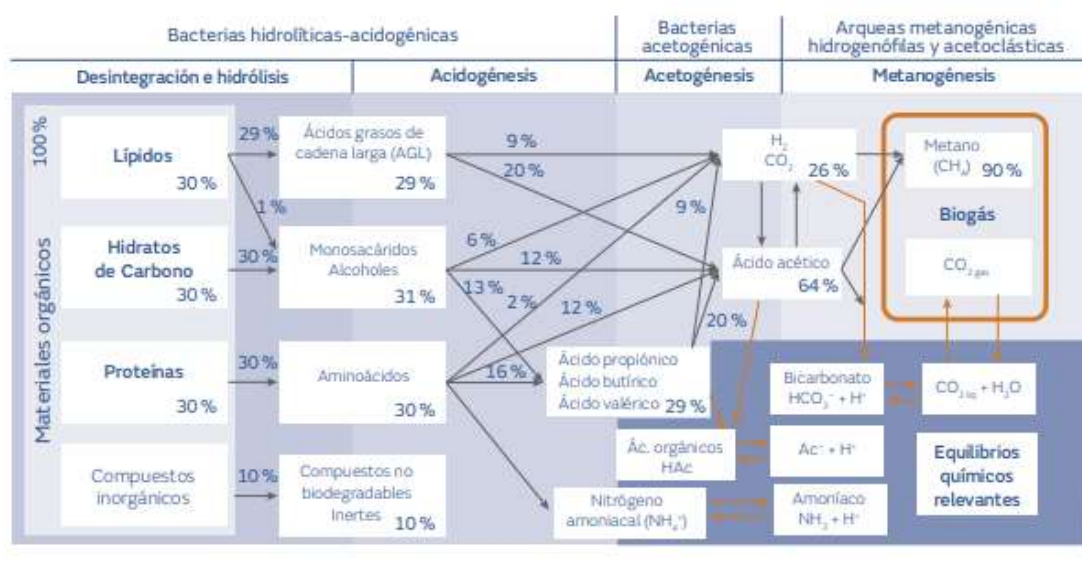


Figura 1: Esquema de las etapas de la digestión anaerobia (Feliu & Flotats, 2019).

Las diferentes etapas en las que se desarrolla el proceso de digestión anaerobia se describen a continuación.

- **Hidrólisis:** En esta fase, las macropartículas procedentes de la materia orgánica compleja se degradan gracias a la acción de las bacterias hidrolíticas obteniendo carbohidratos, proteínas y lípidos. Estas moléculas se hidrolizan dando lugar a monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga gracias a las bacterias acidogénicas. Esta fase es la que limita la velocidad del proceso siempre y cuando el sustrato sea particulado, ya que, el resto de reacciones se producen de forma más rápida en función de los productos obtenidos en esta. Para aumentar la velocidad de desintegración e hidrólisis es conveniente reducir el tamaño de las partículas.
- **Acidogénesis y acetogénesis:** Los productos obtenidos de la fase de hidrólisis, se descomponen en ácidos grasos volátiles (AGV) como: ácido propiónico, butírico, valérico, y acético, en hidrógeno (H₂) y en ion amonio (NH₄⁺) durante la fase acidogénica. Durante la acetogénesis los AGV, se transforman en ácido acético (es el que se obtiene en mayor porcentaje (64%), véase **Figura 1**) y H₂ por acción de las bacterias acetogénicas. Durante esta etapa es obligatorio contar con una baja concentración de H₂ para favorecer termodinámicamente las reacciones de acetogénesis.

- **Metanogénesis:** En esta última etapa se obtiene como producto el CH₄. Se obtiene principalmente a partir de dos vías:
 La metanogénesis acetoclástica, catalizada principalmente por las bacterias de los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta*.
 La metanogénesis hidrogenotrófica, catalizada por una serie de microorganismos metanogénicos. Esta vía es de gran importancia en el proceso de producción del CH₄, ya que las bacterias acetoclásticas son muy sensibles a inhibidores, como el amoníaco (NH₃).
 La metanogénesis se considera la etapa limitante del proceso cuando se trata de un sustrato soluble (IDAE, 2007).

El proceso de digestión anaerobia requiere un obligado equilibrio entre los microorganismos que catalizan las diferentes reacciones del proceso. Para alcanzar este equilibrio es necesario un largo periodo de aclimatación, así como controlar la producción de tóxicos e inhibidores. Estas dificultades producen que la cantidad de biogás obtenido tienda a rendimientos de entre el 30 – 40% respecto al teórico, resultando un proceso en ocasiones poco eficiente (Monteros Curiel et al., 2019).

Para que todas las etapas puedan llevarse a cabo correctamente, se requiere un control de ciertos parámetros que condicionan las etapas y son necesarios para que el proceso se lleve a cabo de forma óptima y en condiciones de estabilidad. Los principales parámetros tenidos en cuenta se explican, a continuación, en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Parámetros relevantes de la digestión anaerobia (Díaz M, 2013).

PARÁMETROS	DESCRIPCIÓN
pH y alcalinidad	Debe mantenerse sobre 6.5-7.5, determina la producción y composición del biogás. La alcalinidad determina la capacidad tampón del medio. Se determina entre la alcalinidad debida al bicarbonato (alcalinidad parcial) y a los ácidos grasos volátiles (alcalinidad intermedia). La relación de alcalinidad estable se encuentra entre los valores 0.3-0.4, determinada mediante la relación entre la alcalinidad intermedia y la total.
Nutrientes	Proporcionan el alimento para la flora bacteriana de todo el sistema. La relación C/N óptima es entre 20-30.
Temperatura	La velocidad de crecimiento de los microorganismos está relacionada con la temperatura. El control de la temperatura es clave para un proceso ya que variaciones bruscas pueden provocar la desestabilización del sistema. Existen tres rangos principales: - Psicrófilo (15-20 °C). - Mesófilo (25-45 °C): es el más utilizado.



	-Termófilo (45-65 °C): mayor velocidad de proceso y eliminación de patógenos, aunque presenta mayor inestabilidad y mayores problemas de inhibición del proceso.
Agitación	Se necesita garantizar la homogenización del medio para favorecer la transferencia de sustrato a la población microbiana.
Tiempo de retención hidráulico (TRH)	<p>Determina el tiempo medio de permanencia del influente en el reactor, sometido a la acción de los microorganismos. El TRH es un parámetro de diseño que se determina en función del sustrato, la producción de energía y la reducción de la carga orgánica.</p> $TRH = \frac{V(digestor)m^3}{Q(alimentación)\frac{m^3}{día}}$ <ul style="list-style-type: none"> - V: Volumen del digestor (m³) - Q: Caudal de alimentación (m³/día)
Velocidad de carga orgánica (VCO) o Carbono orgánico volátil (COV)	Cantidad de materia orgánica introducida por unidad de tiempo en el digestor. Expresada normalmente en sólidos volátiles por unidad de volumen (m ³) y tiempo (día).
Tóxicos e inhibidores	Formados durante el proceso o procedentes del sustrato. Como los causados por altos niveles de ácidos grasos volátiles, amonios, ácido sulfhídrico o bajos niveles de pH.

El rango más óptimo de temperatura para la producción de biogás, se encuentra entre 35 °C y 45 °C. A partir de los 20°C la producción de biogás disminuye y se detiene al llegar a los 8 °C (Zaidi et al., 2020). Para facilitar la acción de los microorganismos en el proceso la biomasa debe contener un porcentaje adecuado de humedad y de tamaño de las partículas orgánicas sometidas al proceso. Una disminución del pH del digestor a valores inferiores a 6 provoca que la proporción de metano del biogás disminuya (Monteros Curiel et al., 2019). Así como, durante el proceso se pueden presentar bajas tasas de hidrólisis debido a limitaciones en la etapa, e inhibiciones producidas por la alta concentración de amonio en el medio (Xiang et al., 2019).

1.5- Uso de nanopartículas para mejorar la digestión anaerobia

Uno de los últimos métodos innovativos para la mejora del proceso de producción de biogás es el uso de nanopartículas (NPs), debido a sus propiedades como, su tamaño, variedad morfológica, alta reactividad y estabilidad química (Dehghani et al., 2019). Gracias a su elevada relación superficie volumen, aumentan los sitios activos disponibles para los microorganismos y por tanto aumentan las reacciones de diferentes tipos, como las reacciones de hidrólisis o las reacciones metanogénicas (Cordova Lizama



et al., 2018). También, pueden funcionar como donantes/receptores de electrones y/o como cofactores de enzimas que participan en el proceso (Dehghani et al., 2019), como podría ser el Co, Fe y el Ni (Cordova Lizama et al., 2018).

Se han hecho estudios para determinar la eficiencia de las NPs con diferentes tipos de materia orgánica como, por ejemplo, en residuos de algas (Zaidi et al., 2020), lodos residuales (Cordova Lizama et al., 2018) o purines de cerdo (Monteros Curiel et al., 2019).

Existen varios tipos diferentes de NPs que han sido aplicadas al proceso de digestión anaerobia, como NPs de níquel, hierro cerivalente, óxidos metálicos y de carbono, siendo las NPs de hierro las más prometedoras para potenciar la producción de biogás (Dehghani et al., 2019). Se han usado técnicas matemáticas como la metodología de la superficie de respuesta, la cual, a partir de datos experimentales, ayuda a optimizar y mejorar los parámetros involucrados en el proceso. Esta herramienta se puede utilizar para determinar la concentración óptima de NPs (Zaidi et al., 2020). A su vez, también se han usado esquemas de tratamiento secuencial para determinar la distribución de los metales en diferentes formas químicas (solubles, intercambiables, ligado a óxidos de Fe-Mn, ligado a la materia orgánica y a materia residual) para poder estudiar la transferencia y la biodisponibilidad de metales pesados en el proceso de digestión anaerobia (Xiang et al., 2019).

Se ha determinado que las NPs afectan positivamente a la producción de biogás, siendo clave la concentración de NPs en el medio, debido a que, a altas concentraciones se produce la inhibición de las reacciones. En el caso del uso de NPs de níquel en tratamiento de algas, un estudio consiguió obtener una mayor producción de metano e incluso aumentar el rendimiento del proceso con una dosis de 1 mg/L, y a una temperatura de 35 °C (Zaidi et al., 2020). En otro estudio realizado con NP de hierro cerivalente (Fe^0) para el tratamiento de lodos residuales se logró aumentar la producción de metano en un 41 %, mejorar la remoción de sólidos volátiles (SV), la producción de biogás y la composición de AGV's. A dosis elevadas (9 mg/gSV) se observó que aumenta la producción de AGV's y retardan la producción de biogás obteniendo un comportamiento sigmoidal. (Cordova Lizama et al., 2018).

Las NPs de hierro, como ya se ha mencionado, son las más eficientes a la hora de mejorar el proceso de digestión anaerobia. El hierro es un micronutriente esencial para todos los organismos vivos, pero debido a su dificultad de absorción y asimilación por su baja solubilidad, bacterias hongos y plantas han adaptado sistemas complejos de adquisición de hierro para aumentar su biodisponibilidad. Se ha visto, en estudios posteriores, que la adición de NPs de hierro en excretas de ganado porcino, dispersan iones de hierro activo en la dosis necesaria para las bacterias anaeróbicas y, por ende, mejora la producción de biogás ya que asegura una distribución homogénea de iones de hierro en el medio, esto conlleva un control sostenido de la concentración en el digestor (Monteros Curiel et al., 2019). También se observó, a través de ensayos en discontinuo, y comparando resultados a temperatura ambiente (22 °C) y a temperatura controlada (34 °C), que las NPs de hierro aumentaban la producción de biogás en mayor



proporción a la producción obtenida a temperatura ambiente (Monteros Curiel et al., 2019).

Estudios han determinado que las NPs de hierro cerovalente (ZVI), no son tóxicas, son abundantes, baratas y fáciles de producir. Se han realizado estudios en digestión anaerobia usando biorreactores tipo batch, que determinan que la adición de este metal en tratamiento de purines de cerdo junto con la combinación de magnetita, aumenta la eficiencia de la producción de metano, ya que el ZVI actúa como un amortiguador de ácido y como un eficaz donante de electrones para mejorar la actividad de los microorganismos. La magnetita, que es principal producto final de la corrosión del ZVI en digestión anaerobia, funciona como un conductor de electrones que mejora la tasa de biodegradación orgánica e incrementa la producción de metano en condiciones anaerobias. Esta aplicación dio como resultado un rendimiento de producción de metano de 246.9-3345.5 mL/g obteniendo un 20-26% más que en los controles (Xiang et al., 2019).

Otros estudios han aplicado estas NPs (ZVI) para mitigar la problemática de los residuos de antibióticos presentes en las excretas de cerdo, como la sulfadiazina (SDZ) ya que los altos niveles pueden provocar la inhibición de las bacterias metanogénicas, dando lugar a bajos rendimientos de producción. Se ha determinado que en la fase metanogénica se produce la mayor degradación de antibióticos presentes, alrededor de un 76-78 %, por lo que la eficiencia de la fase metanogénica es crucial, siendo los metanógenos hidrogenotróficos los que obtienen mayor tasa de crecimiento, mayor utilización del sustrato y mayor tolerancia. Los resultados obtenidos concluyeron en un aumento significativo de rendimiento de CH₄ y una eliminación de SDZ del 36,9 % (Huang et al., 2019).

Por último, un estudio realizado por el *Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2)* y la *Universitat Autònoma de Barcelona*, ha desarrollado una tecnología llamada BiogásPlus, destinada al tratamiento de residuos orgánicos. Esta tecnología ha sido aplicada en celulosa y en fangos de depuradora y consiste en la introducción controlada de nanopartículas de óxido de hierro en el proceso de digestión anaerobia. Sus resultados han permitido aumentar hasta un 200 % la producción de biogás (UABDivulga, 2014).

1.6- Objetivo del trabajo

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación llamado OPRENAC, realizado en el Institut de Recerca i Tecnologia Agralimentària (IRTA), el cual consiste en la aplicación combinada de Digestión Anaerobia y Sistemas Bioelectroquímicos para el tratamiento de purines de cerdo procedentes de una granja de engorde. El objetivo de este Trabajo de Final de grado es analizar, comparar y discutir mediante la experimentación el efecto de las nanopartículas de hierro cerovalente en la producción de biogás, obtenido a partir de la digestión anaerobia. Para llevar a cabo este estudio, se han realizado ensayos en continuo y ensayos de actividad metanogénica, con el fin



de observar el efecto producido por la incorporación de las nanopartículas de hierro al proceso.

2- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Configuración del reactor

Para el desarrollo del experimento se utilizaron tres biorreactores anaerobios de mezcla completa, denominados R2, R4 y R5. En la **Figura 2 y 3**, se muestra el reactor anaerobio y sus componentes.



Figura 2: Imagen del montaje de laboratorio del reactor de digestión anaerobia. Autor: Beatriz Ruiz Conde

A continuación, se describen los elementos que componen el montaje de cada uno de los 3 reactores de digestión anaerobia, y que están referenciados en la **Figura 3** con su número correspondiente:

- 1- Sonda de temperatura.
- 2- Temporizador de alimentación, display de temperatura.
- 3- Reactor anaerobio de vidrio con camisa calefactora.
- 4- Contador de biogás (mL/min)
- 5- Baño termostático.
- 6- Agitadores.
- 7- Depósito de alimentación.

- 8- Balón de efluente.
- 9- Llaves de paso.
- 10- Bomba peristáltica temporizada.

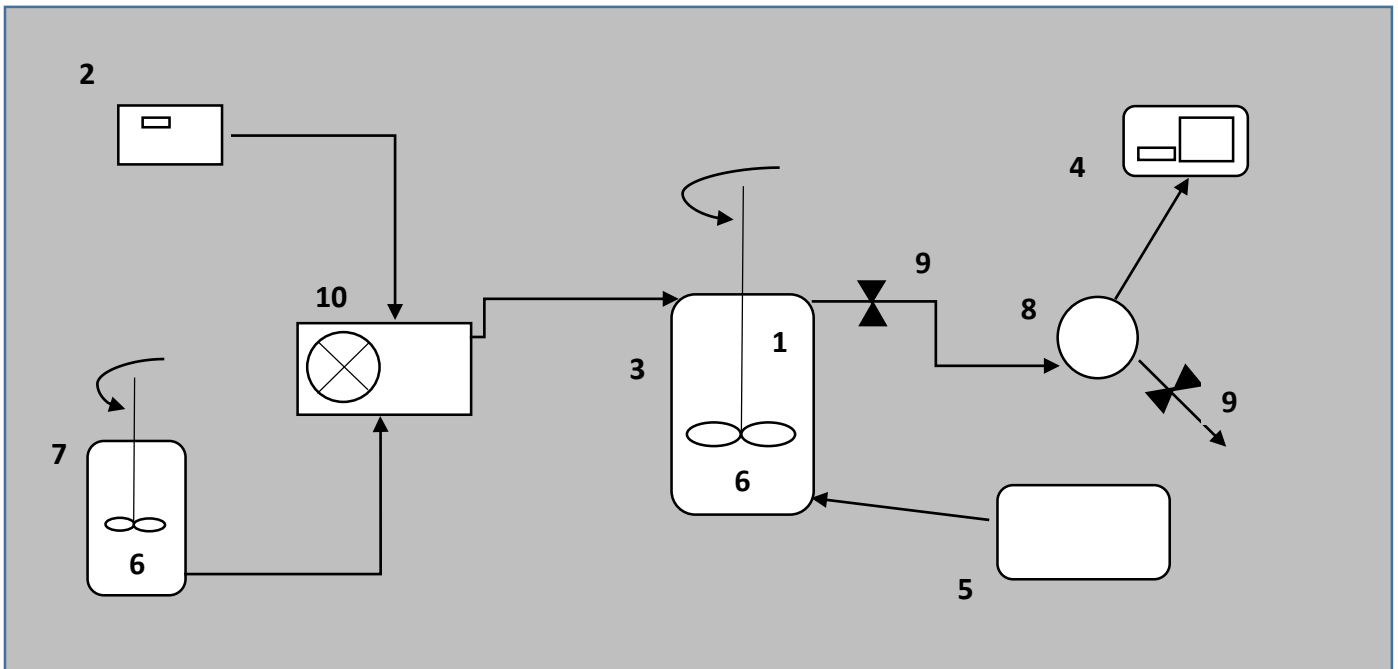


Figura 3: Esquema de los componentes de sistema de Digestión Anaerobia implantado.

Estos elementos controlan algunos de los parámetros anteriormente descritos en el apartado 1.4 de este documento. El baño de agua termostático (5) se ha utilizado para garantizar que el medio se mantenga a una temperatura óptima alrededor de los 35°C para los reactores R2 y R4 (mesófilos) y 50°C para el R5 (termófilo). La sonda de temperatura (1) integrada en el digestor indicará la temperatura a la que se encuentra el reactor. Los agitadores (6) favorecen la homogenización y el intercambio de nutrientes en el medio. Mediante el temporizador (2) y la bomba peristáltica (10) controlamos los tiempos de retención hidráulicos (TRHs) establecidos de 20 días en el caso de los reactores mesófilos y 10 días en el caso del termófilo. El volumen de biogás producido será registrado por el contador de biogás (4).

2.2- Operación del reactor

Los reactores R2 y R4 contienen un volumen de 5 L cada uno, mientras que el reactor R5 contiene 4 L, se alimentan con el mismo sustrato, con una demanda química de oxígeno (DQO) que en nuestro caso será de 35000 mg O₂/kg de purín. Los reactores R2 y R4 trabajan en condiciones de temperatura mesófilas (35 °C), mientras que el R5, trabaja en condiciones termófilas (50 °C). Se realizan dos alimentaciones diarias cada 12 h, en el caso de los reactores R2 y R4 con un valor de unos 250 mL/día, mientras que

para el reactor de rango termófilo debido a que la degradación se produce a mayor velocidad es de unos 400 mL/ día. Los reactores operan, como ya se ha mencionado a TRHs de 20 días el R2 y R4 y a 10 días para el R5. En esta memoria se han analizado los resultados correspondientes en un periodo de 122 días de operación. Los 3 reactores habían sido operados en las mismas condiciones en los meses previos al ensayo, por lo que se considera que se encontraban en condiciones estacionarias.

La alimentación de los tres reactores ha consistido en purín de cerdo procedente de la granja de engorde Puigllong (Gurb, Barcelona). Para poder optimizar el proceso de digestión, el purín es pasado por un tamiz de 500 μm para alcanzar una medida de partícula óptima que no produzca obstrucción en los conductos. Posteriormente, es diluido para alcanzar el valor de DQO correspondiente para la alimentación del reactor.

Diariamente se han registrado los datos experimentales de los caudales (mL/día) tanto de entrada como salida, la temperatura a la que se encuentra el digestor, la producción de biogás obtenida y el contenido de metano del biogás.

Una vez a la semana se ha tomado muestra del efluente de cada reactor, así como de la alimentación, y se han realizado las analíticas indicadas en la **Tabla 2**, con el fin de comprobar el estado de los reactores y evaluar la eficiencia de eliminación de DQO.

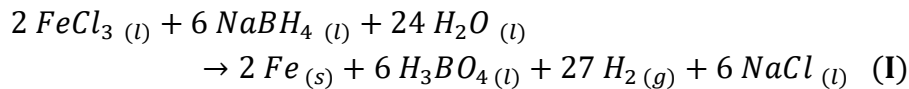
Tabla 2: Analíticas realizadas por tipo de muestra.

Muestreo semanal por reactor

Muestra	Analítica
<ul style="list-style-type: none"> • EFLUENTE (R2, R4, R5) 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcalinidad • ST/SV • NTK • Demanda química de oxígeno (DQO) • % CH₄ • NH₄ • AGV
<ul style="list-style-type: none"> • ALIMENTACIÓN (R2, R4, R5) 	<ul style="list-style-type: none"> • ST/SV • NTK • Demanda química de oxígeno (DQO) • NH₄ • AGV

2.3- Producción y dosificación de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas de hierro, se ha realizado en el laboratorio mediante una reacción química (I) de reducción. Se han utilizado como reactantes Cloruro de hierro (III) y Borohidruro de sodio (NaBH_4), con esta reacción se reduce el Fe_3 a Fe (0) puro, obteniendo así nanopartículas de hierro con propiedades magnéticas.



La producción requiere de:

- Una campana extractora de gases
- Un Erlenmeyer.
- Un agitador.
- Un embudo de decantación.
- Agua desionizada (MiliQ).
- Nitrógeno.
- Imán de Neodimio.

El proceso se lleva a cabo en la campana extractora de gases, ya que la reacción produce hidrógeno y su inhalación es tóxica. La reacción se produce bajo un flujo de nitrógeno ya que se pretende evitar una posible oxidación de las NPs. Se disuelven en agua desionizada por separado ambos reactivos. Se le añaden 75 mL de agua MiliQ a 21,13 g de cloruro de hierro (III) en el Erlenmeyer junto con el agitador. 22,65 g de borohidruro de sodio se disuelven en otros 75 mL de agua MiliQ y se traspasan al embudo de decantación. Debido a que la reacción es muy exotérmica, es necesario que el borohidruro de sodio se añada gota a gota sobre la solución de cloruro de hierro (III). Una vez se acaban de mezclar los reactivos, se requiere una limpieza del medio, ya que contiene los residuos de la reacción. Para ello se utiliza el imán de neodimio para la retención de las nanopartículas gracias a sus propiedades y se realizan tres limpiezas con agua desionizada. Por último, una vez realizada la eliminación del residuo de la reacción, se le añade agua desionizada hasta alcanzar un volumen final de 150 mL. El recipiente se cierra y se purga con N_2 para asegurar la ausencia de oxígeno y así el mantenimiento del estado de oxidación de las NPs. De esta manera, se obtiene una solución de NPs con una concentración de 52 g/L.

Al contar con dos reactores mesófilos, para poder observar el efecto de las nanopartículas, el biorreactor R2 se usará a modo de control, por lo que en lugar de nanopartículas se le inyectará el mismo volumen en H_2O . La inyección de NPs al medio se ha realizado mediante una jeringa por un bypass del conducto de alimentación. Como dosis, se estableció que se realizaría un pulso semanal de 58 mL para el R4, (58 mL H_2O , R2) y de 56 mL para el R5, dosis establecidas previamente en ensayos en batch.



2.4- Ensayos de actividad metanogénica.

Los ensayos de actividad metanogénica consisten en determinar por qué ruta metabólica los microorganismos presentes en el sustrato se encuentran más activos, para poder determinar la actividad metanogénica específica. Para observar cómo afecta la adición de nanopartículas al proceso, es decir, si aumenta la producción de biogás o si producen algún tipo de inhibición en las rutas metabólicas, se realizaron dos ensayos de actividad metanogénica con diferentes tipos de sustratos (H_2 , Mix de AGV, ácido acético). Primeramente, con un inóculo procedente de la biomasa obtenida por el efluente de los reactores previo al inicio del ensayo de adición de NPs, y posteriormente al cabo de un periodo de 85 días, con el efluente de cada uno de los tres reactores al finalizar el periodo de adición.

En viales de vidrio (**Figura 4**) de 120 mL, se prepara un medio de cultivo con:

- Micronutrientes (0,05 g/vial)
- Macronutrientes (4 tipos, 0,50 g/vial·tipo)
- Agua desionizada
- Bicarbonato (efecto tampón, 0,25 g/vial)
- Inóculo (efluente R2, R4, R5)



Figura 4: Sistema del ensayo de actividad metanogénica. Autor: Beatriz Ruiz Conde.

Se añadió un sustrato específico por cada ruta metabólica a estudiar, en este caso, un Mix de AGV (acético, propiónico y butírico) con una concentración de DQO de 44 g/Kg, ácido acético, con una concentración de DQO de 1,070 g/Kg, ambos sustratos se añadieron manteniendo una concentración determinada de $5 \text{ g}_{\text{COD}} \text{ L}^{-1}$ y el tercer sustrato hidrógeno, se inyectaron 60 mL por vial. El inóculo se añadió siguiendo una concentración de $1,5 \text{ g}_{\text{SSV}} \text{ L}^{-1}$. Se hacen dos réplicas de cada sustrato a modo de seguridad, y dos réplicas en ausencia de sustrato a modo de control. Cada vial contiene un volumen final de líquido 50 mL y 70 mL de espacio de cabeza. Una vez introducidos todos los componentes, los viales se taparon con un tapón de goma y se sellaron con una cápsula de aluminio. Finalmente, se purgó con N_2 en el espacio de cabeza del vial para asegurar condiciones anaerobias.

Para comparar resultados, se tomaron muestras semanales de la producción de biogás y se analizó su composición mediante cromatografía de gases. Para calcular la actividad metanogénica, a partir del gráfico obtenido mediante los resultados de producción de CH_4 , se calcula la pendiente en el punto de máxima pendiente correspondiente a la fase exponencial de la curva de crecimiento. Con ello se determina la velocidad de producción a la que los microorganismos producen CH_4 , y se puede comparar por qué ruta metabólica son más eficientes. En el caso de los viales con adición de H_2 , la ruta metabólica que se favorece es la metanogénesis hidrogenotrófica, siendo en digestión anaerobia una de las rutas más importantes. En el caso de los viales con acético, se produce la metanogénesis acátoclastica, las bacterias involucradas en esta ruta muy sensibles a inhibidores como el amoniaco. En el caso de mix de AGV, la producción de metano puede darse por ambas rutas, en función de la cantidad de inhibición que presente favorecerá la metanogénesis hidrogenotrófica.

2.5- Métodos analíticos

A continuación, se describen las técnicas de laboratorio utilizadas para la determinación de los diferentes parámetros:

Determinación de la Demanda Química de Oxígeno: Se prepara la muestra para su posterior digestión con una solución de dicromato potásico y sulfato de plata. Se digiere durante 120 minutos a $120\text{ }^\circ\text{C}$. La DQO corresponde a una medida indirecta, obtenida a partir de una recta de calibración mediante los valores de absorbancia procedentes de muestras patrón. Posteriormente, se mide la absorbancia de la muestra digerida y se obtiene el valor de DQO gracias a la recta de calibración. Las medidas de absorbancia se han realizado a una longitud de onda de 605 nm . Para la digestión se ha usado un digestor marca HACH modelo LT 200 (**Figura 5**), para la lectura de la absorbancia se ha usado un espectrofotómetro portátil marca HUALIX modelo DR 2700.



Figura 5: Digestor térmico para el análisis de la DQO. Autor: Beatriz Ruiz Conde.

Determinación del Nitrógeno a partir del método Kjeldhal: Se prepara la muestra con adición de ácido sulfúrico, agua desionizada y un catalizador para acelerar la reacción. Seguidamente se procede a su digestión, que en nuestro caso al contar con una muestra líquida se realiza a $180\text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 minutos y a $350\text{ }^\circ\text{C}$ durante otros 60 min. El objetivo de la digestión es romper todos los enlaces de nitrógeno de la muestra y convertir todo el nitrógeno unido orgánicamente en iones amonio (NH_4^+).

Posteriormente se añade NaOH a la muestra y se realiza la destilación del amoníaco generado y su posterior absorción en ácido bórico. Se hace una valoración del nitrógeno a partir de ácido clorhídrico mediante un valorador automático. Para ello se ha usado un digestor BUCHI modelo K-43 (**Figura 6**) y un destilador BUCHI modelo K-360 (**Figura 7**).

Determinación del nitrógeno amoniacal (NH_4^+): Se realiza una destilación directa de la muestra como en la analítica anterior, pero sin digerir previamente. Se ha usado el mismo equipo que en la analítica anterior (**Figura 7**).



Figura 6: Digestor para la determinación del N. Kjeldhal.
Autor: Beatriz Ruiz Conde.



Figura 7: Destilador para la determinación de Nitrógeno
Autor: Beatriz Ruiz Conde.

Determinación de la Alcalinidad: Para determinar la alcalinidad de la muestra se hace una valoración con la adición de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y mediante la medida del pH tomada por un pH-metro. Debido a que la alcalinidad depende del sistema Carbonato, en primer lugar, se mide la cantidad de H_2SO_4 necesaria en mL hasta alcanzar un valor de pH de 5.75, correspondiente al valor de la alcalinidad parcial. Por último, se vuelve a medir el volumen (mL) necesario de H_2SO_4 para alcanzar un valor de pH de 4.3, con el que se obtiene la alcalinidad total y la relación de alcalinidad (RA) correspondiente.

Determinación sólidos totales y sólidos volátiles (ST/SV): Se pesa una cantidad conocida de muestras en crisoles de porcelana y se introducen en la estufa a 105 °C durante 24 h, posteriormente se insertan en una mufla a 550 °C durante 3 h. Con ayuda de una balanza se toman medidas de los pesos antes y después de cada proceso obteniendo así el resultado en el primer caso (105 °C) de los ST y en el segundo (550 °C) de los SV.

Caracterización del biogás ($\%\text{CH}_4$, CO_2): A partir de una muestra de gas, tomada con una jeringa para gases, se determina la composición del biogás mediante un cromatógrafo de gases modelo VARIAN CP-3800 (Varian, USA) equipado con un detector térmico de conductividad (TDC).

3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1- Resultados ensayos en continuo

A partir de los resultados obtenidos mediante la metodología descrita en el apartado anterior, se ha comprobado la estabilidad de los reactores mediante el análisis de los parámetros operacionales de cada reactor (**Tabla 3**). La eficiencia del proceso de digestión anaerobia se ha evaluado mediante la caracterización de los efluentes obtenidos en cada reactor (**Tabla 4**) y la comparación entre los porcentajes de degradación tanto de la Demanda Química de Oxígeno, como de Sólido Volátiles y la producción de metano por unidad de DQO y de SV (**Tabla 5**).

Para comprobar la significancia de los datos obtenidos a nivel estadístico, con ayuda del programa *MINITAB*, se ha realizado un ANNOVA de un solo factor. Mediante el método de comparaciones múltiples de Dunnett se han analizado las diferencias entre los reactores R2 y R4, y mediante el método de Tukey se ha analizado el reactor R5. Con ello podremos determinar si las diferencias obtenidas entre los reactores son estadísticamente significativas dependiendo del valor de p que se haya obtenido en el análisis. Los resultados del análisis estadístico se muestran en el **Anejo 1** de este documento.

Los tiempos de retención hidráulicos (TRHs) corresponden al caudal de sustrato de entrada en el reactor (influyente) por unidad de volumen y al caudal de salida (efluente) del reactor por unidad de volumen. Al estar trabajando con reactores continuos ambos tiempos de retención deberían ser exactamente iguales, pero, debido a factores externos como fallos de bombas, obstrucciones, etc... hacen variar los resultados entre un tiempo de retención y otro.

Tabla 3: Resultados obtenidos de los parámetros de operación de cada digester (DE: desviación estándar).

Parámetro	R2			R4			R5		
	Promedio ± DE	Min	Max	Promedio ± DE	Min	Max	Promedio ± DE	Min	Max
Tiempo de Retención Hidráulico (días) influyente	19,9 ± 1,8	15,2	23,8	22,0 ± 2,3	17,9	28,5	8,7 ± 1,7	4,3	12,8
Tiempo de Retención Hidráulico (días) efluente	19,6 ± 1,2	16,4	23,2	23,2 ± 2,6	19,9	29,7	9,4 ± 2,3	4,2	17,0
Velocidad de Carga Orgánica (Kg DQO /m ³ -día)	1,8 ± 0,2	1,2	2,4	1,6 ± 0,2	1,17	2,2	4,2 ± 1,0	2,7	7,6
Temperatura (°C)	34,6 ± 1,5	-	-	35 ± 1,3	-	-	49 ± 3,3	-	-



Tabla 4: Caracterización de la alimentación y del efluente procedente de cada digestor (valores expresados como promedio \pm desviación estándar).

	Demanda Química de Oxígeno t (mgO ₂ /kg)	Sólidos Totales (%)	Sólidos Volátiles (%)	NH ₄ (mgN-NH ₄ /L)	NTK (mgN/Kg)	% CH ₄	pH	Relación de Alcalinidad
ALIMENTACIÓN	35453 \pm 3156	2,91 \pm 0,32	1,90 \pm 0,42	1340 \pm 275	-	-	-	-
EFLUENTE R2	17060 \pm 2183	1,73 \pm 0,14	0,95 \pm 0,08	1585 \pm 263	1929 \pm 362	71,00 \pm 0,02	8,03 \pm 0,17	0,10 \pm 0,03
EFLUENTE R4	19251 \pm 2848	2,38 \pm 0,34	1,20 \pm 0,34	1644 \pm 337	2174 \pm 243	81,00 \pm 0,04	8,22 \pm 0,13	0,13 \pm 0,06
EFLUENTE R5	23780 \pm 4051	2,54 \pm 0,31	1,39 \pm 0,20	1443 \pm 205	2195 \pm 354	76,00 \pm 0,05	8,13 \pm 0,17	0,15 \pm 0,05

Tabla 5: Comparación entre el porcentaje de degradación de DQO y SV y la cantidad de CH₄ generada por kg de DQO y de SV (valores expresados como promedio \pm desviación estándar).

	degradación de DQO (%)	degradación SV (%)	m ³ CH ₄ / kg DQO	m ³ CH ₄ / kg SV
EFLUENTE R2	49,00 \pm 0,03	48,00 \pm 0,09	0,17 \pm 0,03	0,17 \pm 0,03
EFLUENTE R4	47,00 \pm 0,11	40,00 \pm 0,13	0,24 \pm 0,09	0,13 \pm 0,04
EFLUENTE R5	38,00 \pm 0,12	32,00 \pm 0,14	0,08 \pm 0,11	0,16 \pm 0,20

Como ya se ha mencionado, el digestor R2 ha sido usado a modo de control, respecto al digestor R4, en el cual, han sido añadidas las NPs. El digestor R2 presenta mejor estabilidad respecto al reactor R4 como se puede observar en la **Figura 8**, así como ambos reactores se mantienen alrededor del valor de tiempo de retención hidráulico establecido de 20 días, obteniendo un valor mayor en el R4 (**Tabla 3**). Esto se debe a fallos técnicos la operación del reactor (fallo de alimentación por obstrucción ofallo en el sistema de bombeo). Los resultados obtenidos de la caracterización del efluente en el digestor R2, mostraron una disminución de DQOt de un 52 %, una disminución de los sólidos totales y volátiles en torno al 50 % y un ligero aumento del NH₄ respecto a la alimentación. El digestor R4 presenta menor degradación tanto de DQO como de SV, y un mayor aumento de NH₄ respecto al R2. En la **Tabla 5**, se vuelve a observar una mayor degradación del digestor R2, sin embargo, a nivel estadístico no hay diferencias significativas entre la degradación de DQO en ambos reactores, pero si encontramos diferencias en la degradación de SV.

Esta mayor degradación puede ser debida a que la eficiencia del reactor R2, al contar con una mayor estabilidad, es superior. El pH del medio en ambos digestores se mantiene ligeramente básico en torno al 8, y la relación de alcalinidad se encuentra entre el rango establecido (considerando que el reactor se encuentra estable cuando la RA es inferior a 0,3), por lo que ambos medios están en condiciones óptimas para que se pueda producir la digestión anaerobia (**Tabla 4**).

En ambos digestores, la producción de biogás oscila en torno a los $0,25 \text{ m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{día}$. Sin embargo, la producción de metano se incrementó manteniéndose superior en el digestor R4 a partir de los 25 días de ensayo, como podemos ver en la **Figura 9**. A nivel estadístico se ha observado que no hay diferencias significativas en la producción de metano entre ambos reactores, pero si existen en los resultados obtenidos en la **Tabla 5**, por lo que respecta a la cantidad de metano producido por kg de DQO y por kg de SV. El porcentaje de metano obtenido en el digestor R2 es de 71 % en promedio, mientras que en el digestor R4 se mantiene en torno al 81 %, véase la **Figura 10**. Se ha comprobado que estas diferencias de porcentaje son estadísticamente significativas. En cada pulso de nanopartículas realizado, se observa una tendencia a producir un pico de metano en un periodo de 24 h después de la inyección, esto sugiere que las NPs incrementan la actividad metanogénica en un breve periodo de tiempo. Como podemos ver se obtienen valores alrededor de un 10 % más que el control (R2).

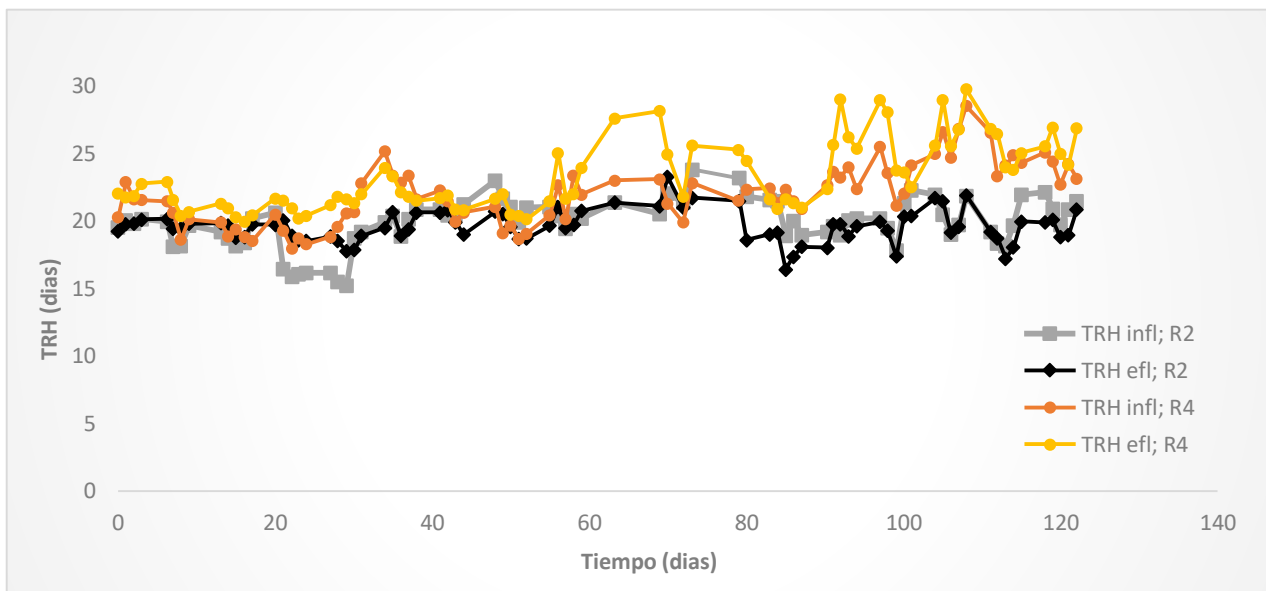


Figura 8: Evolución de los TRHs de los digestores R2 y R4

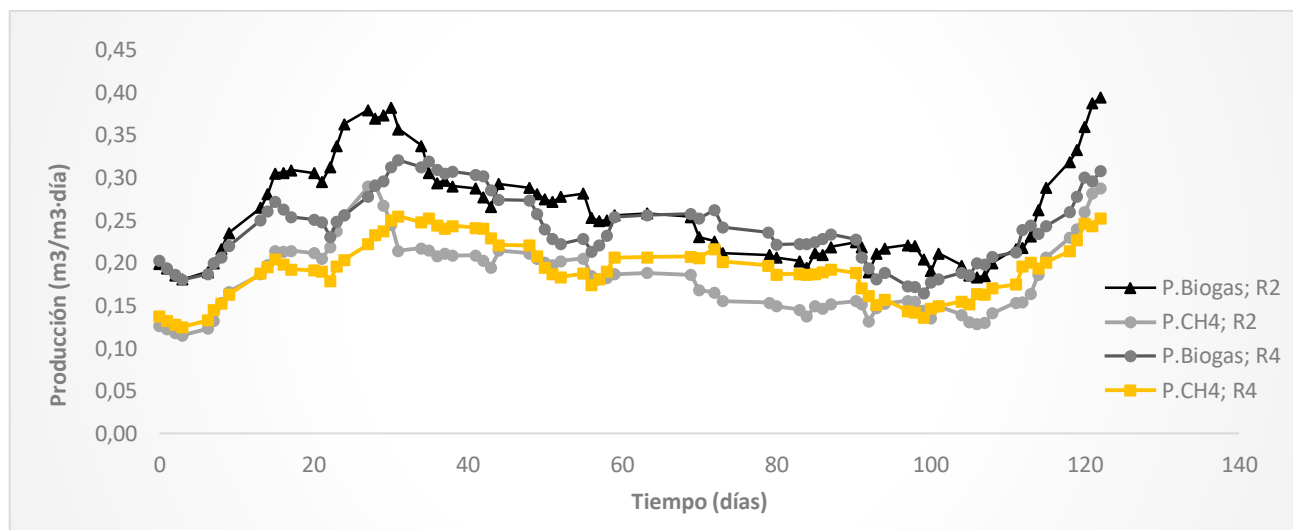


Figura 9: Evolución de la producción de biogás y metano de los digestores R2 y R4.

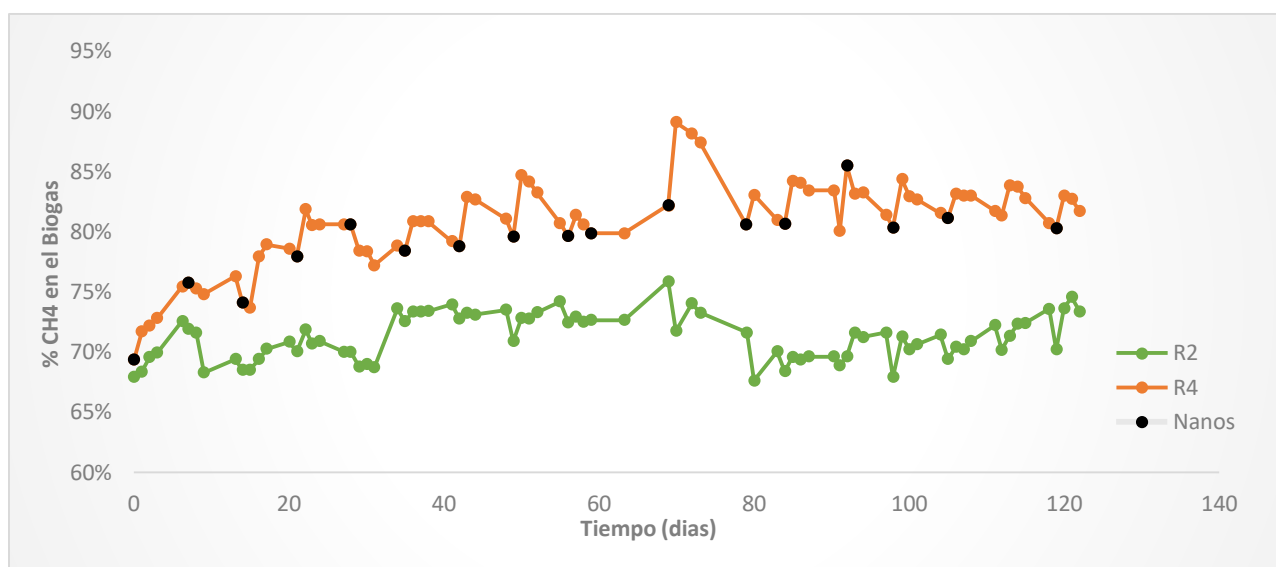


Figura 10: Evolución del porcentaje de metano contenido en el biogás, digestores R2 y R4.

El digester R5 presenta problemas de inestabilidad, tanto en los tiempos de retención hidráulicos como en la velocidad de carga orgánica (**Figura 11**). La degradación de DQO y de Sólidos Volátiles es de un 38 % y 32% respectivamente, lo que hace el proceso poco efectivo. Como se ha mencionado anteriormente los digestores termófilos son más inestables que los reactores mesófilos, ya que son más sensibles a la inhibición por amonio, por ejemplo. Además, el TRH de este reactor es de sólo 10 días, comparado con los 20 días de los reactores R2 y R4. Al no contar con un cuarto digester termófilo para poder usarlo de control, se establece como control el periodo de 15 días previo al inicio de inyección de nanopartículas.



Para poder realizar el análisis estadístico ha sido necesario reagrupar los datos para poder contar con el mismo número de muestras antes de la inyección de nanopartículas y después. Para ello se ha calculado la media por cada 8 muestras después de la inyección obteniendo 10 valores antes de la NPs y 10 valores después.

En la **Figura 12** vemos como la producción de biogás en el periodo en ausencia de NP se mantenía en valores del $0,18 \text{ m}^3/\text{m}^3\cdot\text{día}$, a partir de la primera adición de NP se observa un aumento en la producción que se mantiene durante el resto del periodo alrededor de $0,35 \text{ m}^3/\text{m}^3\cdot\text{día}$. También se produce el mismo incremento en la producción de metano. El análisis estadístico muestra que estas diferencias son significativas. Sin embargo, en la **Tabla 5**, vemos que los valores obtenidos de producción de metano por kg de DQO son muy inferiores. El análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre las cantidades de metano obtenidas antes y después de la inyección. Como se puede ver (**Figura 13**) el valor del porcentaje de metano correspondiente al periodo en ausencia de NPs se mantiene alrededor del 66 %. A partir de la primera adición se produce un incremento de aproximadamente un 10 % más de porcentaje de metano, en torno al 76 %. Como se observa en el **Anejo 1**, las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas. La tendencia es similar a la que se producía en el digestor R4, a cada pulso se observa una subida en la producción de metano, llegando a alcanzar un valor máximo del 87 %.

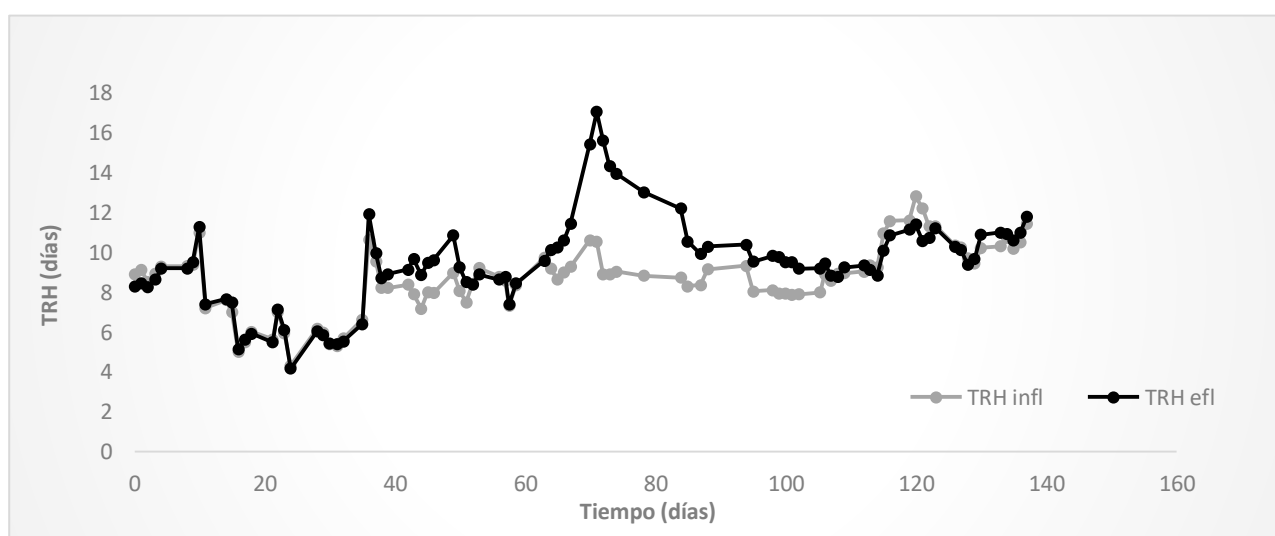


Figura 11: Evolución de los TRHs del digestor R5.

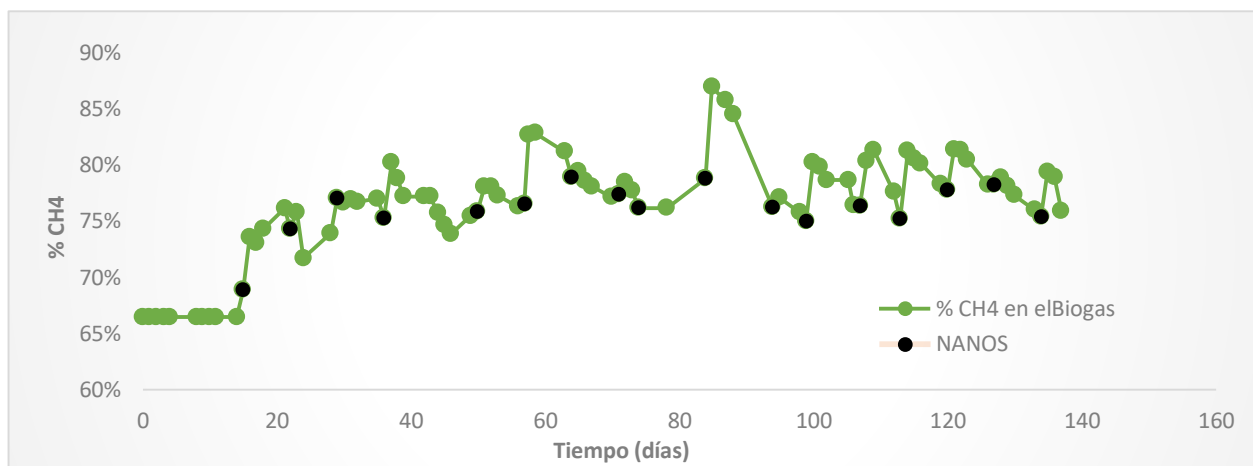


Figura 12: Evolución de la producción de biogás y metano del digester R5

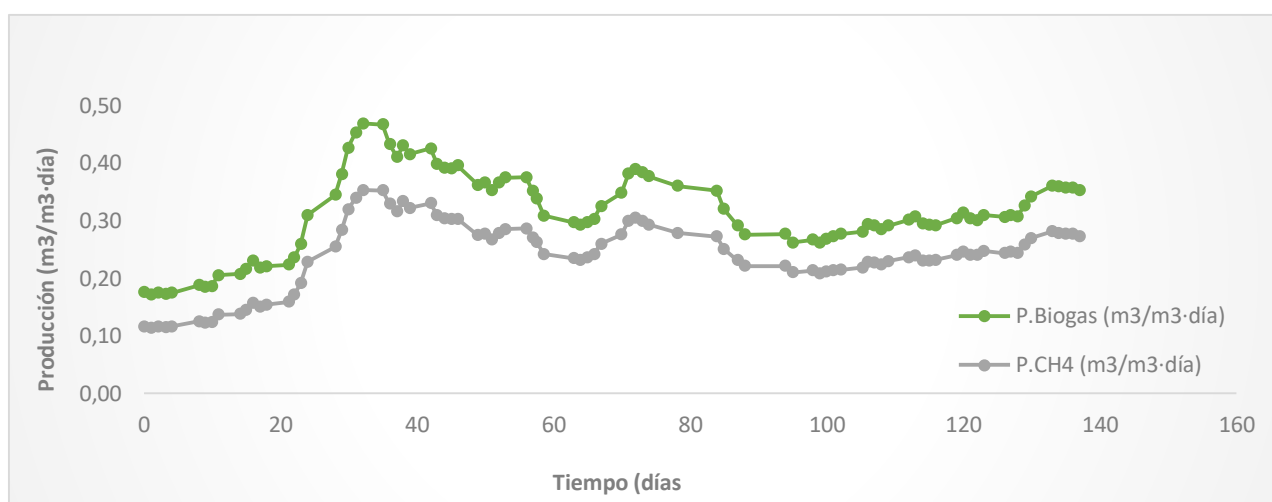


Figura 13: Evolución del porcentaje de metano contenido en el biogás, digester R5

Los resultados corroboran lo comentado en estudios anteriores, que las NPs de hierro (0) producen beneficio en la producción de metano (Monteros Curiel et al., 2019)(Huang et al., 2019)(Puntes, 2015)(Xiang et al., 2019). Este aumento puede ser debido a que los microorganismos se nutren del hierro incrementado su actividad, sin embargo, como ya se ha mencionado, este incremento es observado en un periodo de tiempo de 24h, obteniendo un comportamiento sigmoideal como el observado en otros estudios (Cordova Lizama et al., 2018). Lo que significa, que las NPs después de este periodo de interacción con el medio cambian su condición dentro del digester, provocando una disminución de la absorción de hierro por parte de los microorganismos y, por ende, una disminución de la producción. Esto puede ser debido a que cambian su estado de oxidación a otro no accesible por los microorganismos o, a que reaccionan junto con el medio formando ciertos productos no solubles. También una acumulación de NPs en el medio puede provocar cierta toxicidad e inhibición, ya que como se ha

comentado en el primer apartado de este documento, dosis elevadas de NPs pueden provocar este tipo de inhibición en las rutas metanogénicas (Cordova Lizama et al., 2018). Otros estudios obtuvieron mayor incremento en la producción llegando a valores de entre el 20-26 % más que en controles (Huang et al., 2019), sin embargo, se han realizado mediante ensayos tipo batch, por lo cual la estacionalidad de los reactores en continuo puede llevar a que la eficiencia sea menor en este caso.

También se observa que la disminución de ST y SV en los reactores R4 y R5 es inferior a la del reactor R2, al igual que en la disminución de DQO. Como ya se ha comentado, esto puede ser debido a la estabilidad del reactor R2 o, a que las NPs producen un aumento de estos parámetros. Sería necesario estudiar cómo afectan las NPs a estos parámetros dentro del digester., ya que el contenido de sólidos totales y sólidos volátiles en digestión anaerobia es uno de los parámetros que determina la eficiencia de biodegradación (ST) y el contenido de materia orgánica (SV) respectivamente. Estos valores no deben superar el 16 % en el caso de ST y el 8 % en el caso de SV, ya que inhibirían en su totalidad el proceso (Monteros Curiel et al., 2019).

Otro de los parámetros a tener en cuenta es la temperatura, la cual está asociada a la actividad enzimática y, por ende, determina la velocidad del proceso de digestión (Monteros Curiel et al., 2019). En este estudio se observa que se obtiene mayor porcentaje de CH₄ en condiciones mesófilas (34 °C) con adición de NPs que, en condiciones termófilas (50 °C). Sin embargo, estudios posteriores obtuvieron mejores resultados en condiciones psicrófilas (22 °C) con adición NPs que en condiciones mesófilas (34° C), por lo que sería necesario realizar más estudios sobre a qué rangos de temperatura las NPs de hierro producen mayor incremento de producción de metano.

3.2- Resultados ensayos de actividad metanogénica

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en ambos ensayos de actividad metanogénica, uno realizado antes de iniciar la fase de adición de nanopartículas y otro con su posterior adición, como ya se ha mencionado en el apartado de materiales y métodos. Los resultados obtenidos son representados en la **Tabla 6** y en las figuras adjuntas en el **Anejo 2** de este documento, haciendo una comparativa entre cada tipo de sustrato y, a su vez, en cada reactor. Para comprobar si las diferencias entre cada reactor son estadísticamente significativas, se ha realizado una ANNOVA de un solo factor mediante el método Tukey. En este análisis se ha comparado los resultados por cada tipo de sustrato (MIX AGV y H₂), y por cada efluente por separado. Los resultados del análisis estadístico se muestran en el **Anejo 3** de este documento.

Se han descartado los resultados del análisis con MIX de AGVs del efluente procedente del digester R4, debido a que no se produjo producción. Esto puede ser debido a un posible error en el proceso experimental. En este caso no contamos con los resultados del ensayo con acético de ninguno de los efluentes, por el mismo motivo.



Los controles verifican la diferencia que se obtiene al contar con los sustratos específicos, ya que como carecen de ellos, la producción es insignificante. La producción de metano detectada puede ser debido a restos de sustrato contenidos en el inóculo.

Tabla 6: Comparativa entre los resultados obtenidos en el ensayo de actividad.

Sustrato	inóculo	En ausencia de NP		Post NP	
		Producción de metano (mL)	Velocidad de producción (mg DQO _{eliminada} /g SSV · día)	Producción de metano (mL)	Velocidad de producción (mg DQO _{eliminada} /g SSV · día)
MIX AGV	Efluente R2	76,0	9,53	94,71	41,47
	Efluente R4	-	-	74,32	15,45
	Efluente R5	71,6	22,06	54,33	20,62
H ₂	Efluente R2	14,6	3,61	11,44	4,59
	Efluente R4	11,6	0,67	9,15	1,52
	Efluente R5	15,7	3,21	9,46	15,52

Los resultados obtenidos mediante el sustrato de MIX de AGVs, muestran que el efluente del reactor R2, contando que en ambos ensayos se encuentra en ausencia de NPs (ya que es un control respecto al R4), ha producido un incremento tanto de producción como de velocidad, respecto al primer ensayo, llegando a alcanzar el valor máximo obtenido en ambos ensayos. Esto puede ser debido a que los microorganismos se encuentran más activos y en mejores condiciones que en el ensayo anterior y que es la ruta metabólica más favorable. En cualquier caso, no se han observado mejoras respecto al efluente R4, siendo los valores obtenidos en el segundo ensayo inferiores a los del efluente R2. Lo cual también ocurre siendo el sustrato el hidrógeno.

En el caso del efluente R5, para el sustrato de MIX de AGVs, se observa una disminución tanto de la velocidad como de la producción respecto al primer ensayo. Sin embargo, respecto al sustrato de hidrógeno se observa un gran incremento de velocidad, pero, no ha aumentado la producción si no que ha disminuido. El análisis estadístico muestra que las diferencias obtenidas por los reactores para el caso de MIX AGV, no son estadísticamente significativas. En el caso del hidrogeno se muestran diferencias entre los reactores R2 y R5 frente al reactor R4.

Como se ha comentado en estudios anteriores mencionados en la introducción, la adición de NPs de Fe (0) aumentaba la actividad de los metanógenos hidrogenotróficos (Huang et al., 2019), provocando mayor eficiencia de la metanogénesis por la vía del hidrógeno. Sin embargo, las producciones han disminuido tanto en el caso de Mix de AGVs como en el de hidrógeno, no se han observado mejoras significativas en los efluentes tratados con NPs. Tal vez, al usar el efluente como inóculo las bacterias metanogénicas hayan sufrido algún tipo de inhibición al estar en contacto con las NPs, ya que tampoco se sabe en qué estado de oxidación se encontraban al hacer



el ensayo ni si su concentración, una vez no sean accesibles para los microorganismos, puede ser perjudicial.

4- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mediante los ensayos en continuo muestran, que las nanopartículas producen un efecto positivo en la producción de metano, llegando a obtener valores de alrededor del 80 % de CH₄ en el biogás en condiciones mesófilas un 10 % mayor que en ausencia de ellas y llegando a alcanzar un 86 % de CH₄ en el biogás en condiciones termófilas (lo que conlleva un incremento del 15 % respecto al control). Sin embargo, esto solo ocurre cuando se realizan los pulsos, por lo cual, sería necesario diseñar y analizar diferentes métodos de adición, para que éste se realice de forma más continua y garantice una producción estable que llegue a alcanzar valores del mismo orden de magnitud. A su vez, sería conveniente estudiar cómo afecta la acumulación de las nanopartículas en el interior del reactor, o si al aumentar su estado de oxidación se produce algún tipo de inhibición o toxicidad. Los resultados de los ensayos de actividad metanogénica muestran que, la ruta que mayor cantidad de metano produce y a mayor velocidad es a partir de la mezcla de ácidos grasos volátiles.

5- BIBLIOGRAFIA

- Merino, L. (2007). Las energías renovables. *Haya Comunicación*, 20.
<http://media1.webgarden.es/files/media1:4befe784280d2.pdf.upl/E.renovables.pdf>
- Feliu, A., & Flotats, X. (2019). *Los gases renovables Un vector energético emergente*. Fundación Naturgy. <https://www.fundacionnaturgy.org/publicacion/los-gases-renovables-un-vector-energetico-emergente/>
- Monteros Curiel, E., Durand Moreno, L. C., & Martin del Campo Moreno, C. I. (2019). Nanopartículas de hierro magnetizado en la producción de biogás de excretas de ganado porcino Nanoparticles of iron magnetics in the production of biogas of porcine eat excrets. *Tecnogestion*.
- IDAE. (2007). *E N E R G Í A S R E N O V A B L E S Biomasa Digestores anaerobios Biomasa Digestores anaerobios Energía de la Biomasa GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE INDUSTRIA, TURISMO Y COMERCIO*.
- Souza, J., & Schaeffer, L. (2013). Sistema de compresión de biogás y biometano. *Informacion Tecnologica*, 24(6), 3–8. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000600002>



- Lucía, A., & Lestido, R. (2018). *Estudio de la viabilidad técnico-económica de la tecnología de membranas para el enriquecimiento de biogás procedente de la digestión de fangos de depuración de aguas residuales*.
- Varnero, M. T., Carú, M., Galleguillos, K., & Achondo, P. (2012). Tecnologías disponibles para la Purificación de Biogás usado en la Generación Eléctrica. *Información Tecnológica*, 23(2), 31–40. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000200005>
- Flotats, X., Campos, E., Palatsi, J., & Bonmatí, X. (2001). Digestión anaerobia de purines de cerdo y co-digestión con residuos de la industria alimentaria. *Monografías de La Actualidad*, 65, 51–65.
- Díaz M, S. E. F. (2013). *Digestió Anaerobia*. <http://www.agrowaste.eu/wp-content/uploads/2013/02/DIGESTION-ANAEROBIA.pdf>
- Zaidi, A. A., Khan, S. Z., & Shi, Y. (2020). Optimization of nickel nanoparticles concentration for biogas enhancement from green algae anaerobic digestion. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.04.762>
- Xiang, Y., Yang, Z., Zhang, Y., Xu, R., Zheng, Y., Hu, J., Li, X., Jia, M., Xiong, W., & Cao, J. (2019). Influence of nanoscale zero-valent iron and magnetite nanoparticles on anaerobic digestion performance and macrolide, aminoglycoside, β -lactam resistance genes reduction. *Bioresource Technology*, 294(September), 122139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122139>
- Dehghani, M., Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., Kazemi Shariat Panahi, H., & Nizami, A. S. (2019). A state-of-the-art review on the application of nanomaterials for enhancing biogas production. *Journal of Environmental Management*, 251(September). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109597>
- Cordova Lizama, A., Carrera Figueiras, C., & Ruiz Espinosa, J. (2018). *Libro de resúmenes: Estudio de nanopartículas de Fe0 en la intensificación del proceso metanogénico de lodos residuales*. (Vol. 7).
- Huang, W., Yang, F., Huang, W., Lei, Z., & Zhang, Z. (2019). Enhancing hydrogenotrophic activities by zero-valent iron addition as an effective method to improve sulfadiazine removal during anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource Technology*, 294(September), 122178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122178>
- Puntes, V. (2015). Uso de nanopartículas de hierro en la digestión anaeróbica, una revolución que multiplica exponencialmente la producción de biogás . <https://Www.Retema.Es/>.
- UABDivulga. (2014). *Una tecnología con nanopartículas triplica la producción de biogás - UABDivulga Barcelona Investigación e Innovación*. <https://www.uab.cat/web/detalle-noticia/una-tecnologia-con-nanoparticulos-triplica-la-produccion-de-biogas-1345680342040.html?noticiaid=1345685246393>

ANEJO 1: Resultados del análisis estadístico de los ensayos en
continuo



HOJA DE TRABAJO 1

ANOVA de un solo factor: P.CH4 vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R2; R4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,002649	0,002649	1,69	0,195
Error	156	0,244268	0,001566		
Total	157	0,246916			

Resumen del modelo

	S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,0395704	1,07%	0,44%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R2	79	0,18456	0,04403	(0,17576; 0,19335)
R4	79	0,19274	0,03455	(0,18395; 0,20154)

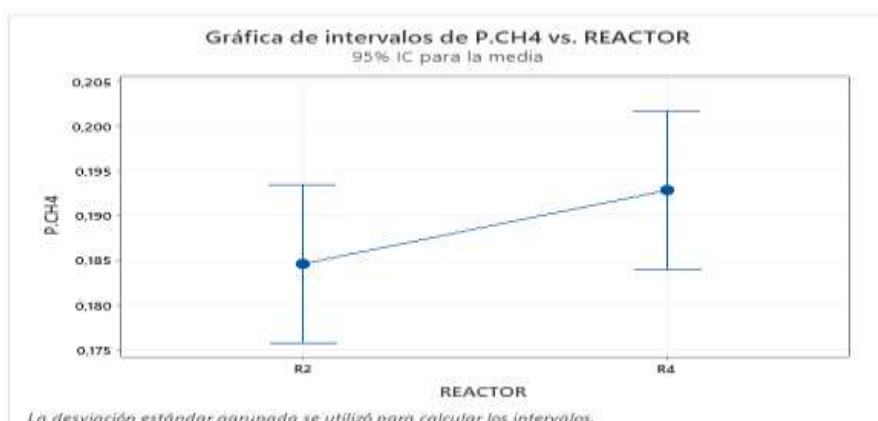
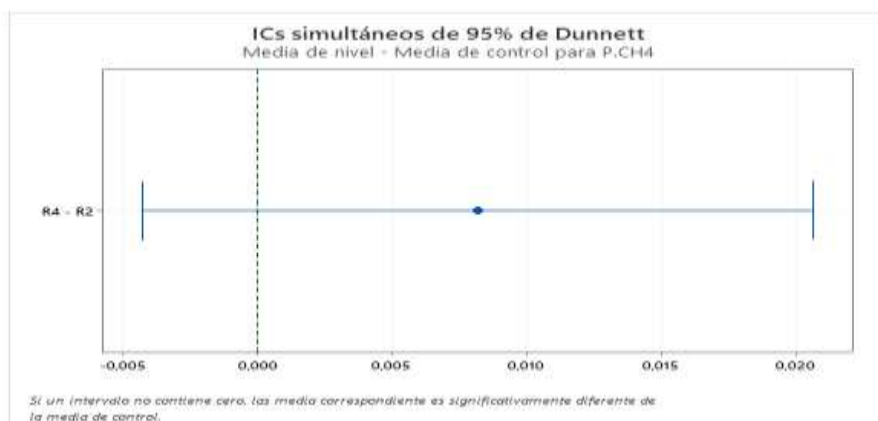
Desv.Est. agrupada = 0,0395704

Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R2 (control)	79	0,18456	A
R4	79	0,19274	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



HOJA DE TRABAJO 1

ANOVA de un solo factor: BIOGAS vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alternativa No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R2; R4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,3454	0,345374	418,85	0,000
Error	156	0,1286	0,000825		
Total	157	0,4740			

Resumen del modelo

	S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,0287154	72,86%	72,69%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R2	79	0,71214	0,01887	(0,70576; 0,71852)
R4	79	0,80565	0,03596	(0,79927; 0,81203)

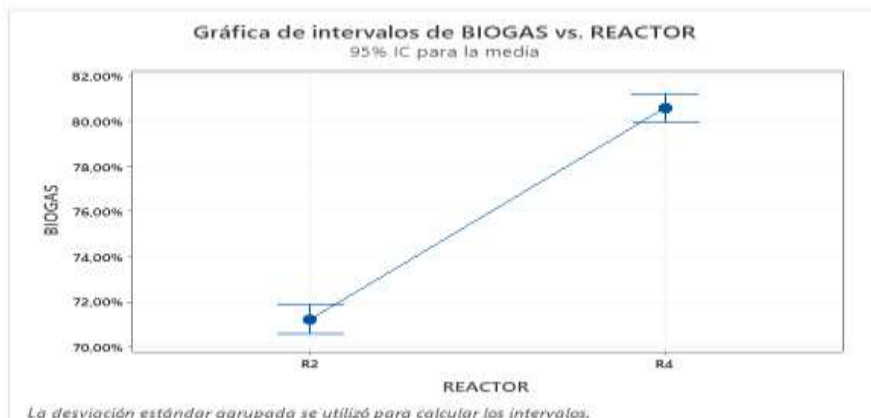
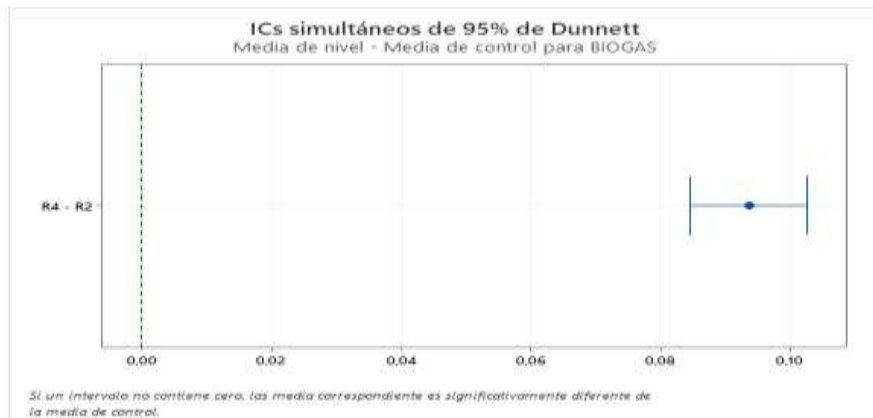
Desv.Est. agrupada = 0,0287154

Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R2 (control)	79	0,71214	A
R4	79	0,80565	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



HOJA DE TRABAJO 1

ANOVA de un solo factor: DEGRADACIÓN DQO vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R2; R4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,01322	0,01322	1,28	0,259
Error	156	1,60987	0,01032		
Total	157	1,62309			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad. S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,101586	0,81%	0,18%	0,00%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R2	79	0,4927	0,0888	(0,4701; 0,5153)
R4	79	0,4744	0,1129	(0,4518; 0,4970)

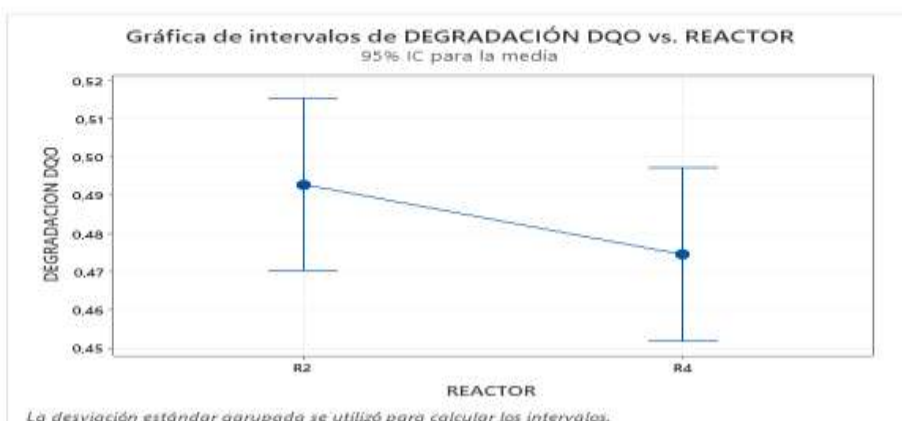
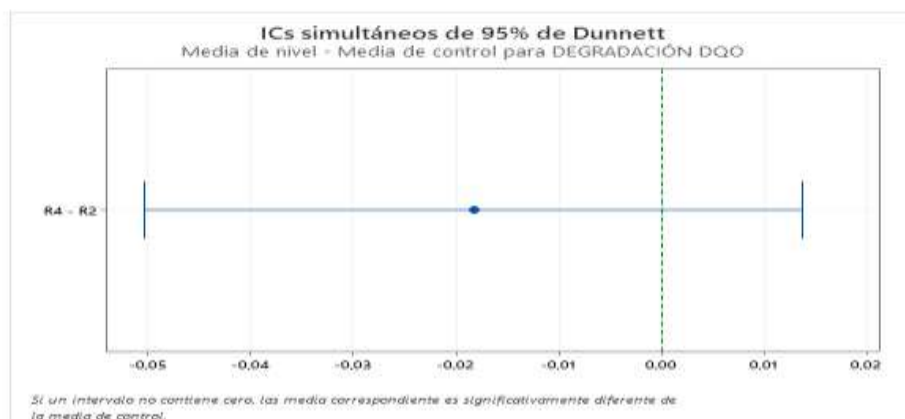
Desv.Est. agrupada = 0,101586

Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R2 (control)	79	0,4927	A
R4	79	0,4744	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



HOJA DE TRABAJO 1

ANOVA de un solo factor: DEGRADACIÓN SV vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R2; R4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,2300	0,23000	18,19	0,000
Error	156	1,9727	0,01265		
Total	157	2,2027			

Resumen del modelo

	S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,112452	10,44%	9,87% 8,13%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R2	79	0,4784	0,0899	(0,4534; 0,5034)
R4	79	0,4021	0,1312	(0,3771; 0,4271)

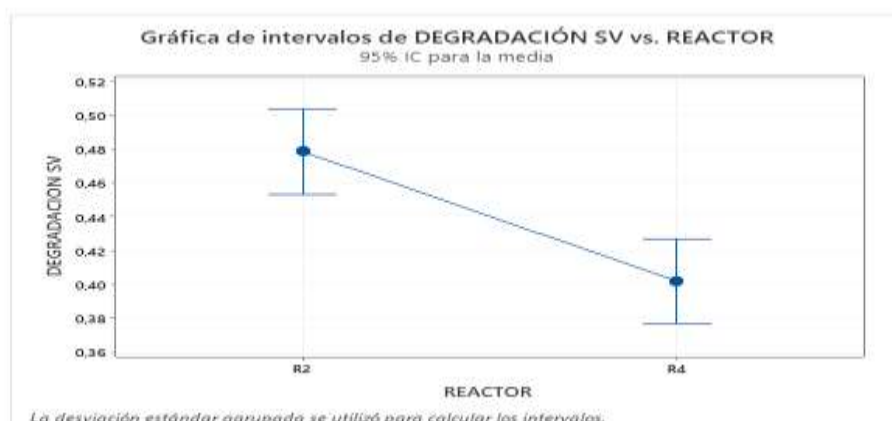
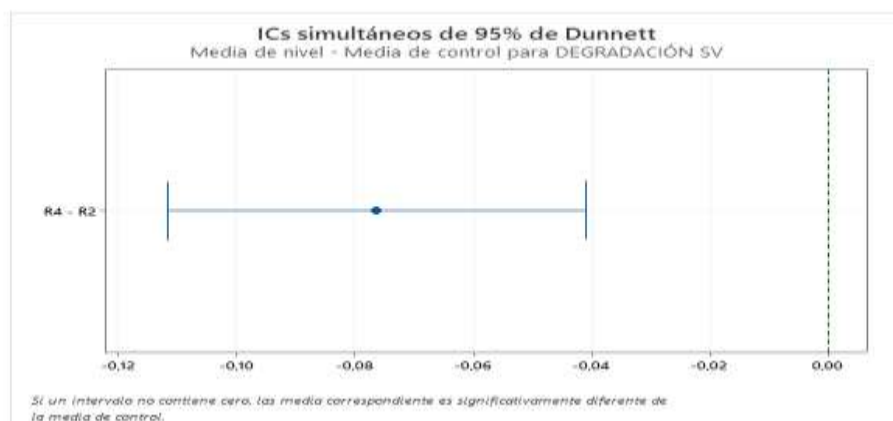
Desv.Est. agrupada = 0,112452

Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R2 (control)	79	0,4784	A
R4	79	0,4021	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



HOJA DE TRABAJO 1

ANOVA de un solo factor: M3 CH4/KG DQO vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R2; R4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,1808	0,180775	40,30	0,000
Error	156	0,6997	0,004485		
Total	157	0,8805			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,0669734	20,53%	20,02% 18,48%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R2	79	0,17496	0,03133	(0,16007; 0,18984)
R4	79	0,2426	0,0894	(0,2277; 0,2575)

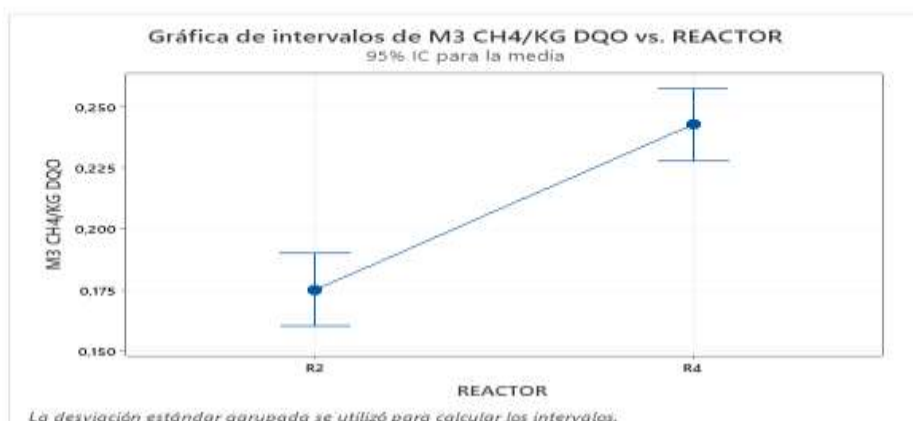
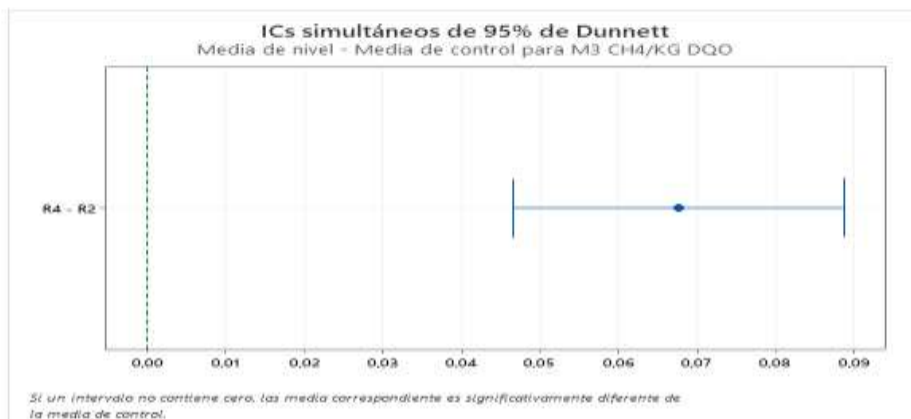
Desv.Est. agrupada = 0,0669734

Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R2 (control)	79	0,17496	A
R4	79	0,2426	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



HOJA DE TRABAJO 1

ANOVA de un solo factor: M3 CH4/KG SV vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R2; R4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,06041	0,060408	45,43	0,000
Error	156	0,20744	0,001330		
Total	157	0,26785			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad. S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,0364658	22,55%	22,06%	20,55%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R2	79	0,16924	0,02545	(0,16113; 0,17734)
R4	79	0,13013	0,04485	(0,12202; 0,13823)

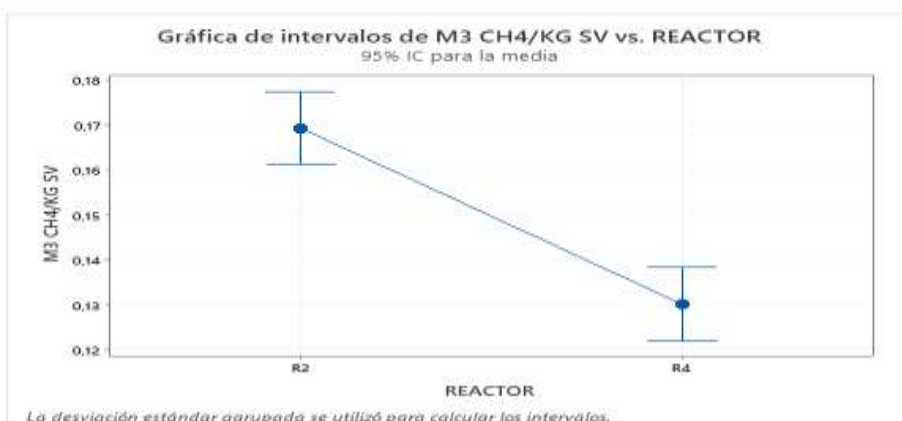
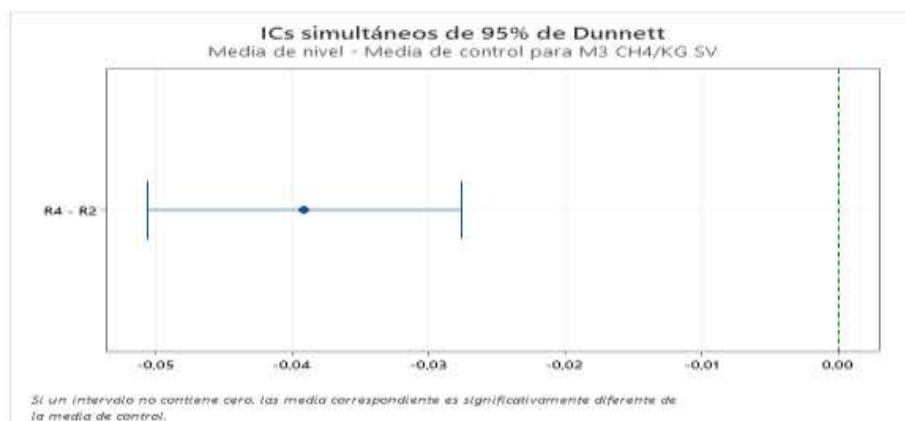
Desv.Est. agrupada = 0,0364658

Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R2 (control)	79	0,16924	A
R4	79	0,13013	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



HOJA DE TRABAJO 2

ANOVA de un solo factor: P.CH4 vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R5; R5 Post Nanos

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,08795	0,087955	99,47	0,000
Error	18	0,01592	0,000884		
Total	19	0,10387			

Resumen del modelo

	S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,0297364	84,68%	83,83%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R5	10	0,12207	0,00890	(0,10232; 0,14183)
R5 Post Nanos	10	0,2547	0,0411	(0,2349; 0,2745)

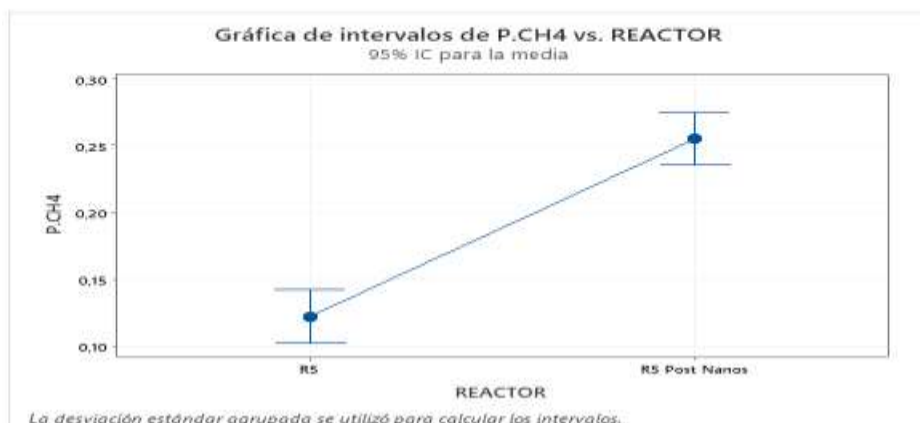
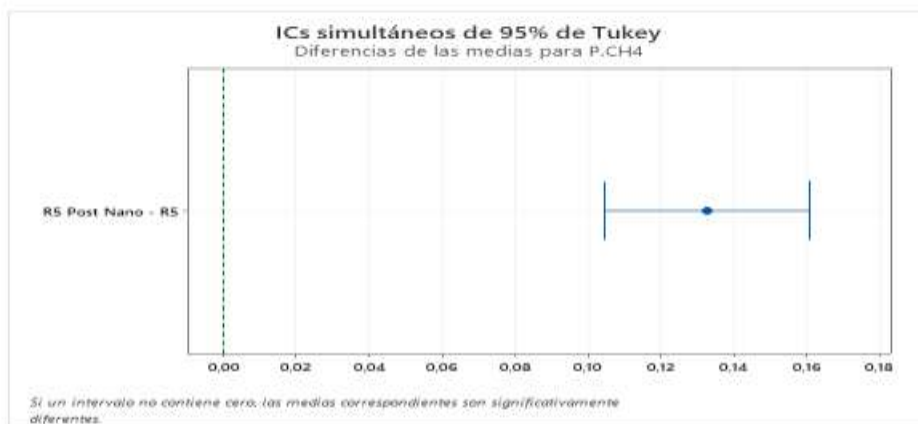
Desv.Est. agrupada = 0,0297364

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R5 Post Nanos	10	0,2547	A
R5	10	0,12207	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



HOJA DE TRABAJO 2

ANOVA de un solo factor: BIOGAS vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R5; R5 Post Nanos

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,063462	0,063462	361,27	0,000
Error	18	0,003162	0,000176		
Total	19	0,066624			

Resumen del modelo

	S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,0132538	95,25%	94,99%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R5	10	0,6648	0,0000	(0,6560; 0,6736)
R5 Post Nanos	10	0,77746	0,01874	(0,76866; 0,78627)

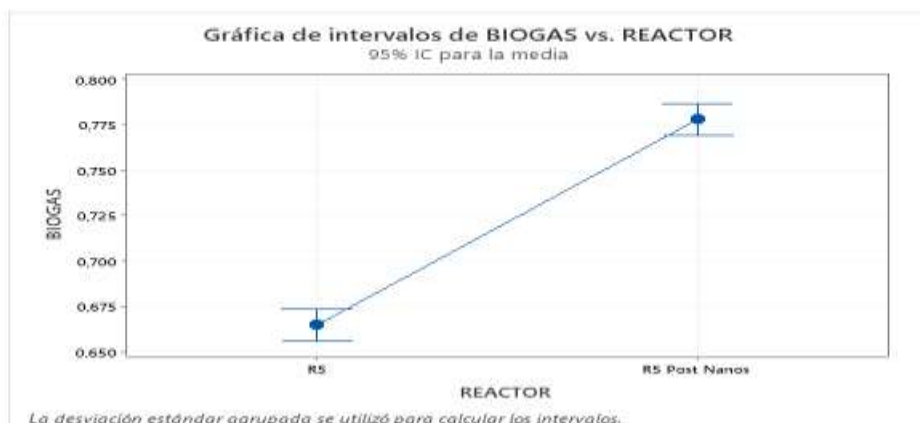
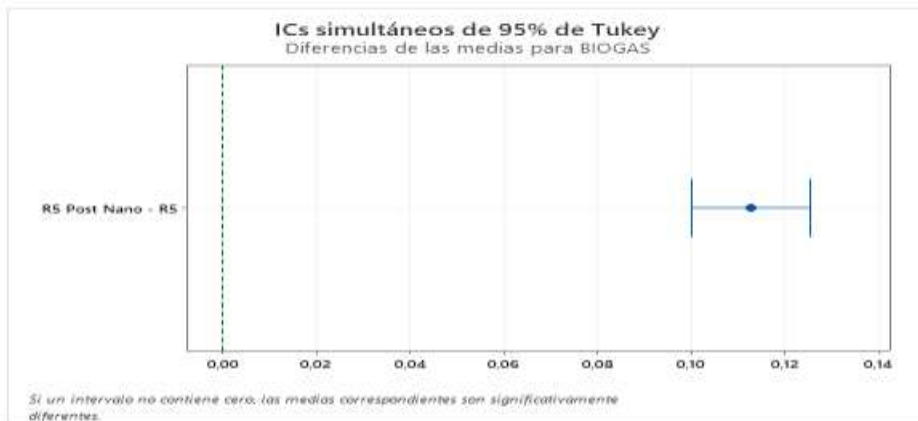
Desv.Est. agrupada = 0,0132538

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R5 Post Nanos	10	0,77746	A
R5	10	0,6648	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



HOJA DE TRABAJO 2

ANOVA de un solo factor: M3 CH4/KG DQO vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R5; R5 Post Nanos

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,000745	0,000745	0,03	0,855
Error	18	0,390099	0,021672		
Total	19	0,390843			

Resumen del modelo

	S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,147215	0,19%	0,00%	0,00%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R5	10	0,1012	0,2050	(0,0034; 0,1990)
R5 Post Nanos	10	0,0890	0,0363	(-0,0088; 0,1868)

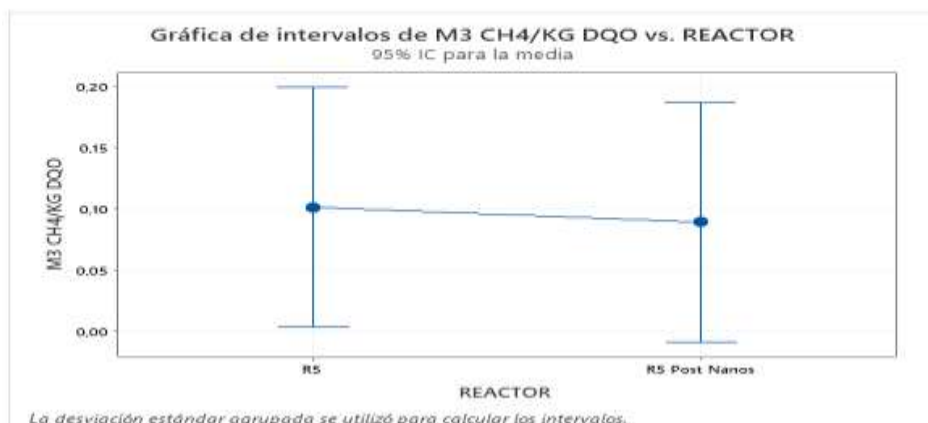
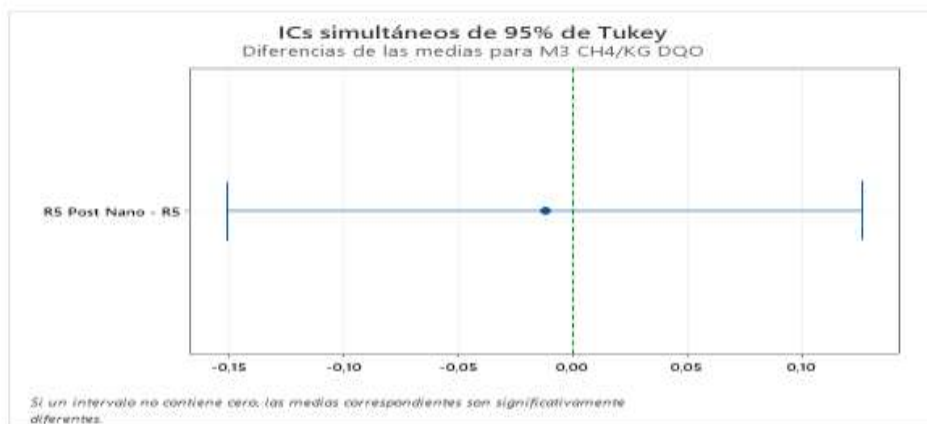
Desv.Est. agrupada = 0,147215

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R5	10	0,1012	A
R5 Post Nanos	10	0,0890	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



HOJA DE TRABAJO 2

ANOVA de un solo factor: M3 CH4/KG SV vs. REACTOR

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
REACTOR	2	R5; R5 Post Nanos

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
REACTOR	1	0,00019	0,000189	0,00	0,956
Error	18	1,10870	0,061594		
Total	19	1,10889			

Resumen del modelo

	S R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,248182	0,02%	0,00%

Medias

REACTOR	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R5	10	0,175	0,343	(0,010; 0,339)
R5 Post Nanos	10	0,1685	0,0741	(0,0036; 0,3333)

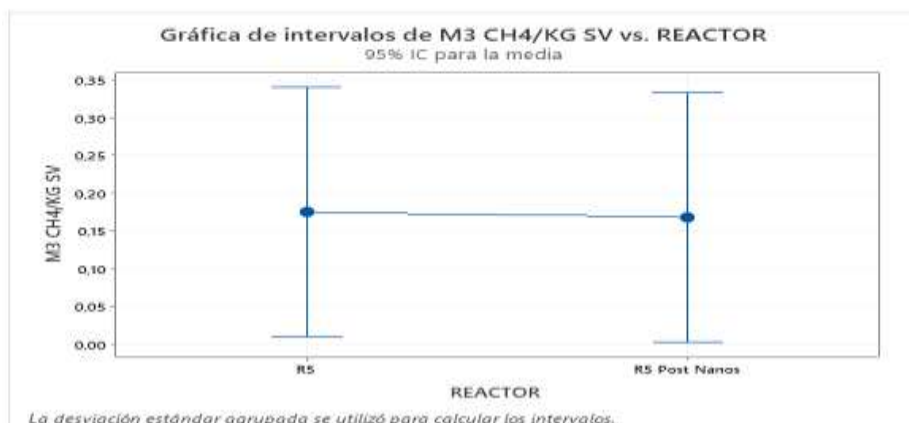
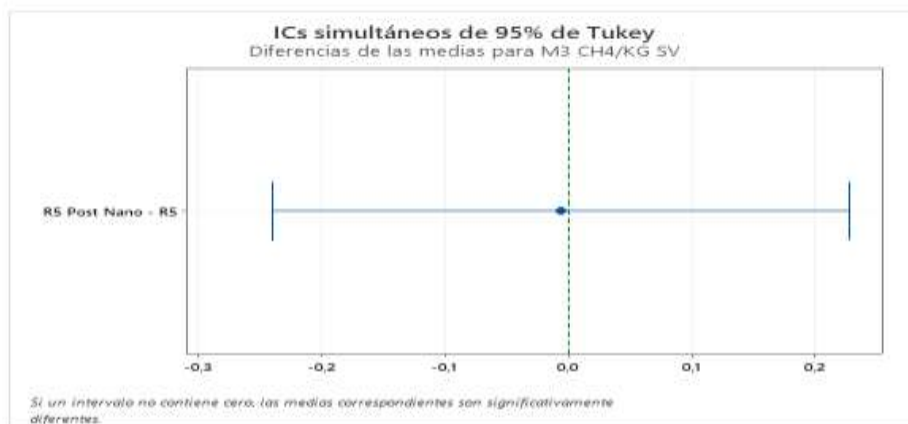
Desv.Est. agrupada = 0,248182

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

REACTOR	N	Media	Agrupación
R5	10	0,175	A
R5 Post Nanos	10	0,1685	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

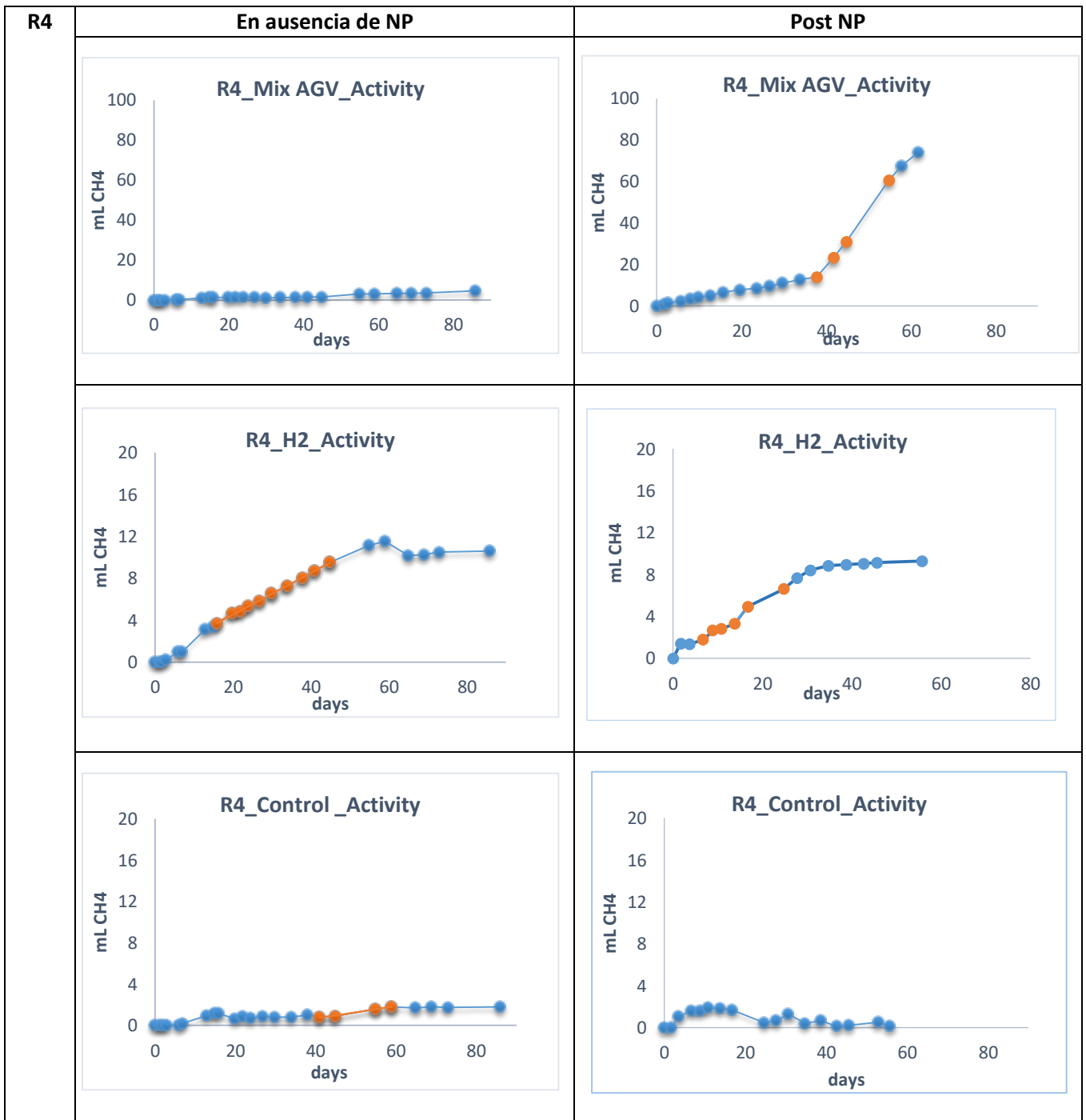


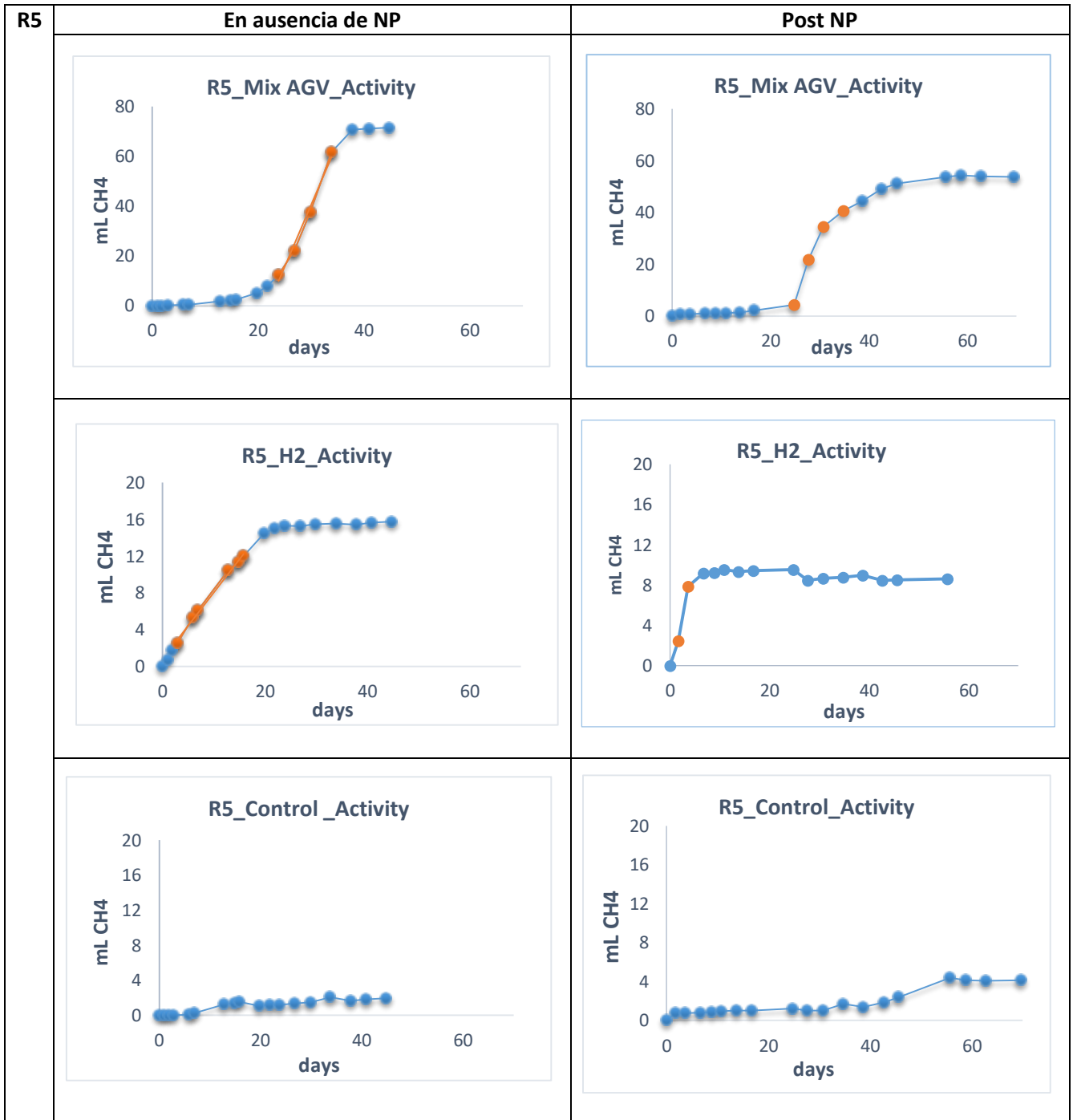
ANEJO 2: Gráficos de los ensayos de actividad



R2	En ausencia de NP	Post NP
	<p>R2_Mix AGV_Activity</p>	<p>R2_Mix AGV_Activity</p>
	<p>R2_H2_Activity</p>	<p>R2_H2_Activity</p>
	<p>R2_Control_Activity</p>	<p>R2_Control_Activity</p>







ANEJO 3: Resultados del análisis estadístico de los ensayos de actividad metanogénica



HOJA DE TRABAJO 3

ANOVA de un solo factor: MIX AGV vs. Reactores

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Reactores	5	R2; R2 Post Nanos; R4 Post Nanos; R5; R5 Post Nanos

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p.
Reactores	4	695,8	174,0	0,24	0,918
Error	81	59954,5	740,2		
Total	85	60650,4			

Resumen del modelo

S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
27,2062	1,15%	0,00%

Medias

Reactores	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R2	23	22,66	26,87	(11,37; 33,95)
R2 Post Nanos	14	28,30	33,31	(13,84; 42,77)
R4 Post Nanos	18	19,16	23,61	(6,40; 31,92)
R5	15	24,52	29,46	(10,54; 38,40)
R5 Post Nanos	16	22,62	23,12	(9,09; 36,15)

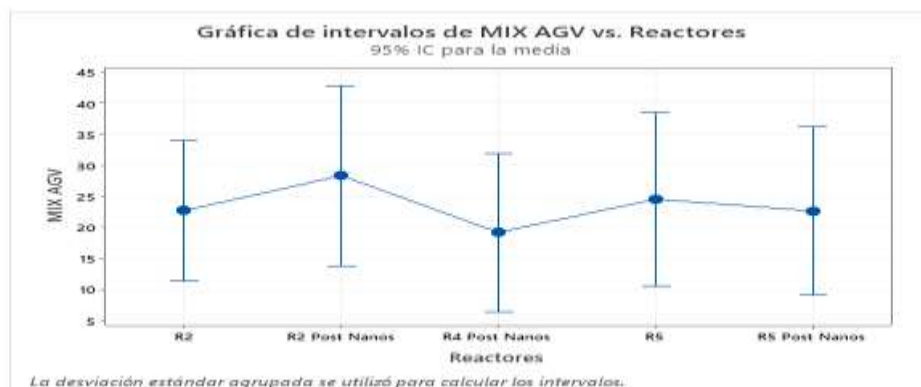
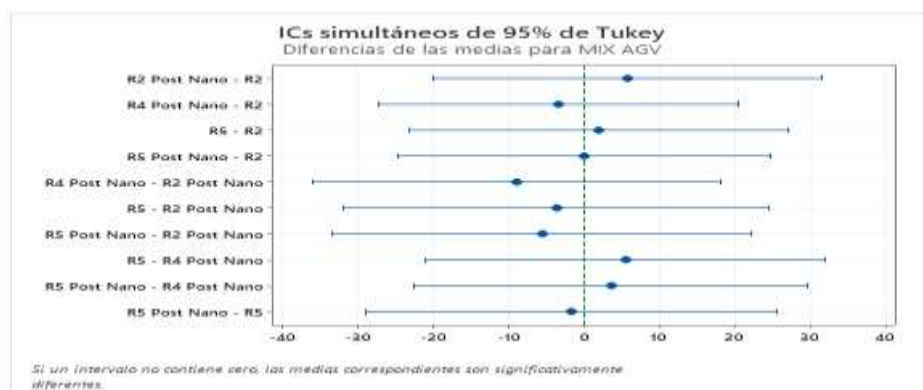
Desv.Est. agrupada = 27,2062

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Reactores	N	Media	Agrupación
R2 Post Nanos	14	28,30	A
R5	15	24,52	A
R2	23	22,66	A
R5 Post Nanos	16	22,62	A
R4 Post Nanos	18	19,16	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



HOJA DE TRABAJO 4

ANOVA de un solo factor: H2 vs. Reactores

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Reactores	6	R2; R2 Post nanos; R4; R4 Post nanos; R5; R5 Post nanos

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
Reactores	5	345,1	69,03	3,99	0,003
Error	82	1419,0	17,31		
Total	87	1764,2			

Resumen del modelo

	S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	4,15996	19,56%	14,66%
			8,34%

Medias

Reactores	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
R2	17	8,83	4,94	(6,82; 10,83)
R2 Post nanos	14	8,456	3,510	(6,244; 10,668)
R4	17	5,644	3,445	(3,637; 7,651)
R4 Post nanos	15	5,760	3,222	(3,623; 7,897)
R5	17	11,07	5,54	(9,06; 13,08)
R5 Post nanos	8	8,329	2,442	(5,403; 11,255)

Desv.Est. agrupada = 4,15996

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Reactores	N	Media	Agrupación
R5	17	11,07	A
R2	17	8,83	A B
R2 Post nanos	14	8,456	A B
R5 Post nanos	8	8,329	A B
R4 Post nanos	15	5,760	B
R4	17	5,644	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

