

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**OPCIÓN I.- TESIS**

**TRABAJO PROFESIONAL**

**“DIGESTIÓN ANAEROBIA DE EFLUENTES  
DE LA INDUSTRIA CITRÍCOLA”.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN  
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**PRESENTA:**

*M.C. Erik Samuel Rosas Mendoza*

**DIRECTOR DE TESIS:**

*Dr. Alejandro Alvarado Lassman*

**CODIRECTOR DE TESIS:**

*Dr. Juan Manuel Méndez Contreras*





FECHA: 20/02/2018  
DEPENDENCIA: POSGRADO  
ASUNTO: Autorización de Impresión  
OPCIÓN: I

**C. ERIK SAMUEL ROSAS MENDOZA**  
CANDIDATO A GRADO DE DOCTOR EN:  
**CIENCIAS DE LA INGENIERIA**

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

**"DIGESTION ANAEROBIA DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA CITRICOLA".**

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E

  
RUBEN POSADA GOMEZ

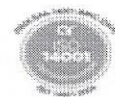
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**C.A. TITULACIÓN**



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
DE ORIZABA

ggc





FECHA : 06/02/2018

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

**C. RUBEN POSADA GOMEZ**  
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACION.  
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

**ERIK SAMUEL ROSAS MENDOZA**

la cual lleva el título de:

**"DIGESTION ANAEROBIA DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA CITRICOLA".**

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN  
SECRETARIO : DR. JUAN MANUEL MENDEZ CONTRERAS  
PRIMER VOCAL : DR. ALBINO MARTINEZ SIBAJA  
SEGUNDO VOCAL : DR. ALBERTO ALFONSO AGUILAR LASSERRE  
TERCER VOCAL : DR. ANSELMO OSORIO MIRON  
VOCAL SUP. : DR. CUAUHEMOC SANCHEZ RAMIREZ

FIRMA  
FIRMA  
FIRMA  
FIRMA  
FIRMA  
FIRMA  
FIRMA  
FIRMA  
FIRMA  
FIRMA

EGRESADO(A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

OPCION: I Tesis



---

---

## *DEDICATORIAS*

### *A Dios*

Mi buen y fiel Dios que siempre me acompañas, además de dedicarte este trabajo, te agradezco que me hayas guiado y enviado a tu Espíritu Santo para que derramara sus dones y talentos en mí, este triunfo es tuyo y te reconozco como mi Señor. Mi fortaleza, mi vida, mi Dios y mi todo; muchas gracias y con amor te consagro este trabajo de investigación para que siga siendo instrumento de tu paz en un área en la que puedo ayudar a la expansión de tu reino y en la que puedo cuidar de tu Creación. ¡Que todo viviente alabe al Señor! ¡Aleluya! Sal 150, 6.

### *A María*

Madre mía, madre siempre Virgen, agradezco tu poderosa intercesión, en todo momento sentí tu compañía, en los viajes y momentos difíciles ahí estabas, en las alegrías también estabas presente. Gracias por ser mi Madre y guardarme en tu regazo. Con amor te brindo este trabajo.

### *A Francisco*

Mi querido hermano Francisco de Asís, amigo de aventuras, bien sabes que eres mi inspiración y como santo patrono de la naturaleza y ecología, también te consagro esta tesis, Seráfico Padre, ruega por nosotros. Paz y Bien.

### *A mis padres y hermano*

Papá y mamá, una vez más lo logramos, sin ustedes nada de esto sería posible, bien saben todo el esfuerzo que hay detrás de esta investigación y junto a mi iban caminando, gracias por sus ánimos, pero, sobre todo, gracias por ser mis padres y darme la vida. Manolito, gracias por apoyarme y estar conmigo cuando te he necesitado, eres parte importante en este caminar. Los amo, con cariño les dedico este trabajo.

---

---

---

---

### *A mi familia*

A todos mis tíos y primos, gracias por sus palabras y por estar conmigo. Pasamos momentos duros en estos cuatro años, pero gracias a Dios seguimos adelante. Con todo mi cariño les brindo mi tesis.

### *A mi novia Melissa*

Amor, nos conocimos a la mitad de esta investigación, pero te tocó ver la parte más dura, gracias por tu paciencia, cariño incondicional y comprensión. Hemos pasado momentos difíciles, pero seguimos adelante. Gracias por haber llegado a mi vida. Te dedico mi tesis con todo mi amor.

### *A todos mis amigos*

Sería complicado nombrar a todos, pero bien saben que los quiero y son una parte fundamental en mi vida, gracias por escucharme y darme ánimos para seguir adelante. En especial gracias a mis amigos de Grupo Encuentro, Pastoral Juvenil Asís y Fuego de Dios, todos ustedes son un verdadero tesoro.

---

---

---

---

# AGRADECIMIENTOS

## *A la MIQ Norma Vallejo*

Muchas gracias maestra por sus consejos y apoyo, es usted una persona a quien estimo y le tengo especial cariño. Gracias por las facilidades que me dio para poder desarrollar este trabajo.

## *Al Dr. Alejandro Alvarado*

Esta es la segunda tesis en la que me dirijo a usted para darle las gracias por su dirección y asesoría, gracias por la confianza que me tuvo para culminar exitosamente esta investigación. Creo que hacemos buen equipo y que vengan más cosas y proyectos nuevos. Muchas gracias por todo, también sabe que lo respeto como investigador, pero también como persona, es usted un tipazo.

## *Al jurado*

Muchas gracias por las observaciones y asesorías para realización de este trabajo a los doctores: Juan Manuel Méndez, Albino Martínez, Alberto Aguilar y Anselmo Osorio.

## *A mis compañeros de laboratorio*

Agradezco a todas las generaciones de residentes y estudiantes de maestría que estuvieron desarrollando su investigación al mismo tiempo que yo, porque fueron parte importante. En especial, agradezco a los M.C. Roberto González y M.C. Sergio Reyes porque sus trabajos fueron muy importantes para el cumplimiento de objetivos de esta tesis y a las ingenieras I.Q. Ammysadai Vásquez, I.Q. Miriam Ibarra y I.Q. Marisol Niño.

---

---

---

---

*Al CONACYT*

Por la Beca Nacional de Posgrado (doctorado) ofrecida para la realización de esta investigación.

*A CITREX*

A la empresa Cítricos Ex S.A. de C.V., por dar las facilidades para la toma de muestras de efluentes industriales. Al Biol. Manuel Navarrete, por ser gestor y facilitador de información para la culminación de esta tesis.

---

---

---

---

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xii
NOMENCLATURA .....	xiv
INTRODUCCIÓN .....	1
ESTADO DEL ARTE .....	5
JUSTIFICACIÓN .....	8
APORTACIONES .....	10
HIPÓTESIS .....	11
OBJETIVOS .....	12
<b>CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	
1.1 Producción de cítricos mundial.....	14
1.2 Consumo de productos cítricos en México.....	14
1.2.1 Producción de cítricos en México .....	15
1.2.2 Producción de cítricos en Veracruz .....	17
1.3 Suministro y distribución nacional de productos cítricos .....	18
1.4 Procesamiento de cítricos.....	20
1.4.1 Naranja. Principal producto cítrico y su procesamiento .....	22
1.5 Contaminación de la industria citrícola .....	25
1.6 Terpenos y limoneno .....	25
1.6.1 D-Limoneno y sus propiedades .....	26
1.6.2 Composición química de aceites esenciales .....	29



	<b>Pág.</b>
1.7	Clasificación de los tratamientos de aguas residuales ..... 29
1.7.1	Operaciones físicas unitarias ..... 30
1.7.2	Procesos químicos unitarios ..... 30
1.7.3	Procesos biológicos unitarios ..... 30
1.8	Tratamiento anaerobio de aguas residuales ..... 31
1.8.1	Ventajas del tratamiento anaerobio ..... 31
1.9	Digestión anaerobia ..... 32
1.9.1	Parámetros de control en el proceso anaerobio ..... 33
1.9.2	Etapas de la digestión anaerobia ..... 38
1.9.3	Digestión anaerobia de efluentes de la industria citrícola ..... 42
1.10	Reactores de alta eficiencia o alta carga ..... 45
1.10.1	Reactor anaerobio de manto de lodos de flujo ascendente (UASB)... 46
1.10.2	Reactores de lecho fluidizado inverso (RLFI) ..... 47
1.11	Inhibición por D-Limoneno en la digestión anaerobia ..... 48
1.12	Modelos matemáticos en la digestión anaerobia ..... 49
 <b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1	Dispositivo experimental ..... 54
2.1.1	Parámetros de diseño de un Reactor Anaerobio Híbrido ..... 56
2.2	Sustratos ..... 58
2.3	Operación en modo continuo de un Reactor Anaerobio Híbrido ..... 59
2.4	Determinaciones analíticas ..... 61
2.4.1	Medición de pH..... 61
2.4.2	Demanda química de oxígeno (DQO <sub>T</sub> DQO <sub>S</sub> ) ..... 61
2.4.3	Sólidos totales y sólidos volátiles (ST y SV) ..... 62
2.4.4	Composición de biogás ..... 62

	<b>Pág.</b>
2.4.5 Determinación de materia volátil adherida (MVA) .....	62
2.5 Análisis energético .....	63
2.6 Preparación del efluente cítrico .....	64
2.7 Cinéticas batch de inhibición con D-limoneno .....	65
2.7.1 Inóculo .....	65
2.7.2 Sustrato .....	65
2.7.3 Inhibidor .....	65
2.7.4 Montaje experimental .....	66
2.7.5 Determinaciones analíticas .....	69
2.8 Determinación de parámetros biocinéticos .....	69
2.8.1 Modelo de Michaelis – Menten .....	70
2.8.2 Modelo de inhibición no competitiva .....	70
2.8.3 Modelo de inhibición no competitiva mixta .....	74
2.9 Modelación del consumo de sustrato .....	77
2.10 Validación de modelos matemáticos .....	79
 <b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
3.1 Diseño y construcción de un Reactor Anaerobio Híbrido .....	81
3.1.1 Estimación de parámetros de diseño de un Reactor Anaerobio Híbrido .....	83
3.2 Caracterización de sustratos .....	86
3.3 Arranque de un Reactor Anaerobio Híbrido .....	87
3.3.1 Sustrato .....	87
3.3.2 Inóculo .....	88
3.3.3 Operación inicial .....	89

	<b>Pág.</b>
3.4 Operación en modo continuo de un Reactor Anaerobio Híbrido .....	93
3.5 Análisis energético .....	98
3.6 Cinéticas batch de inhibición con D-limoneno .....	100
3.6.1 Evaluación de parámetros (pH, %DQO soluble removida y biogás) ..	100
3.6.2 Consumo de sustrato .....	107
3.6.3 Determinación de parámetros biocinéticos con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor .....	110
3.6.4 Determinación de parámetros biocinéticos con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor .....	114
3.7 Modelación del consumo de sustrato con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.....	117
3.7.1 Validación de modelos matemáticos .....	118
3.8 Modelación del consumo de sustrato con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.....	120
3.8.1 Validación de modelos matemáticos .....	121
CONCLUSIONES .....	125
RECOMENDACIONES .....	130
PRODUCTOS ACADÉMICOS.....	133
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
ANEXO A. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	154

---

---

## RESUMEN

### DIGESTIÓN ANAEROBIA DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA CITRÍCOLA

**Elaborada por:** M.C. Erik Samuel Rosas Mendoza

**Dirigida por:** Dr. Alejandro Alvarado Lassman

Esta investigación tiene como objetivo principal desarrollar y modelar los procesos de tratamiento de efluentes de la industria citrícola mediante un Reactor Anaerobio Híbrido, minimizando el efecto inhibitor del D-limoneno. Los objetivos particulares son: 1) diseñar, construir, arrancar y operar un reactor anaerobio híbrido para el tratamiento del efluente proveniente de la industria citrícola, 2) realizar pruebas en modo batch a diferentes concentraciones extremas de D-limoneno como agente inhibitor, tomando como base el caso de estudio de un efluente industrial, para comprender su mecanismo de inhibición e influencia en el tratamiento de un efluente cítrico y 3) estimar los parámetros biocinéticos de los modelos de inhibición no competitiva y no competitiva mixta en la fase líquida que representen la inhibición por D-limoneno.

El Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) está constituido por dos secciones, en la parte superior un lecho fijo y en la parte inferior un lecho fluidizado inverso. El medio de soporte es una arena sílica llamada Extendsphere™ con un diámetro de 170  $\mu\text{m}$ , un área de superficie específica de 20,000  $\text{m}^2/\text{m}^3$  y densidad de 0.69  $\text{kg}/\text{m}^3$ . El RAH se encuentra en un cuarto a temperatura controlada de  $35\pm 2$  °C, es decir; en un intervalo mesofílico. Para poder medir el efecto de inhibición que provoca el D-limoneno en la digestión anaerobia de los efluentes provenientes de la industria citrícola, se presentan ocho pruebas batch o cinéticas de degradación con diferentes concentraciones de D-limoneno (308, 616, 952, 1,904 y 2,856  $\text{mg}/\text{L}$ ) como inhibitor con relación sustrato/biomasa alrededor 0.35 en condiciones mesofílicas. Se muestran valores de los coeficientes biocinéticos  $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $K_{m\text{ ap}}$ ,  $V_{\text{max ap}}$ ,  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$  para los modelos de Michaelis – Menten y de inhibición no competitiva mixta.

---

---

El RAH se opera en modo continuo durante 70 días con alta carga orgánica (8 gDQO/Ld), alimentado con un efluente cítrico a base naranja. Presenta valores de pH cercanos a 7, remociones de DQO total y DQO soluble del 75 y 85% respectivamente, remociones de ST y SV del 42 y 53% respectivamente, así como rendimientos de metano alrededor de 0.15 LCH<sub>4</sub>/gDQO<sub>rem</sub> en condiciones estándares de temperatura y presión (TPS). En modo batch, cuando el D-limoneno es suministrado en concentraciones de 0, 308, 616 y 952 mg/L, se obtienen valores de pH igual a 6.92, 6.84, 6.80 y 6.61; remociones de DQO soluble del 82, 71, 60 y 57%; volúmenes de biogás de 313, 277, 244 y 195 mL con rendimientos de metano de 0.260, 251, 248 y 0.210 LCH<sub>4</sub> a TPS/gDQO<sub>s rem</sub>, respectivamente. Al aumentar las concentraciones de inhibidor a 952, 1,904 y 2,856 mg/L, el pH se acidifica llegando a 6.40, 6.30 y 6.04; las remociones de DQO soluble disminuyen a 58, 47 y 34%, respectivamente. Y cuando se deja de suministrar dosis de inhibidor, el pH incrementa sus niveles a 6.56, 6.44 y 6.44; mientras que la DQO soluble alcanza 60, 43 y 23% de remoción. Para los coeficientes biocinéticos: En concentraciones de inhibidor menores a 616 mg/L de D-limoneno, se obtienen valores de  $K_m = 1,144$  mg/L,  $V_{max}$  por debajo de 112 mg/Lh,  $K_{ii}$  en el intervalo de 330 – 4,500, y  $K_{ic}$  alrededor de 890 mg/L. Cuando se utilizan dosis por arriba de 952 mg/L de inhibidor, el valor de  $K_m$  es igual a 968 mg/L,  $V_{max}$  disminuye con relación a  $V_{max}$  del control y los valores de las constantes  $K_{ii} = K_{ic} = K_i = IC_{50} = 690, 261$  y 191 mg/L para 952, 1,904 y 2,856 mg/L de D-limoneno, respectivamente.

Se observa un efecto de inhibición por la presencia de D-limoneno en el efluente cítrico, ya que no se empleó pretratamiento para la eliminación de este aceite esencial, existiendo un efecto de decaimiento en los parámetros evaluados. Sin embargo, el tratamiento de efluentes cítricos por medio de digestión anaerobia se puede implementar a nivel piloto e industrial por medio de un RAH para generar y aprovechar una fuente de energía renovable como el biogás.

---

---

## ABSTRACT

### ANAEROBIC DIGESTION OF CITRUS INDUSTRY EFFLUENTS

**Prepared by:** M.C. Erik Samuel Rosas Mendoza

**Directed by:** Dr. Alejandro Alvarado Lassman

The main objective of this research is to develop and model the effluent treatment processes of the citrus industry using an Anaerobic Hybrid Reactor, minimizing the inhibitory effect of D-limonene. The specific objectives are: 1) to design, build, start and operate a hybrid anaerobic reactor for the treatment of effluent from the citrus industry, 2) to carry out batch tests at different extreme concentrations of D-limonene as an inhibiting agent, based on the case study of an industrial effluent, to understand its mechanism of inhibition and influence in the treatment of a citrus effluent and 3) to obtain the biokinetic parameters of the models of noncompetitive and noncompetitive inhibition mixed in the liquid phase that represent the inhibition by D-limonene.

An Anaerobic Hybrid Reactor was used, consisting of two sections, in the upper part a fixed bed and in the lower part a reverse fluidized bed. A silica sand called Extendsphere™ with a diameter of 170  $\mu\text{m}$ , a specific surface area of 20,000  $\text{m}^2/\text{m}^3$  and a density of 0.69  $\text{kg}/\text{m}^3$  as the support medium was used. The reactor was kept in a room at a controlled temperature of  $35 \pm 2$  °C. To measure the inhibition effect caused by D-limonene in the anaerobic digestion of effluents from the citrus industry, eight batch or kinetic degradation tests with different concentrations of D-limonene (308, 616, 952, 1,904 and 2,856  $\text{mg}/\text{L}$ ) as an inhibitor were developed, with substrate/biomass ratio around 0.35 in mesophilic conditions. The biokinetic coefficients  $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $K_{m\text{ ap}}$ ,  $V_{\text{max ap}}$ ,  $K_{ii}$  and  $K_{ic}$  for Michaelis – Menten and noncompetitive inhibition mixed models were determined.

---

---

In continuous mode during 70 days at high organic loading rate (8 gDQO/Ld) the AHR was operated, using a citrus effluent of orange. The pH values were close to 7; removals of total COD and soluble COD of 75 and 85% were obtained, respectively; removals of ST and SV of 42 and 53% were achieved, respectively and finally methane yields around 0.15 LCH<sub>4</sub> at STP/gDQO<sub>rem</sub> were obtained. In batch mode, when D-limonene was supplied in concentrations of 0, 308, 616 and 952 mg/L, pH values of 6.92, 6.84, 6.80 and 6.61 were obtained; 82, 71, 60 and 57% of soluble COD were removed; biogas volumes of 313, 277, 244 and 195 mL with methane yields of 0.260, 251, 248 and 0.210 LCH<sub>4</sub> at STP/gDQO<sub>rem</sub>, were achieved, respectively. By increasing the concentrations of inhibitor to 952, 1,904 and 2,856 mg/L, the pH tended to acidification reaching 6.40, 6.30 and 6.04; the soluble COD removals decreased to 58, 47 and 34%, respectively. And when they stopped giving doses of inhibitor, the pH managed to increase its levels to 6.56, 6.44 and 6.44; while the soluble COD reached 60, 43 and 23% of removal. For biokinetic coefficients: in inhibitor concentrations less than 616 mg/L of D-limonene,  $K_m = 1,144$  mg/L,  $V_{max}$  below 112 mg/Lh,  $K_{ii}$  in the range of 330 – 4,500, and  $K_{ic}$  around 890 mg/L. Using doses above 952 mg/L of inhibitor, the value of  $K_m$  is equal to 968 mg/L,  $V_{max\ ap}$  decreases in relation to  $V_{max}$  of the control and the values of the constants  $K_{ii} = K_{ic} = K_i = IC_{50} = 690, 261$  and 191 mg/L for 952, 1,904 and 2,856 mg/L of D-limonene, respectively.

An inhibition effect is observed due to the presence of D-limonene in the citrus effluent, since pretreatment was not used for the elimination of this essential oil, there being a decay effect in the parameters evaluated. However, the treatment of citrus effluents by means of anaerobic digestion can be implemented at the pilot and industrial level through a AHR to generate and take advantage of a renewable energy source such as biogas.

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1.1	Principales estados productores de cítricos en México.	15
1.2	% de producción de cítricos en México del año 2009 al 2013.	16
1.3	Producción de cítricos en Veracruz de 2009 a 2013.	17
1.4	% de producción de cítricos en Veracruz de 2009 a 2013 respecto a la producción nacional.	18
1.5	Suministro de productos cítricos en México de 2010 a 2013.	19
1.6	Distribución de cítricos en México de 2010 a 2013 en materia de exportación, procesamiento y consumo.	20
1.7	% de naranja destinada a su procesamiento de 2000 al 2013.	22
1.8	Diagrama de proceso de la naranja.	24
1.9	Proceso de digestión anaerobia.	32
1.10	Clasificación de los procesos de tratamiento anaerobio.	46
1.11	Esquema simplificado de digestión anaerobia.	51
2.1	Componentes del Reactor Anaerobio Híbrido.	55
2.2	Metodología para la preparación del efluente cítrico.	64
2.3	Reactor anaerobio batch: a) Toma de muestras, b) Cuantificación de biogás.	68
2.4	Representación del comportamiento de inhibición no competitiva. Velocidad de reacción vs Concentración de sustrato.	73
2.5	Diagrama de dobles recíprocos o diagrama de Lineweaver – Burk para inhibición no competitiva.	73
2.6	Diagrama de dobles recíprocos o diagrama de Lineweaver – Burk para inhibición no competitiva mixta.	75
3.1	Reactor Anaerobio Híbrido (a) lecho fijo y (b) lecho fluidizado inverso.	81



<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
3.2	DQO removida y producción de AGV's en un reactor de hidrólisis a escala piloto.	87
3.3	Rendimiento de metano basado en la DQO removida.	89
3.4	Valores de pH del RAH.	90
3.5	Porcentajes de remoción de DQO total del RAH.	91
3.6	Eficiencias de remoción de ST y SV.	92
3.7	Tendencia de pH durante la operación del RAH.	93
3.8	Eficiencias de remoción de DQO total y soluble.	95
3.9	Rendimientos de metano.	97
3.10	Tendencia energética y económica a partir de la generación de biogás.	99
3.11	Comportamiento de pH. a) Experimento 1, b) Experimento 2, c) Experimento 3 y d) Experimento 4.	101
3.12	Evaluación del porcentaje de DQO soluble removida. a) Experimento 1, b) Experimento 2, c) Experimento 3 y d) Experimento 4.	103
3.13	Monitoreo en la producción de biogás. a) Experimento 1, b) Experimento 2, c) Experimento 3 y d) Experimento 4.	106
3.14	Perfil de degradación experimental de sustrato vs tiempo a) Cinética 1, b) Cinética 2, c) Cinética 3, d) Cinética 4 y e) Cinética 5.	108
3.15	Perfil de degradación experimental de sustrato vs tiempo. Aumento de dosis de inhibidor. Cinética 6.	109
3.16	Perfil de degradación experimental de sustrato vs tiempo. Sin inhibidor. a) Cinética 7 y b) Cinética 8.	110
3.17	Patrón de inhibición no competitiva y no competitiva mixta de los datos experimentales de la cinética 5. Diagrama de Lineweaver – Burk.	111

---

---

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
3.18	Patrón de inhibición no competitiva mixta de los datos experimentales de la cinética 6. Diagrama de Lineweaver – Burk.	114
3.19	Consumo de sustrato respecto al tiempo, datos experimentales y datos modelados con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.	118
3.20	Datos modelados vs datos experimentales con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.	119
3.21	Consumo de sustrato respecto al tiempo, datos experimentales y datos modelados con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.	120
3.22	Datos modelados vs datos experimentales con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.	121

---

---

---

---

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Evolución del estado del arte en reactores para el tratamiento de aguas residuales.	5
2	Evolución del estado del arte en el desarrollo de modelos matemáticos aplicados a la digestión anaerobia de residuos cítricos.	7
1.1	Producción de cítricos en México de 2009 a 2013.	16
1.2	Capacidad de molienda de cítricos, México 2009.	21
1.3	Propiedades del D-Limoneno.	27
1.4	Composición de biogás.	36
1.5	Gases orgánicos producidos a través de la actividad microbiana en la digestión anaerobia	37
1.6	Gases inorgánicos producidos a través de la actividad microbiana en la digestión anaerobia.	38
1.7	Rendimiento de metano y eficiencias utilizando diferentes condiciones de operación en reactores anaerobios.	44
2.1	Parámetros evaluados en el efluente cítrico.	58
2.2	Etapas de operación del RAH.	60
2.3	Composición de macro y micronutrientes.	61
2.4	Diseño de fase experimental en las cinéticas de inhibición. Cinéticas 1 a la 5.	67
2.5	Diseño de fase experimental en las cinéticas de inhibición. Cinéticas 6.	67
2.6	Diseño de fase experimental en las cinéticas sin inhibidor. Cinética 7 y 8.	67
3.1	Dimensiones del LF.	82
3.2	Dimensiones del RLFI.	82

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
3.3	Distribución porcentual del RLFI.	83
3.4	Caudal de alimentación (L/d) del RAH.	83
3.5	TRH (h) del RAH.	84
3.6	$v_d$ (m/h) del RAH.	84
3.7	$S_0/X_0$ (gDQO/gSVLh) del RAH.	85
3.8	Caracterización de sustratos empleados en la operación del RAH.	86
3.9	Coefficientes biocinéticos experimentales con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.	112
3.10	Coefficientes biocinéticos optimizados con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.	112
3.11	Coefficientes biocinéticos experimentales con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.	115
3.12	Coefficientes biocinéticos optimizados con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.	117
3.13	Coefficientes de correlación de los datos modelados vs datos experimentales con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.	119
3.14	Coefficientes de correlación de los datos modelados vs datos experimentales con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.	121

---



---

## NOMENCLATURA

%	Por ciento
AGV's	Ácidos grasos volátiles
Btu	Unidad térmica británica
C	Carbono
°C	Grado centígrado
cm	Centímetro
Cva	Carga volumétrica aplicada
d	Día
DBO <sub>5</sub>	Demanda bioquímica de oxígeno a los 5 días
g	Gramo
DQO <sub>T</sub>	Demanda química de oxígeno total
DQO <sub>s</sub>	Demanda química de oxígeno soluble
ft <sup>3</sup>	Pie cúbico
h	Hora
IFBR (RLFI)	Reactor de lecho fluidizado inverso
in	Pulgada
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición
K <sub>ic</sub>	Constante de inhibición que afecta unión inhibidor - enzima
K <sub>ii</sub>	Constante de inhibición que afecta inhibidor complejo ES
kg	Kilogramo
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
kWh	Kilowatt por hora
L	Litro
LF	Lecho fijo
µg	Microgramo
mg	Miligramo

mL	Mililitro
m	Metro
mm	Milímetro
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
MVA	Materia volátil adherida
N	Nitrógeno
NTK	Nitrógeno total Kjeldhal
pH	Potencial de hidrógeno
rem	Removidos
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub>	Relación sustrato/biomasa
t	Tiempo
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
TRC	Tiempo de retención celular
UASB	Reactor anaerobio de manto de lodos de flujo ascendente
V <sub>d</sub>	Velocidad descensional
Y	Rendimiento de metano

---

---

## INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales productores de cítricos, ocupa el cuarto lugar a nivel mundial con aproximadamente 7.4 millones de toneladas anuales, de las cuales 4.08 toneladas corresponden a naranja (SIAP, 2015). Para México, la citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional, la geografía productiva se encuentra bien definida, 91% de la producción total está concentrada en sólo 10 estados (SIAP, 2015). Veracruz es el principal productor de cítricos aportando el 47% de la producción total del país y el 49% de la producción nacional de naranja (SIAP, 2015). Derivado del procesamiento de estos productos, se desechan grandes volúmenes de efluentes con altas cargas de materia orgánica y bajos niveles de pH, por lo que su tratamiento inadecuado y disposición final provocan cambios fisicoquímicos en suelos y cuerpos receptores de aguas, teniendo un impacto negativo en el medio ambiente. De acuerdo con datos obtenidos, una planta procesadora de cítricos ubicada en la parte norte del Estado de Veracruz, por cada tonelada de naranja procesada se desechan de 0.79 a 1.25 m<sup>3</sup> de efluentes industriales (Rosas-Mendoza *et al.*, 2017). Mientras que otras investigaciones reportan que por cada tonelada de fruta procesada se generan de 1.58 a 3 m<sup>3</sup> de agua residual (Koppar y Pullammanappallil, 2013; Antonio-Quaia, 2011), estos volúmenes varían dependiendo de las condiciones de operación de cada planta. Aunado a esto, la industria cítrica presenta graves problemas sociales debido a la generación de malos olores y atracción de vectores por los grandes volúmenes de residuos que genera. Como consecuencia, esta industria sufre problemas económicos por pago de elevadas multas debido a los impactos negativos en cuerpos receptores de aguas y en suelos.

Por sus características fisicoquímicas, este tipo de efluentes son viables para tratarse por medio de digestión anaerobia buscando reducir su carga orgánica contaminante, además de obtener un producto con valor agregado como el biogás. La digestión anaerobia puede ser definida como la conversión biológica de la materia orgánica a una variedad de productos finales como el biogás, el cual está constituido por metano,

---

---

dióxido de carbono, nitrógeno, hidrógeno, ácido sulfhídrico y oxígeno (Speece, 1983; Nutiu, 2014). La degradación de la materia orgánica tiene lugar en 3 etapas: hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis hasta la obtención de biogás (Gerardi, 2003). Para que el proceso de digestión anaerobia se lleve a cabo adecuadamente, se deben mantener controlados parámetros como temperatura, pH, concentración de sustrato, concentración de nutrientes, (Behera *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2010) y concentración de compuestos tóxicos como el D-limoneno (García-Gonzalo *et al.*, 2013).

Los usos potenciales del biogás incluyen: calefacción, generación combinada de calor y electricidad, combustible de transporte o como mejorador de la calidad de gas natural para diversas aplicaciones (Pöschl *et al.*, 2010; SENER, 2015; Surendra *et al.*, 2014; Markou *et al.*, 2017). La composición del biogás varía dependiendo del sustrato a degradar, en general, el biogás contiene en 50 - 75% de CH<sub>4</sub> y 25 - 50% de CO<sub>2</sub> junto con otros componentes como vapor de agua (H<sub>2</sub>O), ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) y el amoníaco (NH<sub>3</sub>). El CH<sub>4</sub> es el único compuesto del biogás que contribuye con un aporte energético. Por ejemplo, 1 m<sup>3</sup> de biogás a temperatura y presión de estándar que contiene 60% de CH<sub>4</sub> tiene un poder calorífico de 21.5 MJ (equivalente a 5.97 kWh de electricidad) comparado con 1 m<sup>3</sup> de CH<sub>4</sub> a temperatura y presión de estándar que tiene un poder calorífico de 35.8 MJ (equivalente a 9.94 kWh de electricidad) (Muyllaert *et al.*, 2000).

Se han realizado algunas investigaciones empleando reactores anaerobios para el manejo de altas cargas orgánicas, Alvarado-Lassman *et al.* (2008) utilizaron un reactor de lecho fluidizado inverso con biopelícula para la degradación de un efluente proveniente de una cervecería, alcanzando cargas orgánicas superiores a 70 gDQO/Ld y obteniendo remociones de DQO superiores al 90% con rendimientos de metano cercanos 0.3 LCH<sub>4</sub> a TPS/gDQO<sub>rem</sub>. Rico *et al.* (2015), realizaron el tratamiento de suero de leche y fracción líquida de estiércol vacuno en un reactor de flujo ascendente a una carga orgánica de 28.7 gDQO/Ld, logrando remociones de DQO de 95.1% y rendimientos de metano de 0.34 LCH<sub>4</sub> a TPS/gDQO<sub>rem</sub>. A su vez, también se han



---

---

reportado algunos trabajos de digestión anaerobia utilizando residuos líquidos y sólidos cítricos como: Siles *et al.* (2007), realizaron la digestión anaerobia de un agua residual proveniente del prensado de cáscara de naranja, donde se alcanzó un rendimiento de metano de 295 mLCH<sub>4</sub> a TPS/gDQO removido, eliminando con un pretratamiento el D-limoneno presente en el agua residual. Martín *et al.* (2010), realizaron la biometanización de cáscara de naranja eliminando con un pretratamiento el D-limoneno presente, obteniendo 0.27 - 0.29 LCH<sub>4</sub> a TPS/gDQO<sub>adicionada</sub>. Calabrò *et al.* (2016), obtuvieron 370 LCH<sub>4</sub> a TPS/kgSV en condiciones mesofílicas en la biometanización de cáscara de naranja, utilizando diferentes concentraciones de D-limoneno.

Algunas investigaciones indican que la digestión anaerobia con efluentes cítricos es difícil de llevar a cabo por la presencia de D-limoneno y por las altas concentraciones de materia orgánica, por tal motivo han optado por: utilizar reactores convencionales y con cultivos en suspensión, eliminar el D-limoneno del agua residual mediante pretratamiento y operar los reactores a Cva menores a 5 gDQO/Ld en modo semi-continuo y batch a tiempos de residencia hidráulica mayores a un día (Valdés *et al.*, 1994; Martín *et al.*, 2010b; Koppa y Pullamimanappallil, 2013).

Esta investigación tiene como objetivo principal desarrollar y modelar los procesos de tratamiento de efluentes de la industria citrícola mediante un reactor anaerobio híbrido, minimizando el efecto inhibitor del D-limoneno. Como objetivos particulares: 1) diseñar, construir, arrancar y operar un Reactor Anaerobio Híbrido para el tratamiento del efluente proveniente de la industria citrícola, 2) realizar pruebas en modo batch a diferentes concentraciones extremas de D-limoneno como agente inhibitor, tomando como base el caso de estudio de un efluente industrial, para comprender su mecanismo de inhibición e influencia en el tratamiento de un efluente cítrico y 3) estimar los parámetros biocinéticos de los modelos de inhibición no competitiva y no competitiva mixta en la fase líquida que representen la inhibición por D-limoneno.

---

---

Las aportaciones que se ofrecen son: 1) una alternativa de tratamiento de los efluentes de la industria cítrica basada en la utilización de un Reactor Anaerobio Híbrido aprovechando su capacidad en el manejo de altas cargas orgánicas y su configuración espacial para minimizar los efectos inhibitorios del D-limoneno y 2) un estudio cinético detallado para la comprensión y optimización del proceso de tratamiento de efluentes cítricos, mediante la estimación de parámetros biocinéticos de un modelo matemático de inhibición para digestión anaerobia utilizando D-limoneno como agente inhibidor.

## ESTADO DEL ARTE

Se han desarrollado diversas aplicaciones y dispositivos para la digestión anaerobia de una amplia variedad de sustratos (aguas residuales), sin embargo; no se ha presentado algún trabajo que conjunte la degradación de un sustrato difícil de tratar biológicamente como los efluentes cítricos debido a la presencia de D-limoneno que es un inhibidor natural y constituyente de los cítricos, con el manejo de altas concentraciones del mismo sustrato.

Tabla 1. Evolución del estado del arte en reactores para el tratamiento de aguas residuales.

	Reactores convencionales			Reactores de alta carga		
Autor/Año	Valdés <i>et al.</i> (1994)	Martín <i>et al.</i> (2010b)	Koppar y Pullamimanappallil (2013)	Alvarado-Lassman <i>et al.</i> (2008)	Rico <i>et al.</i> (2015)	Presente trabajo
<b>Tipo de reactor</b>	Lecho fijo de flujo ascendente	Tanque completamente agitado	Flujo estacionario descendente de biopelícula fija	Lecho fluidizado inverso	Flujo ascendente	Reactor Anaerobio Híbrido
<b>Soporte</b>	Anillos Raschig	----	----	Extendosphere	----	Tubos poliméricos / Extendosphere
<b>Operación</b>	Semicontinuo	Batch	Continuo	Continuo	Continuo	Continuo
<b>Escala</b>	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio
<b>Sustrato</b>	Residual diluido de jugo concentrado de naranja	Agua residual del proceso de prensado de naranja	Agua residual del proceso de prensado de naranja	De cervecería	Suero de leche y fracción líquida de estiércol vacuno	Efluente cítrico
<b>Pretratamiento</b>	No	Sulfato de aluminio	----	No	Cloruro férrico y poliacrilamida catiónica	No
<b>Nutrientes</b>	Si	Si	----	Si	Si	Si
<b>Cva (gDQO/Ld)</b>	0.312 – 4.175	1.5 – 5 gDQO	0.51	>70	28.7	8
<b>T (°C)</b>	----	37	55	35	35	35
<b>TRH (días)</b>	1 – 4	2 – 3	16	<1	1.3	<1
<b>DQO rem (%)</b>	77.5 – 97.2	84	----	>90	95.1	75 – 85
<b>Y (LCH<sub>4</sub> / g DQO<sub>rem</sub>)</b>	0.3 – 0.381	0.297	0.238	~0.3	0.34	0.15

---

---

En la Tabla 1, se muestran las diferentes condiciones de operación en el uso de reactores biológicos y se observa que a inicios de la década de los 90's comienza a llevarse a cabo el tratamiento de efluentes cítricos en reactores convencionales, es decir; reactores con biomasa en suspensión. Mientras que, en reactores de alta carga implementados una década después, no se había realizado el tratamiento de efluentes cítricos. Este tipo de reactores al ser de biomasa fija, minimizan los efectos de inhibición de cualquier sustancia. El presente trabajo ofrece una novedosa alternativa para tratar biológicamente este tipo de efluentes, con altas cargas orgánicas en relación con trabajos anteriores, sin realizar pretratamiento para eliminación de D-limoneno y logrando obtener altas remociones de materia orgánica con altos rendimientos metano en tiempos menores de tratamiento.

Por otro lado, en términos del estudio de efecto de inhibición que provoca el D-limoneno en la digestión anaerobia de residuos cítricos, Siles *et al.* (2008) y Martín *et al.* (2010b) realizaron estudios cinéticos en la degradación de agua residual proveniente de la industria citrícola, sin embargo; el fenómeno de inhibición lo atribuyen a la concentración del sustrato, ya que por pretratamiento eliminaron el D-limoneno. Mientras que Calabrò *et al.* (2016) y Begoña y Flotats (2016), analizaron el efecto de inhibición, pero en cáscara de naranja, suministrando dosis altas de D-limoneno, sin desarrollar o estudiar algún modelo matemático que represente este fenómeno.

En la Tabla 2, se presentan las condiciones experimentales usadas por diferentes investigadores en la aplicación de digestión anaerobia de residuos cítricos. El presente trabajo se enfoca en estudiar la inhibición por D-limoneno en la fase líquida (efluente cítrico), en donde por medio de los datos experimentales, se aplicarán dos modelos matemáticos y así obtener los coeficientes biocinéticos que permitirán modelar el proceso de consumo de sustrato en presencia de D-limoneno.

Tabla 2. Evolución del estado del arte en el desarrollo de modelos matemáticos aplicados a la digestión anaerobia de residuos cítricos.

<b>Autor/Año</b>	<b>Siles et al. (2008)</b>	<b>Martín et al. (2010b)</b>	<b>Calabrò et al. (2016)</b>	<b>Begoña y Flotats (2016)</b>	<b>Presente trabajo</b>
<b>Tipo de reactor</b>	Tanque complemente agitado	Tanque complemente agitado	Biodigestores comerciales		Reactor complemente agitado
<b>Modo de operación</b>	Batch	Batch	Batch	Batch	Batch
<b>Escala</b>	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio
<b>Sustrato</b>	Agua residual del proceso de prensado de naranja	Agua residual del proceso de prensado de naranja	Cáscara de naranja (codigestión con residuos municipales)	Cáscara de naranja	Efluente cítrico
<b>Pretratamiento del sustrato</b>	Sulfato de aluminio	Sulfato de aluminio	Si	No	No
<b>Nutrientes requeridos</b>	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Concentración inicial sustrato</b>	2 – 5 g DQO	1.5 – 5 g DQO	1.189 g DQO/g ST	0.122 g/kg	~ 3 g DQO
<b>Concentración D-limoneno</b>	-	-	200 – 2,000 mg/L	50 – 3,000 mg/kg	308 – 2,856 mg/L
<b>T (°C)</b>	35	35	35 y 55	35	35
<b>TRH</b>	48 horas	48 horas	30 días	28	72 horas
<b>Modelo matemático</b>	Modelo cinético simplificado	Basado en 6 ecuaciones diferenciales	-	Experimental	Michaelis – Menten / Inhibición no competitiva
<b>Parámetros biocinéticos</b>	$K_0, K_1$ y $K_2$	$K_0, K_1, K_2, K_3, K_4, K_5$ y $K_6$	-	$IC_{50}$	$K_m, V_{max}, K_{m\ ap}, V_{max\ ap}, K_{ii}$ y $K_{ic}$
<b>Desviación (exp vs mod)</b>	< 20%	< 20%	-	-	< 18%
<b>Biodegradabilidad (%)</b>	-	84	Mesofílico (cerca a 100) Termofílico (70 – 78)	84 – 95	57 – 82
<b>Y en condiciones estándar de T y P</b>	0.295 $LCH_4/gDQO_{rem}$	0.297 $LCH_4/gDQO_{rem}$	Mesofílico (0.370 $LCH_4/gSV$ ) Termofílico (0.300 $LCH_4/gSV$ )	0.354 – 0.398 $LCH_4/gSV$	0.210 – 0.260 $LCH_4/gDQO_{rem}$

---

---

## JUSTIFICACIÓN

La industria cítrica ha mantenido un crecimiento continuo en el procesamiento de jugos naturales y concentrados, lo que conlleva al incremento en la generación de residuos sólidos y efluentes industriales con altas concentraciones de materia orgánica, aunado a esto su bajo nivel de pH, el desequilibrio de nutrientes y las enormes variaciones en sus flujos han provocado que a la fecha no se tenga una solución adecuada para este tipo de contaminantes. De acuerdo con los datos proporcionados por una planta procesadora de cítricos, en México se pueden generar anualmente alrededor de 1.7 millones de m<sup>3</sup> de este tipo de aguas residuales, siendo un dato conservador, de los cuales el estado de Veracruz contribuye con un 59%, lo que corresponde a 1 millón de m<sup>3</sup>; seguido por los estados de Tamaulipas (18% = 0.306 millones de m<sup>3</sup>), Nuevo León (11% = 0.187 millones de m<sup>3</sup>), San Luis Potosí (5% = 0.085 millones de m<sup>3</sup>), Tabasco (4% = 0.068 millones de m<sup>3</sup>) y Yucatán (3% = 0.052 millones de m<sup>3</sup>).

La mayoría de los residuos líquidos de la industria cítrica se vierten al suelo y al agua, lo que provoca cambios físicos y químicos, malos olores y contaminación de las aguas subterráneas y superficiales, impactando al medio ambiente y afectando la economía de las industrias procesadoras por pago de multas derivadas de las excesivas cargas contaminantes, además de ser un problema ambiental también es un problema social por la atracción de fauna nociva. Aunado a esto, la presencia de D-limoneno puede dificultar el tratamiento de este tipo de efluentes. La digestión anaerobia puede resultar una alternativa viable para el tratamiento de estos efluentes, ya que ha demostrado su eficacia en la degradación de diversos residuos sólidos y líquidos con la ventaja de la generación de biogás como producto de valor agregado.

Además de esto y de acuerdo con diferentes investigaciones reportadas, existe la necesidad de implementar un dispositivo que pueda tratar grandes volúmenes de efluentes cítricos en tiempos cortos de residencia hidráulica (menores a un día) y con

---

---

altas cargas orgánicas (8 gDQO/Ld), obteniendo altas remociones de materia orgánica (alrededor del 75%) y considerables rendimientos de metano (0.15 LCH<sub>4</sub> a TPS/gDQO<sub>rem</sub>), sin sufrir efectos importantes por inhibición de D-limoneno. Por otro lado, para entender con mayor profundidad la inhibición provocada por el D-limoneno, es necesario realizar un estudio cinético que permita observar la degradación de materia orgánica en presencia de este aceite esencial y así encontrar los parámetros biocinéticos que aplicados a un modelo matemático describan este comportamiento.

---

---

## APORTACIONES

Las aportaciones de este trabajo son:

- Una alternativa de tratamiento de los efluentes de la industria cítrica basada en la utilización de un Reactor Anaerobio Híbrido aprovechando su capacidad en el manejo de altas cargas orgánicas y su configuración espacial para minimizar los efectos inhibitorios del D-limoneno.
- Un estudio cinético detallado para la comprensión y optimización del proceso de tratamiento de efluentes cítricos, mediante la estimación de parámetros biocinéticos de un modelo matemático de inhibición para digestión anaerobia utilizando D-limoneno como agente inhibidor.



---

---

## **HIPÓTESIS**

Con base en el conocimiento de las cinéticas de degradación de contaminantes en presencia de inhibidores tales como D-Limoneno y la evaluación de los parámetros que la afectan como temperatura, pH, concentración de contaminantes y generación de biogás, es posible modelar y diseñar procesos eficientes para la remoción de contaminantes en los residuos generados por la industria citrícola

---

---

## OBJETIVOS

### General

Desarrollar y modelar los procesos de tratamiento de efluentes de la industria citrícola mediante un Reactor Anaerobio Híbrido, minimizando el efecto inhibitor del D-limoneno.

### Particulares

1. Diseñar, construir, arrancar y operar un Reactor Anaerobio Híbrido para el tratamiento del efluente proveniente de la industria citrícola.
2. Realizar pruebas en modo batch a diferentes concentraciones extremas de D-limoneno como agente inhibitor, tomando como base el caso de estudio de un efluente industrial, para comprender su mecanismo de inhibición e influencia en el tratamiento de un efluente cítrico.
3. Estimar los parámetros biocinéticos de los modelos de inhibición no competitiva y no competitiva mixta en la fase líquida que representen la inhibición por D-limoneno.

# *CAPÍTULO 1*

## *FUNDAMENTOS TEÓRICOS*

---

---

## 1.1 PRODUCCIÓN DE CÍTRICOS MUNDIAL

Los dos mayores productores de cítricos son Brasil y Estados Unidos, participando respectivamente con el 21.4% y 12.5% de la producción mundial. Siguen en orden de importancia China, México, España e India, representando en conjunto el 27.6 % del total mundial Otros productores que merecen mencionarse son Irán, Argentina, Egipto y Turquía (Martín *et al.*, 2010a; Viuda-Martos *et al.*, 2011). Se podrá advertir que, aunque la citricultura se extiende entre varios países, la producción y el comercio revelan un cierto grado de concentración.

## 1.2 CONSUMO DE PRODUCTOS CÍTRICOS EN MÉXICO

La demanda de jugos tanto en Estados Unidos como en México está ligada de manera directa al nivel de ingresos de sus consumidores, donde a mayor ingreso mayor consumo del producto. Para el caso de México, se ha identificado que la clase social baja, lo consume en los hogares como jugo recién exprimido, la clase media lo consume en hogares, restaurantes y puestos ambulantes y la clase alta tiene la posibilidad de adquirirlo ya procesado para ser consumido en sus hogares, lo que corresponde al 59.13, 39.16 y 1.71% respectivamente de la población (INEGI, 2015). Es importante hacer mención que los cambios en los estilos de vida reflejan que la población tiende a ocupar menos tiempo en la preparación de sus alimentos, lo que ha repercutido en el aumento de la demanda de los jugos procesados. Bajo este escenario, México tendría que aumentar sus exportaciones actuales de jugo en cerca del 100 % en los próximos 10 años y aumentar su capacidad instalada de procesamiento a un ritmo de 1 juguera de 30,000 lb (13,607.77 kg) de evaporación cada dos años. Es evidente que lo anterior exige una importante acción de fomento tecnológico, orientada a mejorar la productividad y la disponibilidad de la materia prima a procesar, además de buscar alternativas para la disposición final de los residuos sólidos y efluentes generados durante el procesamiento de productos cítricos.

### 1.2.1 Producción de cítricos en México

Los cítricos constituyen un producto agrícola básico en México y forman parte importante de la dieta de la población. Se estima que de la actividad citrícola nacional dependen más de 90,000 familias mexicanas, quienes desarrollan su actividad en 571,959.77 ha sembradas de las cuales se cosecha el 90.52%, generando 7,897,980.75 T de naranja, limón, piña, toronja y tangerina, con un valor de producción de 1,023,123.69 USD, de acuerdo a los datos más recientes del año 2013 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México (SIAP, 2015). En la Figura 1.1 se observa la distribución geográfica y en orden de producción de cítricos de los estados líderes en México.

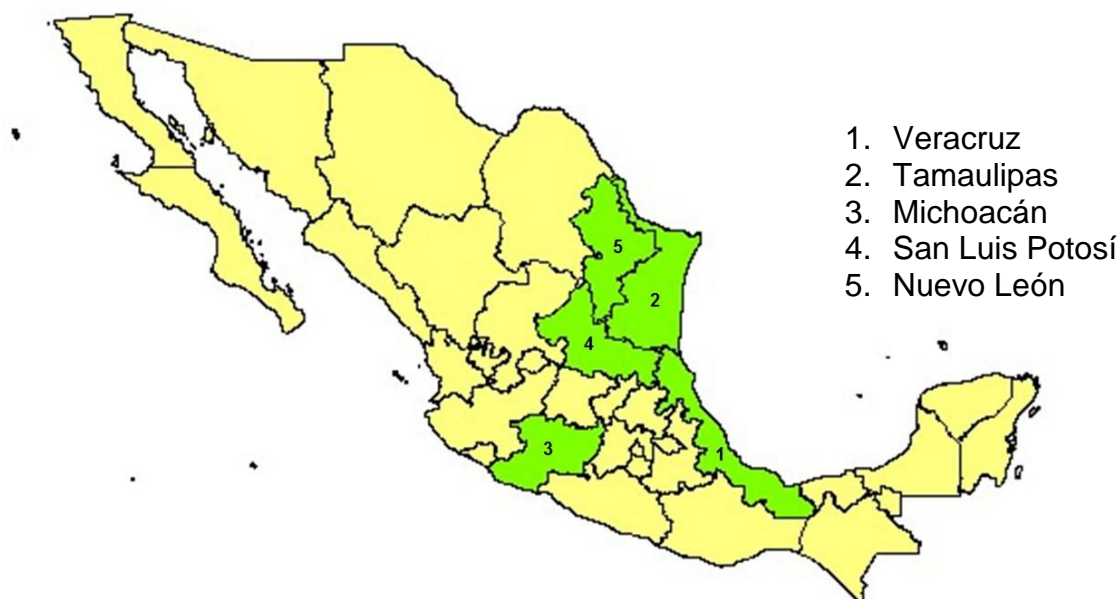


Figura 1.1. Principales estados productores de cítricos en México.

La naranja es el producto cítrico más cosechado, ya que entre los años 2009 y 2013 representó el 54.66% en promedio de la producción total, lo cual corresponde a 4,080,310.21 T producidas, le siguen en orden de producción porcentual limón, piña, toronja y tangerina como se indica en la Figura 1.2. México tuvo una producción de

cítricos en los últimos 5 años de 7,460,412.69 T promedio, alcanzando la mayor producción en 2013 con 7,897,980.75 T como se muestra en la Tabla 1.1.

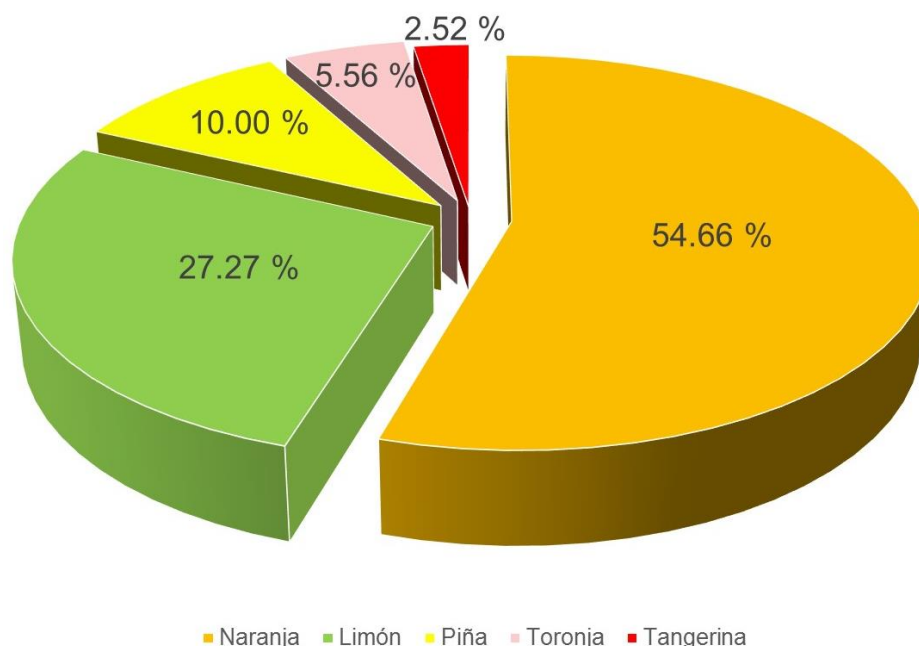


Figura 1.2. % de producción de cítricos en México del año 2009 al 2013.

Tabla 1.1 Producción de cítricos en México de 2009 a 2013. (SIAP, 2015).

AÑO	NARANJA (T)	LIMÓN (T)	PIÑA (T)	TORONJA (T)	TANGERINA (T)	TOTAL (T)
<b>2009</b>	4,193,484.44	1,966,344.75	749,395.58	431,670.85	218,365.00	7,559,260.62
<b>2010</b>	4,051,631.61	1,891,403.15	701,740.48	400,933.86	195,934.84	7,241,643.94
<b>2011</b>	4,079,677.74	2,132,921.78	742,926.34	397,266.70	175,229.80	7,528,022.36
<b>2012</b>	3,666,789.65	2,055,208.89	759,976.18	415,470.85	177,710.21	7,075,155.78
<b>2013</b>	4,409,967.62	2,120,612.50	771,941.85	425,432.97	170,025.81	7,897,980.75
<b>PROMEDIO</b>	4,080,310.21	2,033,298.21	745,196.09	414,155.05	187,453.13	7,460,412.69

### 1.2.2 Producción de cítricos en Veracruz

El Estado de Veracruz es el principal productor de cítricos en México, en 2013 generó 3,700,724.73 T del total nacional siendo la mayor producción de los últimos 5 años correspondiendo al 46.86%, seguido de los Estados de Tamaulipas, Michoacán, San Luis Potosí y Nuevo León. En los años anteriores de 2009 a 2012 produjo 46.88, 46.55, 45.65 y 46.77% de lo generado por el país, lo cual significa que por año en promedio aporta 3,472,258.07 T. Esta tendencia se puede observar en la Figura 1.3.

De 2009 a 2013 produjo en promedio: tangerina (89.84%), piña (71.42%), toronja (60.05%), naranja (48.92%) y limón (25.88%) del total de la producción nacional como se puede ver en la Figura 1.4.

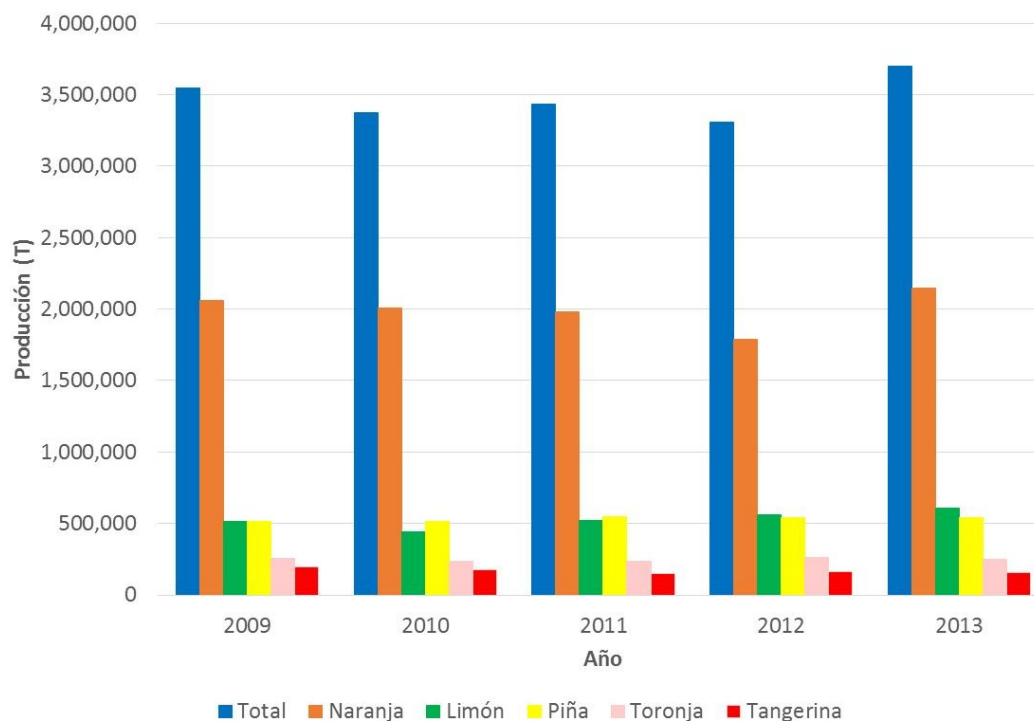


Figura 1.3. Producción de cítricos en Veracruz de 2009 a 2013. (SIAP, 2015).

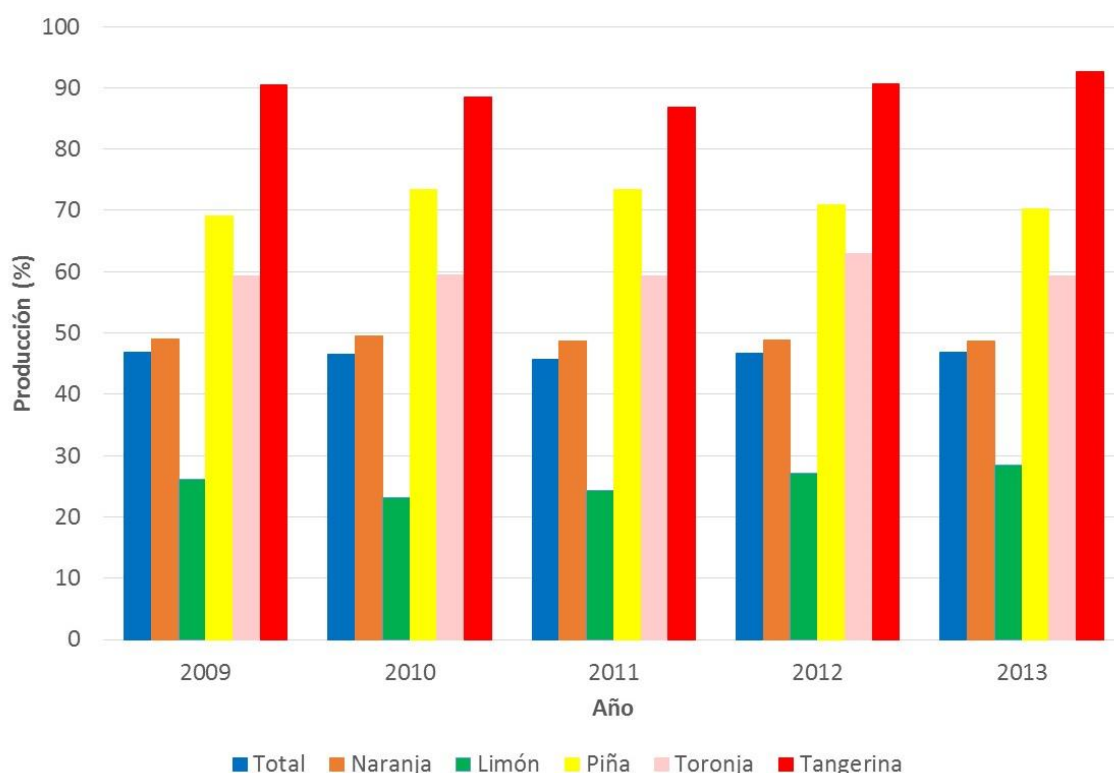


Figura 1.4. % de producción de cítricos en Veracruz de 2009 a 2013 respecto a la producción nacional.

### 1.3 SUMINISTRO Y DISTRIBUCIÓN NACIONAL DE PRODUCTOS CÍTRICOS

Los tres principales productos cítricos en México son naranja, limón y toronja, de 2010 a 2013 del suministro (lo cual incluye la producción nacional y la importación) en 2013 se alcanzaron los niveles más altos en la producción de naranja y toronja siendo 4,428,000.00 y 427,000.00 T respectivamente, mientras que para el limón en 2011 se alcanzaron 2,135,000.00 T como máximo, esto se puede ver en la Figura 1.5.



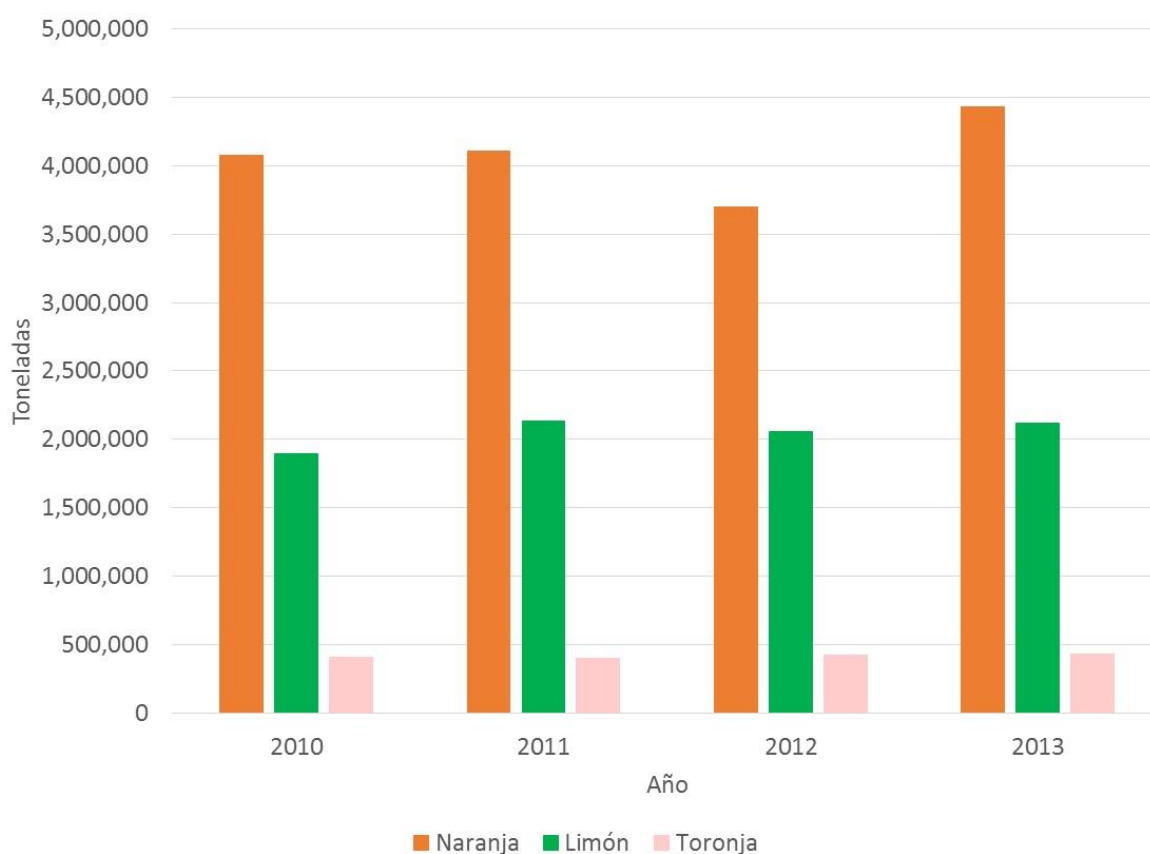


Figura 1.5. Suministro de productos cítricos en México de 2010 a 2013. (USDA FAS, 2015a; 2015b; 2015c).

El suministro se divide en tres partes destinándose para exportación, procesamiento (industrialización) y consumo fresco. De estos productos, el limón es el que se exporta en mayor medida promediando 24.85%, seguido de la toronja 4.34% y de naranja 0.57%. En términos de procesamiento, de naranja se destinó el 25.20% en promedio, de toronja y limón 21.43 y 15.56% respectivamente. La mayor parte del suministro de cítricos se destina para su consumo fresco en hogares como se puede observar en la Figura 1.6, siendo 74.24, 74.23 y 59.59% de toronja, naranja y limón respectivamente.

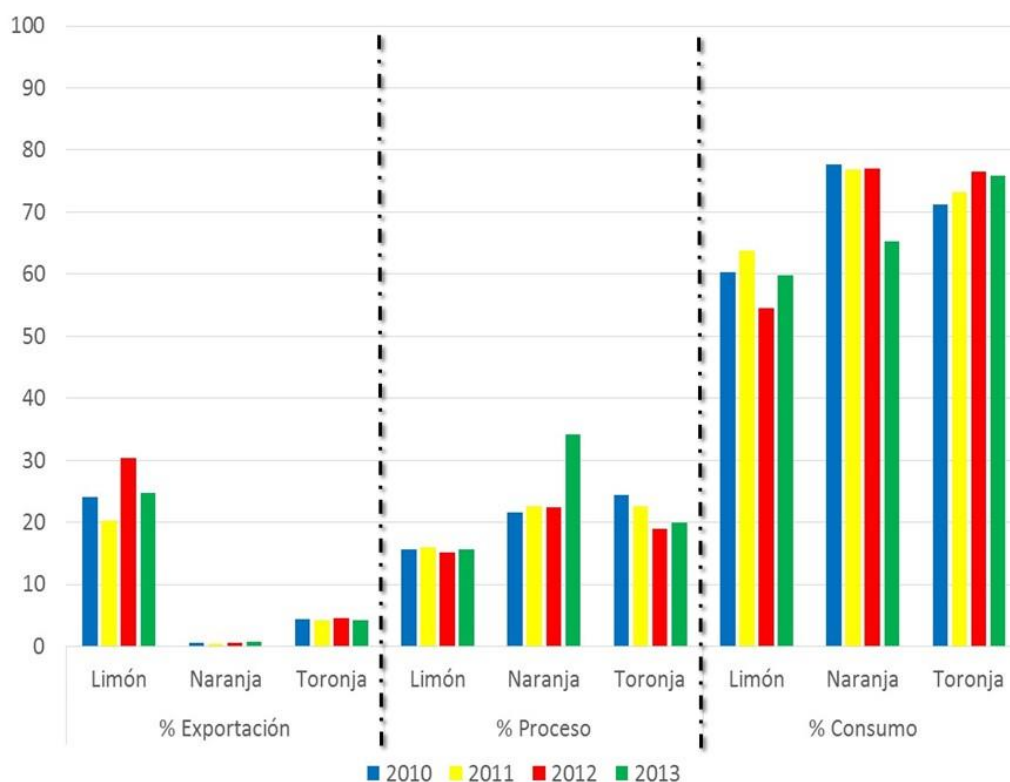


Figura 1.6. Distribución de cítricos en México de 2010 a 2013 en materia de exportación, procesamiento y consumo. (USDA FAS, 2015a; 2015b; 2015c).

#### 1.4 PROCESAMIENTO DE CÍTRICOS

La industria del procesamiento de cítricos es reciente en México, la primera planta procesadora de jugos concentrados (naranja) se instaló en Montemorelos, Nuevo León en el año 1972. Para 1980 existían 9 plantas en el país y entre 1990 y 1991 ya había 22 plantas (Gómez, 1997). Las plantas que se encuentran procesando jugo concentrado en la zona oriental de México (Golfo de México), de variedades de naranja, lima persa, limón italiano, tangerina y toronja se encuentran en los estados de Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco y Yucatán, siendo las siguientes: Citrex, Citrus Tabasco, Citrofrut, Citromax, Juguera Allende S.A. de C.V., Procimart, Procitrus, IQC, Citrotam y Unión de Ejidos (SAGARPA, 2015).

Veracruz es el líder en el procesamiento de cítricos (capacidad de molienda) con 800,000 T/año, contando con 7 plantas procesadoras, seguido de Tamaulipas y Nuevo León con 2 plantas respectivamente y San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán con 1 planta cada estado como se puede observar en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Capacidad de molienda de cítricos, México 2009. (SAGARPA, 2015).

Estado	Planta	T/año	Subtotal (T/año)	Total (T/año)
<b>Veracruz</b>	Citrex, Martínez de la Torre	200,000	800,000	1,353,500
	Citrofrut, San Rafael	199,000		
	IQC, Álamo	147,000		
	Procitrus, Álamo	70,000		
	Procitrus, Papantla	70,000		
	Citromax, Álamo	60,000		
	Citrofrut, Álamo	54,000		
<b>Tamaulipas</b>	Procimart, Ciudad Victoria	165,000	245,000	
	Citrotam, Ciudad Victoria	80,000		
<b>Nuevo León</b>	Citromax, Montemorelos	90,000	144,000	
	Juguera Allende, Allende	54,000		
<b>San Luis Potosí</b>	Citrofrut, Huixihullán	68,000	68,000	
<b>Tabasco</b>	Citrus Tabasco, Huimanguillo	55,000	55,000	
<b>Yucatán</b>	Unión de Ejidos, Akil	41,500	41,500	

En 2009 la producción de cítricos destinados a su procesamiento era inferior a la capacidad de molienda de las plantas procesadoras, por lo que se atribuyeron dos razones para la subutilización de las plantas procesadoras de cítricos: 1) no existía una integración entre la producción de materia prima y proceso de transformación y 2) México improvisó el desarrollo de su industria cítrica (Gómez, 1997).

### 1.4.1 Naranja. Principal producto cítrico y su procesamiento

La evolución en el procesamiento de naranja en México ha sido muy notoria, en 2009 la zona oriental tenía la capacidad para procesar 855,000 T/año de naranja, del suministro de los años 2000 al 2008 para la industria se destinó en promedio el 12% (485,120 T/año), para consumo 87% y para exportación 1% (SAGARPA, 2015), observándose una subutilización en la capacidad de procesamiento. De los años 2010 al 2013 el panorama cambió, en promedio para la industria se destinó el 25.20% (1,027,215 T/año) del suministro de naranja, para consumo 74.23% y para exportación 0.57% (USDA FAS, 2015a; 2015b; 2015c) como se puede ver en la Figura 1.7. Se nota que si se toma como referencia la capacidad de procesamiento de 2009 existe una superutilización, por lo que la industria citrícola se ha visto rebasada y tiene la necesidad de incrementar su capacidad de procesamiento de naranja.

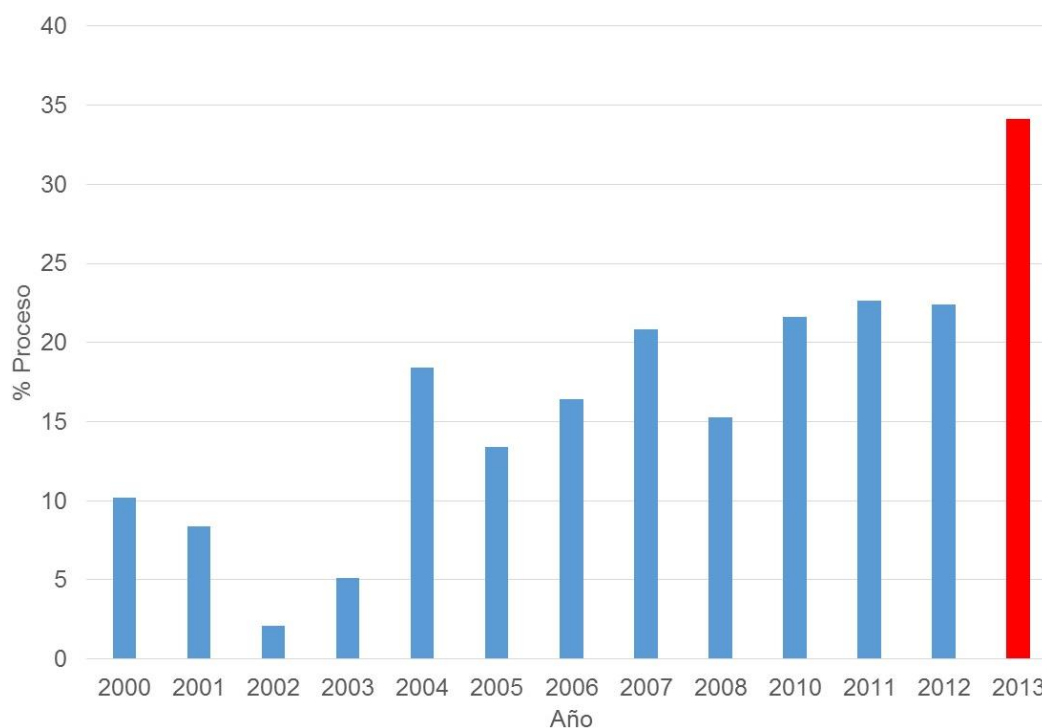


Figura 1.7. % de naranja destinada a su procesamiento de 2000 al 2013. (USDA FAS, 2015a; 2015b; 2015c)

Para su industrialización, en 2013 se alcanzó el 34.10% (1,510,000 T/año) aumentando el 11.67% respecto al año anterior, haciendo notar la alta demanda que el sector industrial está teniendo para el procesamiento de naranja, por lo que el consumo de naranja en fresco disminuyó al 65.20% respecto a 2012; en materia de exportación se mantuvo sin mayor variación en 0.7% (USDA, 2015). Es sabido que actualmente una sola planta ubicada en la Zona Norte del Estado de Veracruz tiene la capacidad de procesar 285,000 T/año de naranja, esto significa el 18.87% de la cantidad anual destinada al procesamiento de este producto.

De la naranja se obtienen diversos productos como: jugo fresco, jugo concentrado, aceites, aromas y cáscara como se puede observar en la Figura 1.8. Para la extracción de jugo, aproximadamente del 50 al 60% se convierte en residuo sólido, el cual está compuesto de cáscara, semillas y membrana (Wilkins *et al.*, 2006; Secretaría de Economía, 2002) y el 50% es jugo concentrado (Rezzadori *et al.*, 2012). De 1 T de naranja se obtienen, 75.70 L de jugo concentrado a 65 °Brix; 1.95 kg de aceite esencial y 100 kg de alimento para ganado (SARH y BANCOMEXT, 1986).

Derivado de la demanda de este producto y por la naturaleza del proceso, se generan grandes cantidades de aguas residuales y residuos sólidos, alrededor de 8 a 20 millones de T/año en el mundo (Rezzadori *et al.*, 2012). La industria de los alimentos en México descarga 93,000,000 m<sup>3</sup> de agua residual por año (SEMARNAT, 2015), de estos; la industria citrícola aporta el 1.3% que corresponde a 1,200,000 m<sup>3</sup>/año, con este volumen se alcanzarían a satisfacer las necesidades de uso de agua de 3.3 millones de mexicanos por día.

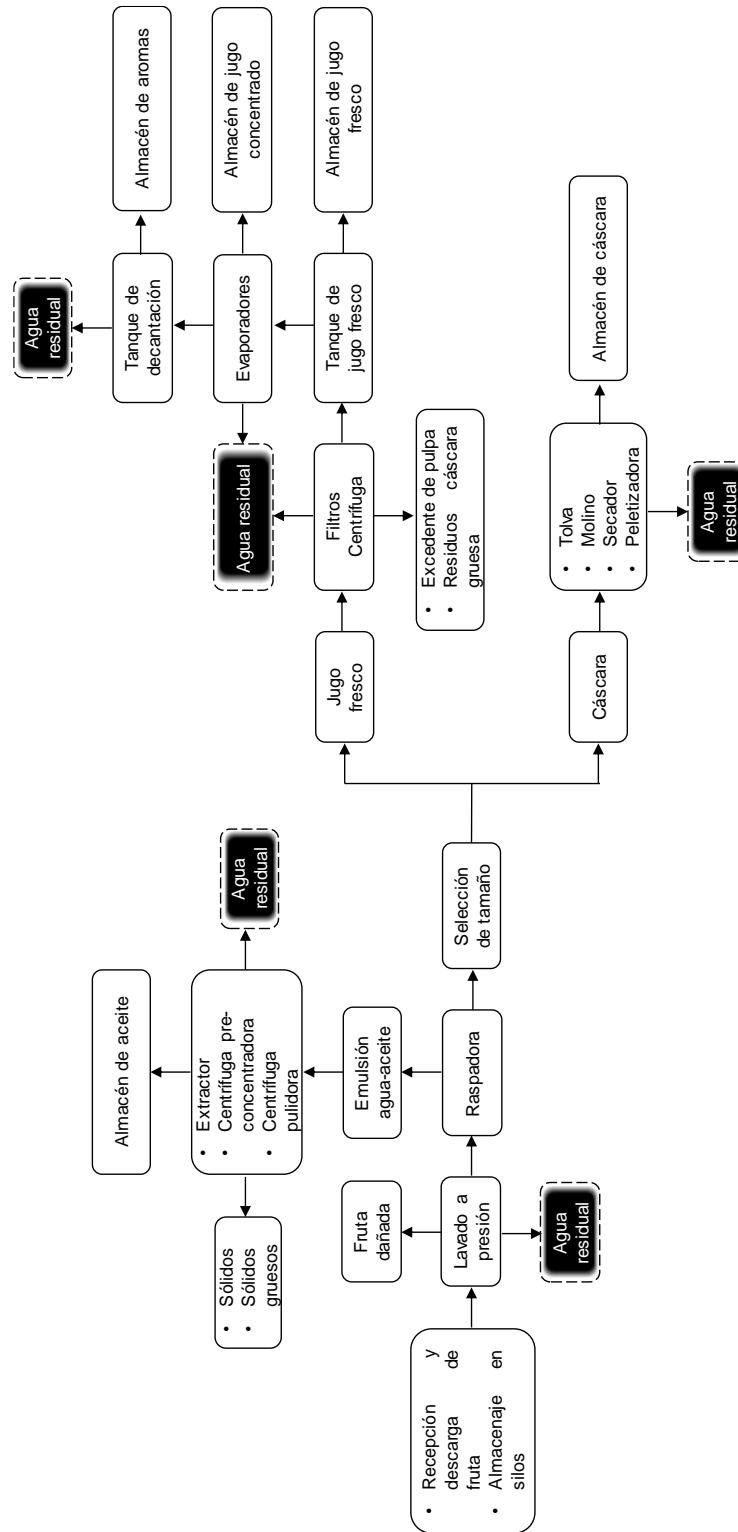


Figura 1.8. Diagrama de proceso de la naranja. (SAGARPA, 2015; Juguera Allende, 2015; IQCitrus, 2015; Citrofrut, 2015a; Citrofrut, 2015b).

## **1.5 CONTAMINACIÓN DE LA INDUSTRIA CITRÍCOLA**

El interés social por la conservación del medio ambiente ha resultado en la aparición de legislaciones ambientales más severas y cambios de política fiscal que buscan impulsar a la industria química y reducir su impacto ambiental. Por tal motivo, está ganando interés la utilización de residuos agroindustriales, como materia prima de bajo costo, para la obtención de productos químicos finos por biotransformación. Esta opción de transformar desechos en nuevas materias primas se perfila como una alternativa atractiva para obtener compuestos que son económica o técnicamente inviables de conseguir por síntesis química tradicional.

El sureste de México es una de las principales regiones productoras de cítricos del país, donde se genera un gran volumen de desechos sólidos de cítricos (cáscara) y efluentes industriales con alta carga orgánica. Estos desechos provienen de la obtención de jugos y, normalmente, se vierten a tiraderos a suelo abierto, campos de riego o cuerpos hídricos, por lo que genera un problema serio de contaminación. Esta situación hace deseable el aprovechamiento de los desechos para la generación de productos de alto valor agregado, como la obtención de aceites esenciales que se extraen de las células localizadas en el flavedo (parte externa coloreada de la cáscara) de los frutos cítricos. Los aceites esenciales de cítricos están compuestos en su mayoría por terpenos.

## **1.6 TERPENOS Y LIMONENO**

Los terpenos son metabolitos secundarios de plantas que son producidos como mecanismos de defensa contra microorganismos e insectos, además de sus propiedades polinizador-atractiva (Gershenzon y Dudareva, 2007). Son los principales componentes de los aceites esenciales y son ampliamente utilizados en la industria de los aromas. Los terpenos pueden ser sometidos a procesos de transformación microbiana con el fin de lograr conversiones a compuestos de interés comercial, se

pueden incorporar en la formulación de alimentos, cosméticos, higiene y productos para el hogar, actuando no sólo como aromatizantes (Bauer *et al.*, 2001), pero también como agentes antibacterianos (Griffin *et al.*, 1999; Bakkali *et al.*, 2007). La mayoría de estas transformaciones microbianas han sido realizadas sobre monoterpenos, como el limoneno.

El limoneno es una sustancia natural que se extrae del aceite de las cáscaras de los cítricos y que da el olor característico a los mismos. Pertenece al grupo de los terpenos, en concreto al de los limonoides, que constituyen una de las más amplias clases de alimentos funcionales y fitonutrientes, funcionando como antioxidantes. Posee un centro quiral, concretamente un carbono asimétrico. Por lo tanto existen dos isómeros ópticos: el D-limoneno y el l-limoneno. La nomenclatura IUPAC correcta es R-limoneno y S-limoneno, respectivamente, pero se emplean más los prefijos d y l. El limoneno puede ser destilado de este aceite por diferentes técnicas y usado en alimentación y como desengrasante natural (Virost, 2008).

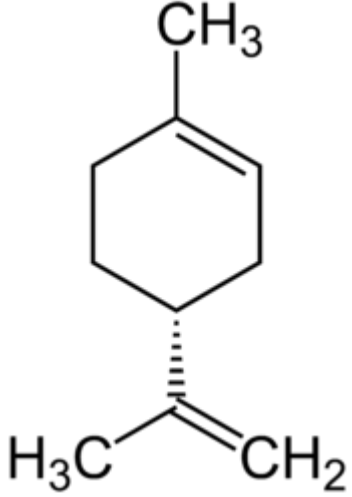
### **1.6.1 D-limoneno y sus propiedades**

El limoneno es un líquido incoloro a temperatura ambiente. La pureza del D-limoneno comercial es aproximadamente del 90-98%, las impurezas son principalmente monoterpenos. Al tratarse de dos isómeros, sus olores son distintos ya que el D-limoneno huele a limón mientras que el l-limoneno huele a pino (World Health Organization, 1998). El componente D-limoneno es el mayor constituyente de aceites esenciales de frutas cítricas (Espina *et al.*, 2011; Fisher y Phillips, 2008). La concentración típica de D-limoneno en jugo de naranja es 100 ppm (Sun, 2007).

El limoneno es inflamable a una temperatura superior a 48 °C, pero no tóxico. Su solubilidad en agua es muy baja, siendo su densidad de 0.84 g/mL, ver Tabla 1.3. Debe mantenerse en un lugar fresco, seco y bien ventilado, fuera de la luz solar directa y el envase perfectamente cerrado para evitar su oxidación.



Tabla 1.3. Propiedades del D-limoneno.

	<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
	<b>Masa atómica</b>	136.21 g/mol
	<b>Densidad</b>	0.84 g/mL
	<b>Solubilidad en agua</b>	Ninguna
	<b>Punto de ebullición</b>	178 °C
	<b>Punto de fusión</b>	-75 °C
	<b>Punto de inflamación</b>	48 °C
	<b>Temperatura de autoignición</b>	237 °C

**Toxicidad:** El limoneno y sus productos de oxidación son irritantes respiratorios y de la piel. La mayoría de los casos de irritación se deben a exposición industrial a largo plazo al compuesto puro, como en el desengrasado o preparación de pinturas. No hay evidencia de carcinogenicidad o genotoxicidad en seres humanos. Además, el limoneno puede ser oxidado en ambientes húmedos a carvona, que se trata de una sustancia tóxica. El D-limoneno es biodegradable, pero debido a su bajo punto de inflamación, debe ser tratado como residuo peligroso para su eliminación.

**Usos:** Debido a su sabor cítrico, el D-limoneno se emplea como un agente aromatizante en perfumes, cremas, jabones, productos de limpieza del hogar y en algunos productos alimenticios tales como bebidas de frutas y helados (Bakkali *et al.*, 2008). Además, el D-Limoneno se ha encontrado que posee propiedades como antifúngico (Chee *et al.*, 2009 y Dambolena *et al.*, 2008), bacteriostático (Jaroenkit *et al.*, 2011; Vuuren y Viljoen, 2007) y bactericida (Zukerman, 1951).

En los últimos años ha adquirido una singular importancia debido a su demanda como disolvente biodegradable. Aparte de disolvente industrial también tiene

aplicaciones como componente aromático y es ampliamente usado para sintetizar nuevos compuestos.

Puesto que es un derivado de los cítricos, el limoneno se considera un agente de transferencia de calor limpio y ambientalmente inocuo con lo cual es utilizado en muchos procesos farmacéuticos y de alimentos.

El limoneno está encontrando un amplio uso en la industria de productos de limpieza del hogar, industria alimentaria y cosmética, en parte, porque su aroma es agradable. También es usado, por ejemplo, en disolvente de resinas, pigmentos, tintas, pinturas, en la fabricación de adhesivos, como aditivo en fragancias, en fluidos refrigerantes, como control de olores, etc. También es usado por las industrias farmacéutica y alimentaria como aromatizante y para dar sabor, siendo usado, por ejemplo, en la obtención de sabores artificiales de menta y en la fabricación de dulces, goma de mascar, bebidas y especias.

El limoneno también es utilizado como insecticida para repeler o matar hormigas, pulgones, cochinillas, moscas, ácaros, cucarachas, avispas, rosales, plantas ornamentales ya que no es tóxico para los seres humanos y animales domésticos, ni perjudicial para la jardinería, plantas de interior ni para el medio ambiente, por lo que se puede usar en hogares, oficinas y colegios. Siendo la composición del insecticida: D-limoneno, un disolvente hidrófilo no tóxico y un agente emulsionante no tóxico para poder solubilizar el D-limoneno en dicho disolvente (Tor Mc Partland, 2004).

El hecho de que tenga tan poca miscibilidad con el agua significa que es empleado como desengrasante flotante para uso en estaciones de bombeo de aguas residuales y como desengrasante de piezas y de tanques de inmersión. En aplicaciones

desengrasantes, su relativamente alto poder de disolvente implica el uso de pequeños volúmenes.

### **1.6.2 Composición química de aceites esenciales**

El procesamiento de frutos cítricos resulta en la generación de cáscaras y residuos de membrana como fracción de residuos primarios; esto constituye aproximadamente el 40-50% de la masa húmeda de la fruta. Las cáscaras son una fuente potencial de aceite esencial (Braddock, 1999) y el rendimiento de aceite es de 0.5 a 3.0 kg/ton fruta (Sattar y Mahmud, 1986).

La composición de la mezcla terpénica varía en función de la tipología de los cítricos examinados. De cualquier forma, la mezcla de cada tipología se encuentra en diferentes proporciones compuesto por: limoneno, alfa-pineno, beta-pineno, mirceno, linalol y terpineno.

De acuerdo con los resultados de Naseem *et al.*, (2012), la composición química de aceites esenciales en cáscara de naranja dulce fue D-limoneno 95.62%, beta-mirceno 2.78%, alfa-pineno 0.75%, acetato de n-octilo 0.32%, beta-pineno 0.2% y beta-farneseno era 0.09%.

## **1.7 CLASIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE AGUAS RESIDUALES**

Los contaminantes presentes en el agua residual pueden eliminarse por medios físicos, químicos y biológicos. Los métodos individuales de tratamiento se suelen, clasificar en operaciones físicas unitarias, procesos químicos unitarios y procesos biológicos unitarios (Metcalf y Eddy, 1985)

### **1.7.1 Operaciones físicas unitarias**

Predomina la aplicación de fuerzas físicas. Dado que la mayoría de estos métodos han evolucionado directamente de las primeras observaciones de la naturaleza efectuadas por el hombre, fueron los primeros en ser usados en el tratamiento del agua residual. El desbaste, mezclado, floculación, sedimentación, flotación y filtración son operaciones unitarias típicas.

### **1.7.2 Procesos químicos unitarios**

Son métodos de tratamiento en los cuales la eliminación o conversión de los contaminantes es provocado por la adición de productos químicos o por otras reacciones químicas. La precipitación, transferencia de gases, absorción y la desinfección son ejemplos de los procesos mayoritariamente utilizados en el tratamiento de aguas residuales.

### **1.7.3 Procesos biológicos unitarios**

En estos métodos se consigue la eliminación de contaminantes (materia orgánica) por medio de la actividad microbiana biológica; se usa esencialmente para eliminar las sustancias orgánicas biodegradables presentes en el agua residual, estas sustancias se convierten en gases que pueden escapar a la atmósfera y en tejido celular biológico que puede eliminarse por sedimentación. El tratamiento biológico se usa también para la eliminación del nitrógeno contenido en el agua residual. En los Estados Unidos y la Gran Bretaña, el desarrollo histórico de las construcciones de ingeniería para el tratamiento biológico de las aguas residuales se inicia, principalmente; con las granjas de aguas residuales y continúa través de los filtros intermitentes de arena y los lechos de contacto, hasta los filtros goteadores y las unidades de lodos activados. Las aguas residuales de los sistemas urbanos de drenaje vertidas en los campos podían irrigar y enriquecer los suelos sedientos de agua y hambrientos de nutrientes. En los depósitos arenosos naturales de Nueva Inglaterra, se continuó el tratamiento de las aguas residuales por filtración intermitente a través de arena en tanto que pudieron intensificarse los dosificaciones y mejorarse el comportamiento mediante el

pretratamiento de las aguas residuales aplicadas en tanques de sedimentación y finalmente en unidades biológicas (Metcalf y Eddy, 1985).

## **1.8 TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES**

El tratamiento anaerobio se utiliza tanto para las aguas residuales como para la digestión de lodos. En la digestión anaerobia se produce la descomposición de la materia orgánica en ausencia de oxígeno molecular, teniendo como productos principales gases como metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), mercaptano ( $\text{RSH}$ ) e hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) (Ramalho, 1991). El proceso se lleva a cabo en un reactor completamente cerrado y el agua residual se introduce continua o intermitentemente.

### **1.8.1 Ventajas del tratamiento anaerobio**

Algunas ventajas del tratamiento anaerobio sobre el aerobio son las siguientes:

1. Ya que no se emplea equipo de aereación, se produce ahorro de costo de inmovilizado así como de consumo energético en el tratamiento anaerobio.
2. El coeficiente de producción de biomasa  $Y_{X/S}$  para los procesos anaerobios es mucho menor que para los sistemas aerobios. Esto significa que se produce menos biomasa por unidad de reducción de sustrato (20-150 kg biomasa/kg DQO). Tiene menor requerimiento de nutrientes (nitrógeno y fósforo).
3. En los procesos anaerobios es posible operar con cargas orgánicas del influente superior que para el caso de los procesos aerobios.
4. La producción de metano en los procesos anaerobios es una ventaja debido a su valor como combustible. Una parte sustancial de la necesidad energética de los procesos anaerobios puede obtenerse de los gases emitidos.

## 1.9 DIGESTIÓN ANAEROBIA

En hábitats naturales en ausencia de oxígeno molecular y de iones nitrato, los compuestos orgánicos complejos e insolubles son degradados por los diferentes grupos de bacterias a través de una variedad de reacciones bioquímicas anaerobias o fermentativas.

Kleerebezem y Macarie (2003) mencionan que la degradación de sustratos complejos en metano involucra una compleja red de microorganismos. La conversión completa a metano y dióxido de carbono resulta de una reacción en cadena biológica, donde un tipo de microorganismos genera el sustrato consumido por un grupo bacteriano subsiguiente en la cadena. En la Figura 1.9 se muestra el proceso de digestión anaerobia.

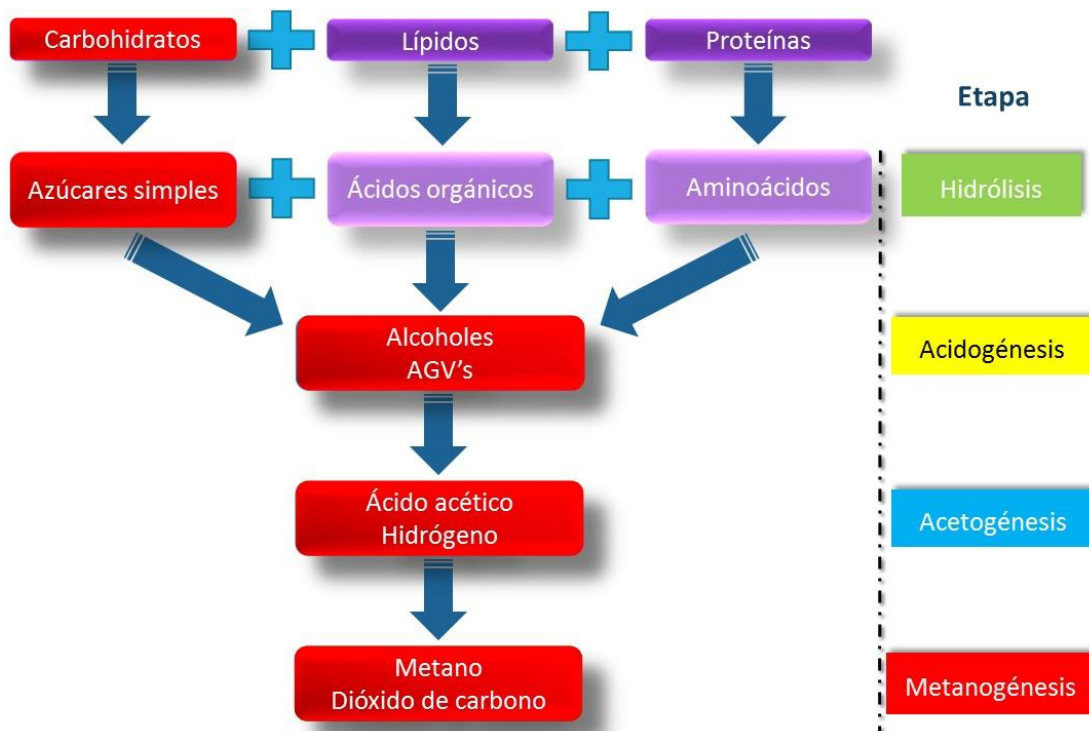


Figura 1.9. Proceso de digestión anaerobia.

En la hidrólisis los compuestos poliméricos (carbohidratos, proteínas y lípidos) son degradados vía enzimática a monómeros más simples que constituyen el sustrato de las bacterias acidogénicas. Estas bacterias, fermentan los monómeros en un número limitado de alcoholes y ácidos grasos volátiles (AGV's). En el siguiente paso de la reacción en cadena, las bacterias oxidan los alcoholes y AGV's a dos principales precursores del metano que son el ácido acético y el hidrógeno molecular. Finalmente, las bacterias metanogénicas convierten el ácido acético e hidrógeno en metano y dióxido de carbono. Es importante mencionar que los productos de la hidrólisis dependen del tipo de sustrato con que se aclimatan los microorganismos y de las condiciones de operación del reactor (Gavala y Lyberatos, 2001).

La degradación de compuestos orgánicos por medio de bacterias hidrógeno-productoras ocurre si se mantiene baja la presión parcial de hidrógeno, esto es; menor a 10.4 atmósferas. Por consiguiente, es esencial que el hidrógeno no aumente su presión parcial. En la cadena, el hidrógeno es consumido y su presión parcial se mantiene a un valor bajo por las bacterias hidrógeno-consumidoras y metanogénicas.

### **1.9.1 Parámetros de control en el proceso anaerobio**

La velocidad limitante de reacción en la digestión anaerobia normalmente es la conversión de ácidos grasos volátiles a metano. Las bacterias metanogénicas obtienen pequeñas cantidades de energía de la degradación de los ácidos volátiles. La mayoría de la energía liberada de los ácidos volátiles es transferida a metano.

Debido al bajo rendimiento de energía obtenido de los ácidos volátiles para las bacterias metanogénicas, su velocidad de crecimiento se restringe, esto es; la cantidad de sustrato utilizado por unidad de biomasa es alta. Por consiguiente, el crecimiento bacteriano o la producción de biomasa es baja y las condiciones óptimas de operación deben mantenerse para tener eficientes producciones de metano. Estos factores son responsables para la producción de metano.

Las bacterias metanogénicas son anaerobias estrictas y son sumamente sensibles a los cambios en la alcalinidad, pH, y temperatura. Así, las condiciones de operación en el reactor deben ser monitoreadas periódicamente y mantenidas en los intervalos óptimos. Además, para que todas las etapas de la digestión anaerobia se lleven a cabo de manera adecuada y exista una armonía entre los grupos bacterianos es necesario propiciar las condiciones adecuadas para obtener los resultados esperados. Para ello se toman en cuenta los siguientes parámetros de control:

### **Alcalinidad y pH**

La alcalinidad es esencial para el control apropiado del pH. La alcalinidad sirve como efecto búfer para prevenir el cambio rápido en el pH. La actividad enzimática es influenciada por el pH. La mayoría de las bacterias desarrollan un buen metabolismo a pH de 6.8 a 7.2.

### **Temperatura**

La mayoría las bacterias metanogénicas están activas en dos intervalos de temperatura, que son los mesofílicos que van de 30 a 35°C y los termofílicos que van de 50 a 60°C. A temperaturas entre 40°C y 50°C, estas bacterias son inhibidas. La temperatura mínima que debe mantenerse para organismos mesofílicos es 32°C.

### **Tiempos de residencia**

Existen dos significados del tiempo de retención o tiempo de residencia en un reactor anaerobio. Primeramente, el tiempo de residencia celular (TRC) es el periodo promedio que las bacterias permanecen en el reactor y el tiempo de residencia hidráulica (TRH) es el tiempo promedio en el que el agua está dentro del reactor.

### **Potencial de óxido-reducción**

Mide la actividad oxidativa del agua, bajo los constituyentes que interaccionan con ésta. El potencial redox, también afecta a las bacterias metanogénicas, que exigen además de la ausencia de oxígeno, un potencial inferior a -330 mV.



### **Concentración de ácidos grasos volátiles**

Un nivel bajo de pH puede causar indirectamente inhibición asociada con ácidos grasos volátiles. El pH permite controlar indirectamente estos ácidos. El proceso de transformación de ácidos grasos en metano es fundamental en el funcionamiento correcto del reactor, pues permite mantener el pH en valores suficientemente altos para que este proceso se desarrolle correctamente (Duque *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que el crecimiento microbiano metanogénico es limitado por la presencia de cantidades excesivas de ácidos grasos volátiles, particularmente cuando el propionato, la concentración del acetato o el butirato se acumulan. La acumulación de AGV's puede disminuir el pH del proceso dando por resultado la inhibición de la metanogénesis (Moosbrugger *et al.*, 1993). Por consiguiente, los ácidos grasos volátiles se pueden acumular y no sólo funcionar como almacenadores intermediarios de ácidos débiles para bajar el pH, si no que pueden ejercer un efecto inhibitorio con el pH en los consorcios microbianos presentes. Se ha observado un bajo nivel del producto final en los grupos acidogénicos y los efectos más perjudiciales de las acumulaciones de ácidos grasos volátiles se manifiestan en las poblaciones metanogénicas, ya que las bacterias acidogénicas tienen una velocidad de crecimiento cuatro veces más alta que la de las bacterias metanogénicas (Malina y Pohland, 1992).

### **Sólidos suspendidos volátiles y totales**

Se sabe que la transferencia de nutrientes del ecosistema terrestre a la acuática causa, por un lado, eutrofización en cuerpos de agua y por otra parte deficiencia de nutrientes en la región agrícola. Los altos niveles de sólidos volátiles y totales en aguas residuales ricas en proteínas complejas requieren métodos para evitar depósitos de la biomasa en los ríos (Mahmoud, 2003).

Generalmente los SSV y los SST no dan ninguna información del estado del proceso biológico, sino los valores pueden ser utilizados para calcular la producción potencial del gas. En los SSV está la concentración total de la materia

orgánica seca y es importante recordar que no todo esto puede ser tratado por la digestión anaerobia. La eficacia del proceso se puede alcanzar por medidas simultáneas de SSV, de la concentración en la alimentación y en el producto final digerido. Cuando existen sustratos simples, las reducciones más altas pueden alcanzar hasta el 100% en la remoción. Una caída en el porcentaje de remoción puede indicar desequilibrio en el proceso, pero una caída no será considerada hasta que el proceso se afecte seriamente.

### **Producción de biogás y contenido de metano**

El biogás es una mezcla de metano combustible y de gas carbónico inerte. Las proporciones relativas del gas dependen de la naturaleza del sustrato fermentado y la composición se muestra en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Composición de biogás (Cosme, 2005).

<b>Compuesto</b>	<b>Porcentaje</b>
CH <sub>4</sub>	50 al 90%
CO <sub>2</sub>	10 al 40%,
H <sub>2</sub>	1 al 3%,
N <sub>2</sub>	0.5 al 2%,
H <sub>2</sub> S	0.1 al 0.5%,
CO	0 al 0.1%.

Como es producido en medio húmedo, el gas está saturado de agua y con la presencia simultánea de H<sub>2</sub>S y CO<sub>2</sub> hacen al biogás más corrosivo por lo que se requiere utilizar materiales apropiados. La producción del biogás puede ser utilizada para evaluar si un proceso está funcionando bien, si la producción real del gas se correlaciona con la producción “estimada”, es decir; la producción del gas se debe relacionar con el potencial de la materia prima que es el metano.

El metano puede usarse como una fuente de combustible. Es un gas inflamable natural. El metano es inoloro, tiene un poder calorífico de 1000 Btu/ft<sup>3</sup>. Cuando el metano es mezclado con el dióxido de carbono que se produce en la digestión anaerobia, su poder calorífico disminuye significativamente. Cuando la digestión anaerobia es interrumpida por cambios en las condiciones de operación, se producen numerosos compuestos insolubles y volátiles. Muchos de estos compuestos son fétidos y ocasionalmente son liberados a la atmósfera. Los compuestos orgánicos e inorgánicos producidos se mencionan en la Tabla 1.5 y Tabla 1.6, respectivamente.

Los gases inorgánicos como nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) y el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) se producen a través de la respiración anóxica (desnitrificación); puede ocurrir con la transferencia de iones nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) al reactor o con la adición de compuestos de nitrógeno como el nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>) para aumentar la alcalinidad del reactor.

Tabla 1.5. Gases orgánicos producidos a través de la actividad microbiana en la digestión anaerobia (Gerardi, 2003).

Nombre	Fórmula
Ácido acético	CH <sub>3</sub> COOH
Ácido butírico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH
Ácido capriónico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH
Ácido fórmico	HCOOH
Ácido propiónico	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH
Metano	CH <sub>4</sub>
Etilamina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>
Benzilmercaptano	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> SH
Metilmercaptano	CH <sub>3</sub> SH

Tabla 1.6. Gases inorgánicos producidos a través de la actividad microbiana en la digestión anaerobia (Gerardi, 2003).

Nombre	Fórmula
Amonio	NH <sub>3</sub>
Dióxido de carbono	CO <sub>2</sub>
Bisulfito de carbono	CS <sub>2</sub>
Monóxido de carbono	CO
Ácido sulfhídrico	H <sub>2</sub> S
Nitrógeno	N <sub>2</sub>
Óxido nitroso	N <sub>2</sub> O

### 1.9.2 Etapas de la digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia y producción de metano están divididos en etapas. Algunos autores mencionan que son cuatro etapas y otros hacen referencia solo a tres, en este caso se mencionarán cuatro etapas que son la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. El proceso de digestión anaerobia se efectúa eficazmente si las proporciones de degradación de todas las etapas son iguales. Si la primera fase se inhibe, entonces el sustrato para las demás fases será limitado y la producción de metano disminuirá. Si la cuarta fase se inhibe, los ácidos producidos en la segunda y tercera fase se acumulan. La inhibición en la cuarta etapa ocurre debido a un aumento en los ácidos y, por consiguiente, se pierde alcalinidad y disminuye el pH.

La perturbación más común en este proceso ocurre debido a la inhibición de las bacterias metanogénicas en el cuarto paso. El proceso de digestión anaerobia contiene grupos diversos de bacterias. Estos grupos trabajan en sucesión, con los productos de un grupo que sirve como el sustrato de otro grupo. Por consiguiente, cada grupo se une a otros grupos en la cadena alimenticia.

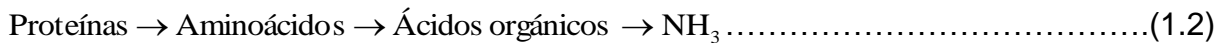
**Etapa 1. Hidrólisis**

En los reactores anaerobios los compuestos insolubles complejos como partículas y residuos coloidales se desdoblán, estos compuestos están hechos a base de carbohidratos, lípidos o grasas y proteínas. Estos residuos son sustancias poliméricas, es decir; moléculas grandes insolubles que consisten en muchas moléculas pequeñas unidas mediante enlaces químicos. En las Ecuaciones 1.1, 1.2 y 1.3 se muestran las rutas de degradación de las macromoléculas.

La degradación de los carbohidratos es:



Las proteínas se descomponen:



Las grasas o lípidos se hidrolizan a:



Las moléculas pequeñas son solubles y rápidamente sus enlaces químicos se rompen. Las bacterias hidrolíticas o anaerobias y anaerobias facultativas son capaces de lograr la ruptura de los enlaces; este proceso se conoce como hidrólisis.

Sin embargo, Kleerebezem y Macarie (2003) mencionan que la hidrólisis es un paso que se lleva a cabo vía enzimática. Etimológicamente *hidrólisis* significa fraccionamiento de un compuesto con agua. *Lisis* es fraccionamiento e *hidro* es agua. Un ejemplo de un compuesto insoluble en que sufre hidrólisis es la celulosa.

**Etapa 2. Acidogénesis**

En etapa de la acidogénesis, los compuestos solubles producidos a través de la hidrólisis son degradados por una gran diversidad de bacterias anaerobias y anaerobias facultativas a través de muchos procesos fermentativos.

Las degradaciones de estos compuestos producen dióxido de carbono, hidrógeno gas, alcoholes, ácidos orgánicos conocidos como ácidos grasos volátiles y pequeñas cantidades de compuestos orgánicos de nitrógeno y azufre. El más importante de los ácidos es el acetato.

El acetato es el ácido orgánico principal o el ácido volátil usado como sustrato por las bacterias metanogénicas. El CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub> pueden convertirse directamente a ácido acético o metano. La presencia de compuestos orgánicos a base de nitrógeno y azufre son debidos a la degradación de aminoácidos y proteínas.

Algunos compuestos orgánicos se transforman a ácidos orgánicos y alcoholes, y algunos se convierten a las nuevas células bacterianas. Si las bacterias metanogénicas no degradan los productos de la segunda fase, los productos aumentarán y producirán un ácido intermedio.

**Etapa 3. Acetogénesis**

El acetato no sólo puede producirse a través de la fermentación de compuestos orgánicos solubles sino también a través de la acetogénesis. Aquí, muchos de los ácidos y alcoholes, por ejemplo; el butirato, el propionato y el etanol, producidos durante la acidogénesis pueden degradarse a acetato que puede usarse como un sustrato de las bacterias metanogénicas. La producción de acetato es llevada a cabo por bacterias acetogénicas.

**Etapa 4. Metanogénesis**

En la fase metanogénica, el metano se forma principalmente del acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. El metano también se forma de algunos compuestos orgánicos aparte del acetato. Por

consiguiente, todos los otros productos fermentados deben ser convertidos a compuestos que pueden usarse directamente o indirectamente por las bacterias metanogénicas. Los ácidos, alcoholes y compuestos de nitrógeno orgánico que no se degradan por las bacterias metanogénicas se acumulan en la parte superior del reactor.

La velocidad activa de bacterias acidogénicas y metanogénicas es aproximadamente la misma, la actividad metabólica de la metanogénesis se mantiene. Si la metanogénesis se mantiene, los ácidos se rompen y el medio se alcaliniza debido a la formación de amoníaco ( $\text{NH}_3^+$ ) de los grupos amino ( $\text{NH}_2^-$ ) provenientes de las proteínas y aminoácidos. El amoníaco liberado reacciona con el  $\text{CO}_2$  y agua, produciendo carbonato de amonio que proporciona la alcalinidad en el sistema. El carbonato de amonio está disponible para reaccionar con los ácidos volátiles que están presentes. Esta reacción produce sales de ácidos volátiles. La producción de acetato es la limitante del proceso.

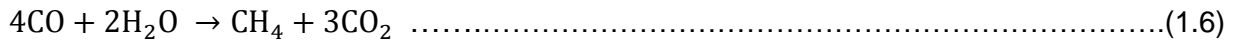
Hay tres grupos principales de bacterias metanogénicas (Gerardi, 2003). Estos grupos son:

1. Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas: Usan el hidrógeno para convertir el dióxido de carbono a metano mostrado en la Ecuación 1.4, estos organismos ayudan a mantener una presión parcial baja de hidrógeno en el reactor que es requerido por las bacterias acetogénicas.



2. Bacterias metanogénicas acetotróficas: Estas bacterias rompen el acetato en metano y dióxido de carbono (Ecuación 1.5). El  $\text{CO}_2$  producido del acetato

puede convertirse a metano (Ecuación 1.4). Algunas bacterias usan el monóxido de carbono para producir metano (1.6).



Estos microorganismos se reproducen más despacio que las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas y es contrariamente afectado por la acumulación de hidrógeno. Por consiguiente, el mantener una presión parcial baja de hidrógeno es favorable para la actividad no sólo de las bacterias acetogénicas sino de las metanogénicas acetotróficas.

3. Bacterias metanogénicas metilitróficas: Crecen en sustratos que contienen el grupo metilo (-CH<sub>3</sub>). Los ejemplos de estos sustratos incluyen el metanol (CH<sub>3</sub>OH) (Ecuación 1.7) y metilaminas (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-N (Ecuación 1.8).



El término "trófico" (*trophe*, "nutrición") se refiere al sustrato usado por las bacterias.

### 1.9.3 Digestión anaerobia de efluentes de la industria citrícola

La industria citrícola en los últimos años ha mantenido un crecimiento continuo, fundamentalmente en el procesamiento de jugos naturales y concentrados, lo que ha traído como consecuencia un incremento en la generación de residuos sólidos y efluentes. Las aguas residuales de la industria citrícola contienen altas concentraciones de materia orgánica, aunado a esto su bajo nivel de pH, el



desequilibrio de nutrientes y las enormes variaciones en el flujo de los efluentes y residuos generados han provocado que a la fecha no se tenga una solución adecuada para este tipo de contaminantes. La mayoría de estos residuos se vierten al suelo y al agua, lo que puede provocar cambios físicos y químicos en los ecosistemas, malos olores, cambio de pH y contaminación de aguas subterráneas impactando al medio ambiente; este hecho también afecta la economía de la empresa por pago de multas debido al incumplimiento de la normatividad ambiental.

Dadas las condiciones anteriores, la digestión anaerobia es una alternativa viable y atractiva para el tratamiento de estos efluentes (Kaparaju y Rintala, 2006) es usada para eliminar o reducir la contaminación de efluentes provenientes de la agroindustria que contienen altos niveles de materia orgánica biodegradable (Chen *et al.*, 2008) y ofrece una muy atractiva ruta a utilizar de ciertas categorías de biomasa para satisfacer las necesidades energéticas parciales (Balat y Balat, 2009; Mata, 2003) de una planta procesadora. En comparación con el tratamiento aerobio produce poca cantidad de lodos y requiere menos energía (Van Haandel y Lettinga, 1994; Aiyuk *et al.*, 2006; Gomec, 2010). Este proceso ofrece la posibilidad de reciclar nutrientes, reducir emisiones de efecto invernadero, reducir olores y controlar la disposición de residuos (Angelidaki *et al.*, 2011) además de tener impactos favorables en términos económicos y ecológicos comparados con otros procesos (Baldasano y Soriano, 2011; Edelmann *et al.*, 2000). La digestión anaerobia puede ser definida como la conversión biológica de materia orgánica (carbohidratos, lípidos y proteínas) a una variedad de productos finales, como el biogás que está constituido por metano (50-70%), dióxido de carbono (20-25%), nitrógeno (0-10%), hidrógeno (0-1%), ácido sulfhídrico (0-8%) y oxígeno (0-2%) (Olthof y Oleszkiewick, 1982; Gujer y Zehnder, 1983; Speece, 1983; Nutiu, 2014). La materia orgánica debe pasar por tres etapas llamadas hidrólisis, acetogénesis y metanogénesis hasta la obtención de biogás (Gerardi, 2003). En general, la digestión anaerobia tiene doble propósito, depurar las aguas residuales y producir un bioenergético.

Tabla 1.7. Rendimiento de metano y eficiencias utilizando diferentes condiciones de operación en reactores anaerobios.

	Reactores convencionales			Reactores de alta carga	
<b>Autor/Año</b>	Valdés et al. (1994)	Martín <i>et al.</i> (2010b)	Koppar y Pullamimanappallil, (2013)	Alvarado-Lassman <i>et al.</i> (2008)	Rico <i>et al.</i> (2015)
<b>Tipo de reactor</b>	Lecho fijo de flujo ascendente	Tanque completamente agitado	Flujo estacionario descendente de biopelícula fija	Lecho fluidizado inverso	Flujo ascendente
<b>Medio de soporte</b>	Anillos raschig	----	----	Extendonphere / Polietileno triturado	----
<b>Operación</b>	Semicontinuo	Batch	Continuo	Continuo	Continuo
<b>Escala</b>	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio
<b>Sustrato</b>	Residual diluido de jugo concentrado de naranja	Del proceso de prensado de naranja	Del proceso de prensado de naranja	De cervecería	Suero de leche y fracción líquida de estiércol vacuno
<b>Pretratamiento</b>	No	Sulfato de aluminio	----	No	Cloruro férrico y poliacrilamida catiónica
<b>Nutrientes</b>	Si	Si	----	Si	Si
<b>Cva (gDQO/Ld)</b>	0.312 – 4.175	1.5 – 5	0.51	>70	28.7
<b>T (°C)</b>	----	37	55	35	35
<b>TRH (d)</b>	1 – 4	2 – 3	16	<1	1.3
<b>Bio / sus (gSV/ gDQO)</b>	----	1.70 – 1.75	----	----	~1.25
<b>DQO rem (%)</b>	77.5 – 97.2	84	----	>90	95.1
<b>Y (LCH<sub>4</sub> / g DQO<sub>rem</sub>)</b>	0.3 – 0.381	0.297	0.238	~0.3	0.34

Teóricamente el rendimiento de metano es 0.35 LCH<sub>4</sub>/gDQO<sub>rem</sub> (Jennett y Dennis, 1975) pero esto depende del tipo de reactor, condiciones de operación y sustrato empleado. En literatura se reportan algunos valores de rendimiento de metano utilizando como sustrato agua residual generada en el procesamiento de naranja y tratada en reactores convencionales, esto se compara utilizando reactores de alta carga con diferentes sustratos como se muestra en la Tabla 1.7.

Se aprecia que los reactores de alta carga obtuvieron mayores rendimientos de metano de 0.3 a 0.34 LCH<sub>4</sub>/gDQO<sub>rem</sub> pero consumiendo un sustrato diferente al cítrico, mientras que los reactores convencionales obtuvieron rendimientos de metano más bajos pero utilizaron como sustrato un afluente cítrico y fueron operados bajo condiciones diferentes a los reactores de alta carga.

### **1.10 REACTORES DE ALTA EFICIENCIA O ALTA CARGA**

Dentro de la digestión anaerobia se han propuesto varios procesos con configuraciones diferentes que buscan optimizar el sistema. Estas configuraciones pueden agruparse por la forma en que se encuentra la biomasa en su interior, lo que origina tres grandes bloques (ver Figura 1.10): a) procesos de crecimiento en suspensión o reactores de primera generación, estos se usan para tratar desechos que contienen material particulado biodegradable, como el lodo de los tratamientos primario y secundario; b) procesos híbridos o reactores de segunda generación, los cuales se pueden utilizar para tratar desechos con constituyentes particulados y solubles, aunque funcionan mejor con desechos solubles; y c) procesos de película bacteriana adherida o reactores de tercera generación, estos son más adecuados para el tratamiento de desechos orgánicos solubles, como la comida proveniente de las instalaciones de procesamiento de alimentos.

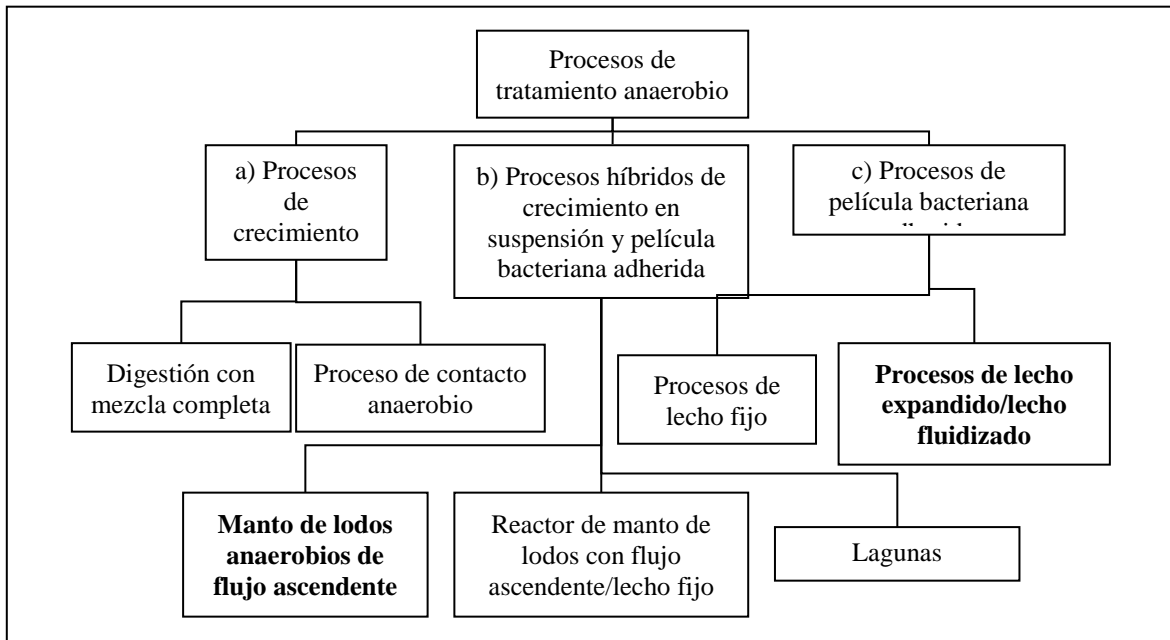


Figura 1.10. Clasificación de los procesos de tratamiento anaerobio (Sandoval-Ramos, 2006).

### 1.10.1 Reactor anaerobio de manto de lodos de flujo ascendente (UASB)

Los reactores UASB han sido aplicados a una gran variedad de aguas residuales originarias principalmente de la industria agroalimentaria, industria de las bebidas, destilerías de alcohol y la industria de pulpa y papel (Aivasides y Diamantis, 2005). La alta eficiencia de estos reactores es debida a la auto-inmovilización de las bacterias anaerobias en gránulos compactos, lo que aumenta significativamente la velocidad de sedimentación de la biomasa, lo que provee un tiempo efectivo de retención bacterial en el reactor.

El agua residual es alimentada en la parte inferior del reactor y fluye verticalmente a través del sistema. Los gránulos anaerobios se sedimentan en la parte inferior del reactor formando el lecho de lodos. En esta sección es donde la mayoría de los compuestos biológicos son degradados y el biogás es producido. El biogás producido

mezclado con los lodos fluidizados es retirado en el separador gas-sólido localizado en la sección superior del reactor y fluye fuera de éste (López-Sánchez, 2008).

### **1.10.2 Reactores de lecho fluidizado inverso (RLFI)**

Dentro de la tecnología de lecho fluidizado se encuentra la de lecho fluidizado inverso, en la que la fluidización se lleva a cabo por la introducción del líquido en la parte superior provocando que el soporte flotante sea expandido por la circulación descendente de líquido.

Comparando la tecnología anaerobia estándar (reactores tipo UASB) con los RLFI, estos últimos presentan una alta eficiencia de remoción que depende de la velocidad de mezclado inducido por las condiciones hidrodinámicas. Los sistemas de lecho fluidizado inverso son capaces de retener biomasa sobre la superficie del soporte. Uno de los aspectos más importantes de estos reactores es la formación de dicha biomasa denominada biopelícula, así como también la composición del agua residual y la velocidad del líquido superficial, son determinantes además de la diversidad microbológica de la biopelícula, la concentración de la biomasa y consecuentemente su densidad y espesor (Sandoval-Ramos, 2006).

La fluidización inversa requiere menos energía en relación con la fluidización tradicional, debido a la utilización de materiales con menor densidad con respecto a las aguas residuales. Sin embargo, existen algunos parámetros fundamentales que limitan la aplicación generalizada de esta tecnología, tales como: selección del material de soporte, estabilización de las condiciones de operación del reactor y la formación irreversible de la biopelícula en periodos cortos de tiempo, puesto que el periodo de colonización sobre el material de soporte puede variar entre 2 a 9 meses. (Alvarado-Lassman *et al.*, 2008).

Esta tecnología se ha utilizado principalmente en el tratamiento de aguas residuales de una concentración de materia orgánica inferior a 1 Kg DQO m<sup>-3</sup> de origen municipal (Castilla *et al.*, 2000) y en aguas residuales de origen industrial con una concentración de 20 a 30 Kg DQO m<sup>-3</sup> (Buffière *et al.*, 2000).

**Biopelícula:** Las células microbianas se unen firmemente a toda superficie inmersa en un agua residual. El crecimiento de las células fijas comprende la multiplicación de células y la producción de polímeros exocelulares. Estos últimos se extienden a partir de la célula y forman una matriz enredada de fibras orgánicas. El conjunto de las células y los polímeros unidos se llama *biopelícula*. Las biopelículas son superficies de acumulación que no son necesariamente uniformes en el tiempo o en el espacio. Esta estructura es generalmente adsorbente y porosa. Esto resulta en un depósito constituido de materiales adsorbidos y atrapados, tales como los solutos y las partículas inorgánicas, en una matriz biótica (Sandoval-Ramos, 2006).

**Soportes:** El propósito de los medios de soporte o empaque es el de proporcionar un medio sólido y estable para la formación de la biopelícula. Este debe ser inerte a las sustancias en contacto con él, de manera que no inhiba el crecimiento de la biopelícula, ni que sea atacado por las sustancias presentes a tratar (Winkler, 1994). Los reactores de lecho fluidizado inverso requieren de soportes con menor densidad que el agua tales, como plásticos (polietileno, polipropileno, poliestireno) los cuales tienden a expandirse como resultado de la velocidad del líquido de recirculación. (Castilla *et al.*, 2000) lo que elimina el problema de la retención de la biomasa y/o del soporte en el reactor (Buffière *et al.*, 1998).

### 1.11 INHIBICIÓN POR D-LIMONENO EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

El efecto inhibitor del D-limoneno ha sido comprobado por diferentes autores en trabajos referentes a la digestión anaerobia de residuos sólidos y líquidos de la

industria cítrica, así como diversos efectos que provoca este elemento sobre otros procesos de tratamiento aerobios.

Valdés *et al.* (1994), indican que la existencia de 0.008% en volumen de D-limoneno constituye un factor tóxico para el proceso de tratamiento de aguas residuales cítricas por vía anaerobia. Sin embargo, estas concentraciones representan 75% más de las descritas por otros investigadores para reactores convencionales (Mc Nary y Wolford, 1951; Lane, 1982; Graulich, 1983).

El estudio del mecanismo de la inactivación bacteriana por D-limoneno hecho por García-Gonzalo *et al.* (2013), mostró que la letalidad de este compuesto fue mayor en pH de 4 que a pH neutro.

Calabrò *et al.* (2016) y Begoña y Flotats (2016), atribuyen el efecto de inhibición al p-cimeno, que es un terpeno derivado del D-limoneno, a partir de la digestión anaerobia de residuos cítricos.

Begoña y Flotats (2016), en la digestión anaerobia de residuos de cáscara de naranja bajo condiciones mesofílicas, reportan una constante de inhibición al 50% ( $IC_{50}$ ) = 423 y 669 mg/L, en la que mencionan que es equivalente a  $K_i$ . Los dos valores de  $IC_{50}$  obtenidos son inferiores a la concentración habitual de limoneno en los residuos de cítricos (Salgado-Segado *et al.*, 2012) y, por lo tanto, es de esperar una inhibición de la digestión anaeróbica de los residuos de cítricos por el limoneno.

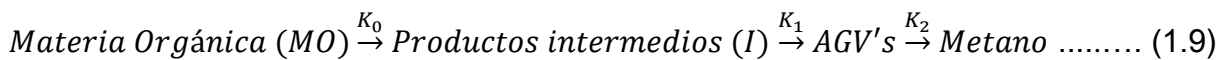
## 1.12 MODELOS MATEMÁTICOS EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

Los modelos matemáticos de digestión anaeróbica han sido investigados ampliamente y se han desarrollado para entender aspectos como la distribución de desechos y biomasa metanogénica dentro de un biorreactor (Vavilin y Angelidaki, 2005), o la

dinámica del comportamiento en fases transitorias (Escudié *et al.*, 2005). Los modelos matemáticos se han constituido en una herramienta básica para el diseño, operación y control de los sistemas anaeróbicos (Lubken *et al.*, 2007) y han generado un área activa de investigación (López y Borzacconi, 2009). Los modelos matemáticos, enfocados al entendimiento y optimización del proceso de digestión anaerobia, describen estas reacciones en forma estructurada.

Los modelos cinéticos tipo Monod han sido ampliamente utilizados para describir el proceso cinético de digestores anaerobios. Aunque ha habido algo de éxito en la aplicación de la cinética de tipo Monod en digestión anaerobia, algunos investigadores tuvieron dificultades para aplicarlos para sus trabajos (Martín *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 2002).

Siles *et al.* (2008), determinaron tres constantes cinéticas,  $K_0$  de la materia orgánica a productos intermedios,  $K_1$  de productos intermedios a AGV's y  $K_2$  de AGV's a metano, para la digestión anaerobia de agua residual del proceso de prensado de cáscara de naranja como se muestra en la Ecuación 1.9.



Se asumió que: 1) El agua residual es parcialmente biodegradable, por lo tanto, la concentración de materia orgánica es la suma de concentraciones biodegradables ( $[OM]_b$ ) y no biodegradables ( $[OM]_{nb}$ ), en consecuencia; la fracción de materia orgánica biodegradable es la diferencia entre la materia orgánica total y la materia orgánica no biodegradable ( $[OM]_b = [OM] - [OM]_{nb}$ ); 2) Los tres pasos anteriores siguen una cinética de primer orden y 3) Las concentraciones de MO, I, AGV's y metano se expresan como carbono.

Tomando las consideraciones anteriores, el modelo cinético fue establecido mediante las siguientes ecuaciones diferenciales:



$$-\frac{d[MO]}{dt} = K_0\{[MO] - [MO]_{nb}\} \dots\dots\dots(1.10)$$

$$\frac{d[I]}{dt} = K_0\{[MO] - [MO]_{nb}\} - K_1[I] \dots\dots\dots(1.11)$$

$$\frac{d[AGV's]}{dt} = K_1[I] - K_2[AGV's] \dots\dots\dots(1.12)$$

$$\frac{d[CH_4]}{dt} = K_2[AGV's] \dots\dots\dots(1.13)$$

Los valores de  $K_0$  fueron  $0.85 - 0.18 \text{ h}^{-1}$ , para  $K_1 = 0.90 - 0.30 \text{ h}^{-1}$  y  $K_2 = 0.50 - 0.15 \text{ h}^{-1}$ . Concluyen que las constantes disminuyen con el aumento de carga orgánica, mostrando inhibición. El decremento más pronunciado fue para  $K_0$ , lo cual indica que la hidrólisis es el paso más afectado por la inhibición.

Martín *et al.* (2010b), encontraron siete constantes cinéticas ( $K_0, K_1, K_2, K_3, K_4, K_5$  y  $K_6$ ) con un modelo más detallado al de Siles *et al.* (2008), basado en las interacciones de la Figura 1.11.

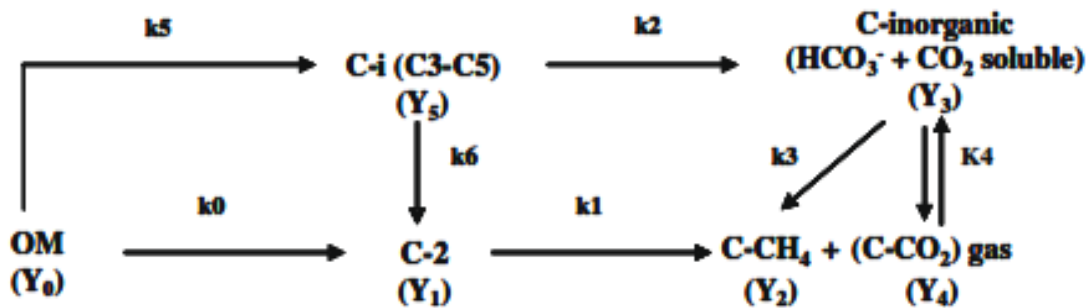


Figura 1.11. Esquema simplificado de digestión anaerobia.

Fueron tomadas en cuenta las siguientes consideraciones: 1) Todas las concentraciones fueron expresadas como carbono; 2) El agua residual es parcialmente biodegradable, por lo tanto, la concentración de materia orgánica es la suma de

concentraciones biodegradables ( $[OM]_b$ ) y no biodegradables ( $[OM]_{nb}$ ), en consecuencia; la fracción de materia orgánica biodegradable es la diferencia entre la materia orgánica total y la materia orgánica no biodegradable ( $[OM]_b = [OM] - [OM]_{nb}$ ); 3) La concentración de biomasa fue difícil de cuantificar, por lo tanto se manejó en un intervalo de  $5.3 \pm 0.4$  gSSV/L y no se consideró alguna ecuación diferencial y 4) La conversión anaerobia es compleja y siguió los pasos mostrados en la Figura 1.11.

Con las consideraciones anteriores, se planteó el modelo matemático mediante las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$-\frac{d[MO]}{dt} = K_0\{[MO] - [MO]_{nb}\} + K_5\{[MO] - [MO]_{nb}\} \dots\dots\dots (1.14)$$

$$\frac{d[C_1]}{dt} = K_5\{[MO] - [MO]_{nb}\} - K_6[C_1] - K_2[C_1]^2 \dots\dots\dots (1.15)$$

$$\frac{d[C_2]}{dt} = K_0\{[MO] - [MO]_{nb}\} - K_6[C_1] - 2K_1[C_2] \dots\dots\dots (1.16)$$

$$\frac{d[C_{inorgánica}]}{dt} = K_4(480 - [C_{inorgánico}]) + K_2[C_1]^2 - K_3[C_{inorgánico}] - f\{K_5[MO] - [MO]_{nb}\} + K_0([MO] - [MO]_{nb}) \dots\dots\dots (1.17)$$

$$\frac{d[CH_4]}{dt} = K_1[C_2] + K_3[C_{inorgánico}] \dots\dots\dots (1.18)$$

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = K_1[C_2] + K_4(480 - [C_{inorgánico}]) \dots\dots\dots (1.19)$$

Concluyen que la mejor relación inóculo/sustrato fue 1.70 – 1.75 gSSV/gDQO y que el fenómeno de inhibición ocurre a cuando disminuye la relación inóculo/sustrato. Ambos trabajos asocian la inhibición con el incremento de carga orgánica.

# *CAPÍTULO 2*

## *MATERIALES Y MÉTODOS*

---

---

## 2.1 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

Se utilizó un Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) constituido por dos secciones, en la parte superior un lecho fijo (LF) y en la parte inferior un lecho fluidizado inverso (LFI) como se muestra en la Figura 2.1. Esta es una configuración que permite tratar efluentes con alto contenido de carga orgánica, cuyos beneficios son lograr una mejor distribución del flujo a través del reactor mediante el LF, retener una mayor cantidad de sólidos en el LF, así como generar una biopelícula resistente en el LF y LFI. El lecho fijo lo conformó un tubo de acrílico con longitud de 23 cm y diámetro nominal de 7.62 cm (3 in) que contuvo como medio de soporte 330 anillos poliméricos con longitud promedio de 2.76 cm recubiertos por esmalte acrílico para mejorar la adhesión de la biopelícula. El lecho fluidizado inverso fue construido con un tubo de acrílico de 80 cm de longitud y diámetro nominal de 8.89 cm (3.5 in), se utilizó como medio de soporte una arena sílica llamada Extendsphere™ con un diámetro de 170  $\mu\text{m}$ , un área de superficie específica de 20,000  $\text{m}^2/\text{m}^3$  y densidad de 0.69  $\text{kg}/\text{m}^3$ . Es llamado lecho fluidizado inverso, ya que, a diferencia de los sistemas tradicionales, el flujo se alimenta por la parte superior del reactor y el lecho al poseer una densidad menor a la del agua tiende a flotar, logrando que sus partículas finas sean fácilmente fluidizadas para promover un mayor contacto entre la biopelícula y la materia orgánica presente en el agua residual.

El biogás producido en el lecho fluidizado inverso ascendió por un tubo de acrílico con longitud de 19.5 cm y diámetro nominal de 10.16 cm (4 in) que recubrió al lecho fijo para ser captado en un sistema de desplazamiento gas-líquido. Durante el periodo de operación del reactor, se instaló un sistema de control para el nivel del lecho fluidizado inverso, debido a que éste tiende a desplazarse dependiendo de la presión generada en el interior del reactor, así mediante este sistema se alcanzó la estabilización del nivel del lecho fluidizado.

Se emplearon dos bombas peristálticas Masterflex/Cole-Parmer para la alimentación y recirculación del efluente respectivamente. Los accesorios como válvulas, conectores, y mangueras fueron marca Parker Store.

El reactor se mantuvo en un cuarto a temperatura controlada de  $35 \pm 2$  °C, es decir; en un intervalo mesofílico.

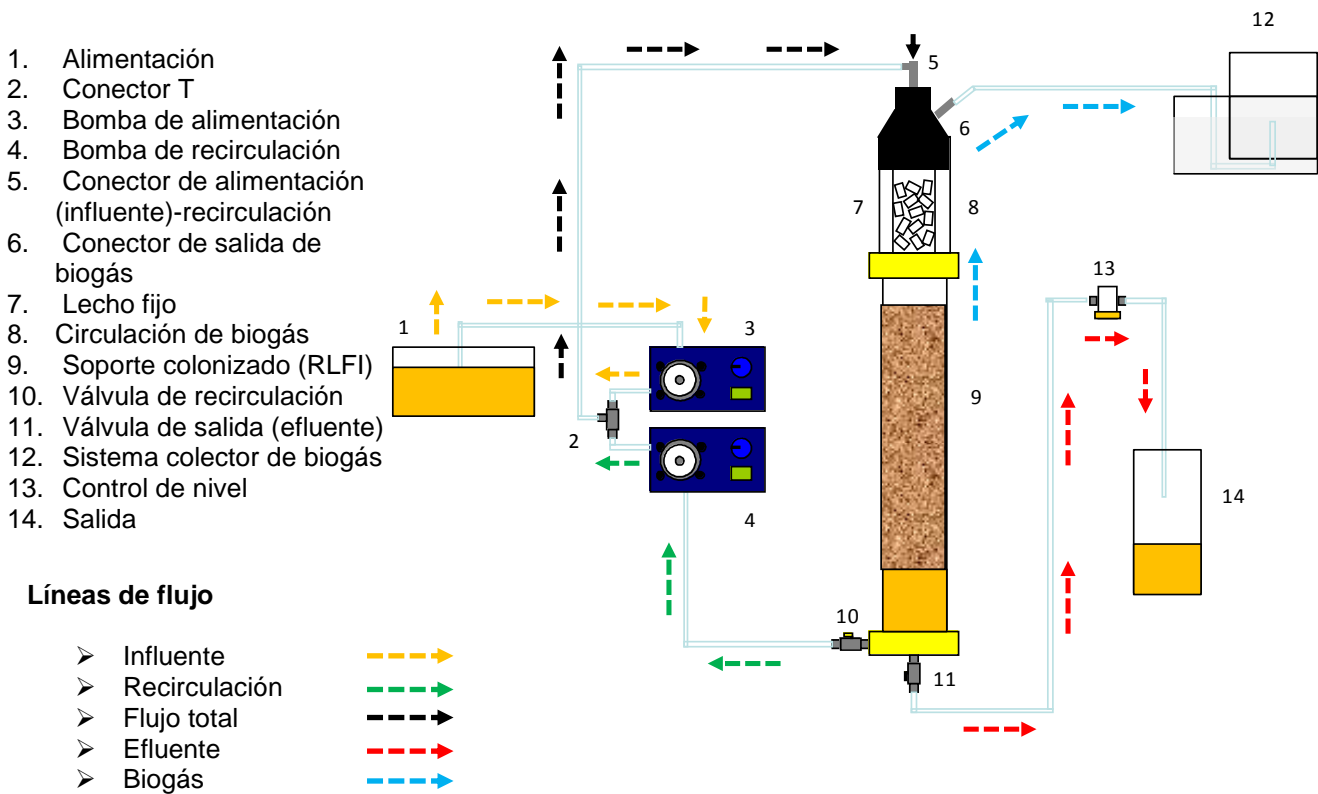


Figura 2.1 Componentes del Reactor Anaerobio Híbrido.

### 2.1.1 Parámetros de diseño de un Reactor Anaerobio Híbrido

Se emplearon cuatro parámetros de diseño para la construcción de un RAH, similares a los utilizados en investigaciones previas como Rosas-Mendoza (2007), González-Paz (2015) y Domínguez-Hernández (2016), estos parámetros se definen como:

Flujo o caudal de alimentación (Q):

$$Q = \frac{(Cva)(\text{Volumen útil del RAH})}{\text{DQO de alimentación}} \dots\dots\dots (2.1)$$

En donde:

Q = Flujo o caudal de alimentación [L/d]

Cva = Carga Volumétrica Aplicada [gDQO/Ld]

Volumen útil del RAH = [2.5 L]

DQO de alimentación = [gDQO/L]

Tiempo de Residencia Hidráulica (TRH):

$$TRH = \frac{\text{Volumen útil del RAH}}{Q} \times 24 \dots\dots\dots (2.2)$$

En donde:

TRH = Tiempo de Residencia Hidráulica [h]

Volumen útil del RAH = [2.5 L]

Q = Flujo o caudal de alimentación [L/d]

24 = Factor de conversión

Velocidad descensional ( $v_d$ ):

$$V_d = \frac{Q}{\text{Área transversal del RAH}} \times \frac{1}{24,000} \dots\dots\dots (2.3)$$

En donde:

$v_d$  = Velocidad descensional [m/h]

Q = Flujo o caudal de alimentación [L/d]

Área transversal del RAH = [0.0104 m<sup>2</sup>]

1/24,000 = Factor de conversión

Relación Sustrato/Biomasa ( $S_0/X_0$ )

$$\frac{S_0}{X_0} = \frac{(\text{DQO de alimentación})(Q)}{(\text{MVA})(\text{Volumen de soporte colonizado})} \dots\dots\dots (2.4)$$

En donde:

$S_0/X_0$  = Relación Sustrato/Biomasa [gDQO/gSVL]

DQO de alimentación = [gDQO/L]

Q = Flujo o caudal de alimentación [L/d]

MVA = Materia Volátil Adherida [gSV/L]

Volumen de soporte colonizado = [1.5 L]

## 2.2 SUSTRATOS

Tabla 2.1 Parámetros evaluados en la caracterización de sustratos.

<b>Físicos</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Unidad</b>	<b>Método</b>
pH			Potenciométrico
Sólidos totales	ST	mg/L	Gravimétrico
Sólidos volátiles	SV	mg/L	Gravimétrico
<b>Químicos</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Unidad</b>	<b>Método</b>
DQO total	DQO <sub>T</sub>	mg/L	Micrométodo colorimétrico
DQO soluble	DQO <sub>S</sub>	mg/L	Micrométodo colorimétrico
Carbono orgánico total	COT	mg/L	Purga y tramps
Nitrógeno total Kjeldahl	NTK	mg/L	Nitrógeno total Kjeldahl
Fósforo total	P	mg/L	Determinación de fósforo total en aguas residuales NMX-AA-029-SCFI-2001
Grasas y aceites	GyA	mg/L	Extracción Soxhlet

Se utilizaron dos tipos de sustratos en esta investigación. Para la etapa de inoculación, arranque y acondicionamiento se usó el efluente hidrolizado de frutas y verduras, que fue obtenido de los residuos sólidos orgánicos (RSO) de tres diferentes mercados de Orizaba, Veracruz, México. Los RSO fueron reducidos de tamaño y triturados hasta formar un semisólido pastoso, y la porción líquida fue separada y filtrada hasta obtener una fracción líquida. Esta fracción fue alimentada a un reactor de hidrólisis a escala piloto, localizado en el Instituto Tecnológico de Orizaba, para obtener un efluente



hidrolizado de frutas y verduras. En las etapas estables se usó un efluente proveniente de una planta procesadora de cítricos, ubicada en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, México. Este efluente fue una combinación de dos aguas residuales, una del prensado de naranjas y otra del prensado de cáscara de naranja (licor de prensa).

Una vez a la semana fueron colectados de 18 a 20 L de cada tipo de sustrato, dependiendo de la etapa en la que se estaba alimentando el reactor. Ambos sustratos fueron preservados a 4 °C. Se tomaron alrededor de 10 mL de muestra por día, tanto a la entrada como a la salida del RAH para realizar los análisis de seguimiento.

Los parámetros medidos en la caracterización de ambos sustratos se muestran en la Tabla 2.1

### **2.3 OPERACIÓN EN MODO CONTINUO DE UN REACTOR ANAEROBIO HÍBRIDO**

El RAH fue operado en cuatro etapas hasta alcanzar condiciones estables como se indica en la Tabla 2.2.

*Etapa 1. Inoculación, arranque y acondicionamiento:* Se utilizaron 300 mL de soporte Extendsphere™ colonizado y adaptado a un efluente constituido por jugo de manzana, este soporte contenía 13.98 gSV/L como biomasa y se utilizó para inocular 1,200 mL de soporte Extendsphere™ limpio que se colocaron en el RFLI, mientras que la inoculación del FA se fue haciendo con el influente durante el proceso de operación del reactor. Debido a que la biomasa estaba acondicionada para digerir el efluente de jugo de manzana, en esta etapa se utilizó el efluente hidrolizado de frutas y verduras para alimentar el RAH del día 1 al 78, regulando el pH de entrada entre 6.6 y 7.7 con escamas de NaOH. No se agregaron nutrientes ya que la fracción líquida extraída de las frutas y verduras es una excelente fuente de carbono enriquecida con macro y micronutrientes. Se mantuvo una Cva de 5 gDQO/Ld.

Tabla 2.2 Etapas de operación del RAH.

<b>Etapa</b>	<b>Días de operación</b>	<b>Cva (gDQO/Ld)</b>	<b>Sustrato</b>
1	0 – 78	5	Efluente hidrolizado de frutas y verduras
2	79 – 88	10	Efluente hidrolizado de frutas y verduras
3	89 – 108	10	Efluente cítrico
4	109 – 158	8	Efluente cítrico

*Etapa 2. Incremento en la carga volumétrica aplicada:* Se mantuvieron las condiciones de operación como en la etapa anterior sólo que la Cva fue incrementada de 5 a 10 gDQO/Ld a partir del día 79 al 88 de operación.

*Etapa 3. Estabilización:* Una vez alcanzada la estabilización en la operación del RAH, se realizó el cambio de sustrato del efluente hidrolizado de frutas y verduras por el efluente cítrico, se complementó con macro y micronutrientes con las composiciones indicadas en la Tabla 2.3, debido a que posee deficiencias de nutrientes, además por sus características ácidas y presencia de aceites esenciales este sustrato es más difícil de tratar por digestión anaerobia. El pH de entrada se reguló con bicarbonato de sodio entre 6.8 y 7.2 y la Cva se mantuvo constante en 10 gDQO/Ld de los días 89 al 108.

*Etapa 4. Ajuste en la carga volumétrica aplicada:* Dados algunos decrementos en la DQO removida y rendimiento de metano, se optó por reducir la Cva de 10 a 8 gDQO/Ld hasta alcanzar nuevamente una etapa de estabilización.

Tabla 2.3 Composición de macro y micronutrientes.

Sales minerales (macronutrientes)	NH <sub>4</sub> Cl	125 mg/L
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1500 mg/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	900 mg/L
Oligoelementos (micronutrientes)	FeCl <sub>2</sub>	0.5 mg/L
	CaCl <sub>2</sub>	0.5 mg/L
	KCl	0.5 mg/L
	CoCl <sub>2</sub>	0.1 mg/L

## 2.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

En esta investigación fueron monitoreados pH, DQO total (DQO<sub>T</sub>), DQO soluble (DQO<sub>s</sub>), Sólidos Totales (ST) y Sólidos Volátiles (SV) en el influente y en el efluente para evaluar los porcentajes de remoción en estos parámetros; además se determinó cantidad de biomasa medida como SV y composición de biogás.

### 2.4.1 Medición de pH

La determinación del pH se realizó con un potenciómetro Orion Model 250A.

### 2.4.2 Demanda química de oxígeno (DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>s</sub>)

La demanda química de oxígeno es un parámetro analítico de contaminación que mide el material orgánico en una muestra líquida mediante oxidación, la cual se determinó por el método colorimétrico (APHA, 1995) y utiliza al dicromato de potasio en medio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como agente oxidante, en presencia de sulfato de plata y sulfato mercúrico como catalizadores en la ebullición, se llevó a cabo en una placa digestora HACH a 150 °C. Se determinó la DQO total y DQO soluble del agua a la entrada y salida del reactor para poder evaluar los porcentajes de remoción de materia orgánica asociada con la colonización del soporte y estabilización del mismo. Para efectuar la

DQO soluble, se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron en una centrífuga HERMLE Z383 a 3500 rpm durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante para realizar la DQO soluble. Las concentraciones de DQO total y soluble se analizaron en un espectrofotómetro HACH a 620 nm.

### **2.4.3 Sólidos totales y sólidos volátiles (ST y SV)**

Se determinaron por el método gravimétrico (APHA 1995), para los ST se tomaron 5 mL de muestra y se colocaron en una estufa Riossa a 105 °C durante 24 horas y posteriormente para los SV, la muestra se calcinó en una mufla Barnstead/Themolyne a 550 °C por 2 horas. Las muestras se pesaron en una balanza digital Ohaus Adventurer.

### **2.4.4 Composición de biogás**

Para medir el contenido de metano, se determinó la composición de biogás en un cromatógrafo de gases Buck 310 compuesto por una columna capilar de All Tech CRT I, de 6 in de longitud y ¼ in de diámetro, la cual detecta CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>. La dosis de inyección directa fue de 2 mL y las condiciones de operación fueron: la utilización de helio a 70 psi como gas de acarreo, la temperatura de la columna a 36 °C y la temperatura del detector a 121 °C.

### **2.4.5 Determinación de materia volátil adherida (MVA)**

La determinación de la biomasa adherida al soporte (LF y LFI) se realizó por el método gravimétrico de sólidos volátiles. El cual consistió en tomar muestras del lecho en tres puntos arriba, en medio y abajo, se midieron 0.3 mL y se colocaron en papel aluminio a peso constante y se colocó en una charola a peso constante. Se pusieron a secar a 105 °C por 24 h y se calcinaron a 550 °C durante 2 horas; con la diferencia de pesos se obtuvo la MVA que fue equivalente a la biomasa en g/L.

## 2.5 ANÁLISIS ENERGÉTICO

Además de ofrecer una alternativa para el tratamiento de efluentes de la industria citrícola, se analizó la posibilidad de aprovechar el biogás generado durante el proceso de digestión anaerobia para la obtención de energía eléctrica que esté disponible para las necesidades energéticas de la planta, por esta razón se examinó como caso de estudio a la planta procesadora de cítricos mencionada anteriormente.

Para calcular el volumen de metano generado a temperatura y presión estándar, se utilizó el siguiente razonamiento:

1) La planta procesadora desecha un volumen diario de 12.8 L/s, 2) La  $DQO_T$ , porcentajes de  $DQO_T$  removida y rendimientos de metano se obtuvieron experimentalmente, operando el RAH durante 70 días y 3) El 90% de la  $DQO_T$  removida forma parte del metano presente en el biogás (Michaud *et al.*, 2002).

Posteriormente, se calculó la cantidad de energía eléctrica que se puede obtener a partir del metano, ya que Muylaert *et al.* (2000) mencionan que 1 m<sup>3</sup> de metano a temperatura y presión de estándar tiene un poder calorífico de 9.94 kWh de electricidad. También, se consideró que un generador comercial de electricidad a base de biogás rico en metano tiene una eficiencia de conversión del 30%, así se puede conocer la energía eléctrica disponible.

Finalmente, la energía eléctrica disponible representa un ahorro ya que esa fracción dejaría de consumirse a Comisión Federal de Electricidad, teniendo un costo de 0.0812 USD/kWh (CFE, 2017) en México. Esta tarifa es más económica, dado que en Grecia el costo de producción de energía eléctrica para plantas de biogás menores a 3,000 kWh es 0.2420 USD/kWh y para plantas mayores a 3,000 kWh es 0.2197 USD/kWh (Markou *et al.*, 2017). En otras partes del mundo, la tarifa eléctrica es: Australia 0.15 – 0.26 USD/kWh (Electricity SA Residential, 2016), Chile 0.2311 USD/kWh (Enel, 2017) y Estados Unidos 0.08 – 0.17 USD/kWh (U.S. Energy Information Administrator, 2017).

## 2.6 PREPARACIÓN DEL EFLUENTE CÍTRICO

Se realizó la preparación de un efluente cítrico con las mismas características que el efluente proveniente de la industria citrícola, debido a que la planta procesadora se encuentra de 5 a 8 horas de la Ciudad de Orizaba en donde se realizó la presente investigación. Para obtener este efluente se tomó como base el proceso convencional utilizado a nivel industrial como se ilustra en la Figura 2.2.

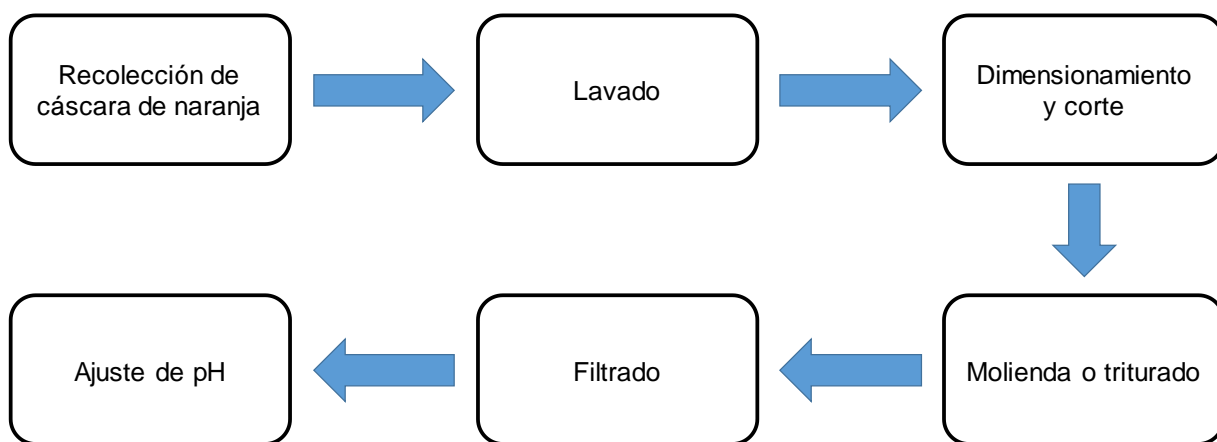


Figura 2.2 Metodología para la preparación del efluente cítrico.

La recolección de cáscara de naranja se realizó en expendios de jugos, se procedió a lavarlas por la existencia de algún tipo de residuo que no corresponda a las características de la naranja, para proceder con la molienda se redujo el tamaño de la cáscara aproximadamente a 4 cm<sup>2</sup>. Por cada 4 o 5 naranjas se utilizaba 1 L de agua, posteriormente se filtró con una maya de poro medio y una coladera para eliminar los sólidos remanentes de la molienda y poder separar el efluente cítrico. Finalmente, se ajustó el pH debido a que es residuo con carácter muy ácido para ser sometido a digestión anaerobia. Se caracterizó el efluente cítrico mediante los parámetros mencionados en la sección 2.2.

## 2.7 CINÉTICAS BATCH DE INHIBICIÓN CON D-LIMONENO

Para poder medir el efecto de inhibición que provoca el D-limoneno en la digestión anaerobia de los efluentes provenientes de la industria citrícola, se desarrollaron diversos experimentos que se realizaron de la siguiente manera:

### 2.7.1 Inóculo

Como inóculo se utilizaron 200 mL de lodo anaerobio proveniente de un reactor de Manto de Lodo Granular Expandido (por sus siglas en inglés, Expanded Granular Sludge Blanket, EGSB) ubicado en la Planta Piloto del Instituto Tecnológico de Orizaba. El reactor EGSB fue alimentado con la Fracción Líquida de Residuos Sólidos Orgánicos Municipales (FLRSOM) obtenidos del Mercado Municipal Emiliano Zapata de Orizaba, Veracruz. El lodo presentó una concentración de biomasa dada como 12.30 gSV/L.

### 2.7.2 Sustrato

Como sustrato se utilizó el efluente de naranja proveniente de una planta procesadora de cítricos ubicada en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz. La concentración del efluente cítrico medida como  $DQO_T$  fue 33,329 mg/L. Se alimentaron 300 mL del sustrato en cada uno de los experimentos reduciendo, mediante dilución, la concentración a valores cercanos a 3,000 mg/L de  $DQO_S$  para mantener una relación sustrato/biomasa ( $S_0/X_0$ ) de 0.28 a 0.36 como se muestra en las Tablas 2.5, 2.6 y 2.7.

### 2.7.3 Inhibidor

Se utilizó como agente inhibidor D-limoneno de naranja, suministrándolo a diferentes volúmenes y concentraciones como se muestra en las Tablas 2.4 y 2.5. La planta procesadora de cítricos reporta valores en la determinación de grasas y aceites (GyA)

---

---

de 520 mg/L y para  $DQO_T$  (sustrato) de 45,500 mg/L, esto da como resultado una relación GyA/sustrato de aproximadamente 0.011. Este valor sirvió como base para establecer diferentes relaciones D-limoneno/sustrato en esta investigación, para ello; las primeras cinco cinéticas fueron planteadas para superar 10, 20 y 30 veces los valores obtenidos en la planta procesadora de cítricos. En la cinética seis se incrementó la relación D-limoneno/sustrato, superando 30, 60 y 90 veces la relación reportada por la industria. Y finalmente, en las cinéticas siete y ocho se dejó de suministrar D-limoneno. Este criterio es similar al utilizado por Calabrò *et al.* (2016), ya que estas condiciones probablemente no sean reales, pero fueron elegidas como condiciones extremas para comprender correctamente el mecanismo de inhibición y la influencia del D-limoneno en la cinética de biodegradabilidad del efluente cítrico.

Se asumió que el 96% de las grasas y aceites corresponde a D-limoneno como lo reporta (Naseem, 2012).

#### **2.7.4 Montaje experimental**

En total se realizaron ocho cinéticas, cuyas características se muestran en las Tablas 2.4, 2.5 y 2.6. De las cinéticas uno a la cinco, se utilizaron concentraciones de 308, 616 y 952 mg/L de D-limoneno. Para la cinética seis, las concentraciones de D-limoneno se incrementaron a 952, 1,904 y 2,856 mg/L, esto fue para observar un mayor efecto de inhibición. Finalmente, en las cinéticas siete y ocho se dejó de suministrar D-limoneno para observar un posible efecto de reversibilidad en la inhibición. Cabe hacer mención que el inóculo utilizado en todas las cinéticas fue el mismo, ya que éste también se debió ir adaptando a la presencia del inhibidor.

En cada una de las ocho cinéticas se realizaron cuatro experimentos. En el experimento uno, no se suministró D-limoneno con la finalidad de tener un punto de referencia y sirvió como experimento de control, de este modo, se pudo comparar el efecto inhibidor respecto a los experimentos dos, tres y cuatro.



Tabla 2.4 Diseño de fase experimental en las cinéticas de inhibición. Cinéticas uno a la cinco.

<i>Experimento</i>	D-limoneno suministrado (mL)	Concentración D-limoneno (mg/L)	DQO soluble alimentada (mg/L)	$S_0/X_0$	D-limoneno / Sustrato
1	0	0	2,988.96	0.36	0
2	0.11	308	2,957.04	0.36	0.10
3	0.22	616	2,920.16	0.35	0.21
4	0.34	952	2,834.16	0.34	0.34

Tabla 2.5 Diseño de fase experimental en las cinéticas de inhibición. Cinéticas seis.

<i>Experimento</i>	D-limoneno suministrado (mL)	Concentración D-limoneno (mg/L)	DQO soluble alimentada (mg/L)	$S_0/X_0$	D-limoneno / Sustrato
1	0	0	2,624.48	0.32	0
2	0.34	952	2,567.96	0.31	0.37
3	0.68	1,904	2,396.76	0.29	0.79
4	1.02	2,856	2,976.36	0.36	0.96

Tabla 2.6 Diseño de fase experimental en las cinéticas sin inhibidor. Cinética siete y ocho.

<i>Experimento</i>	D-limoneno suministrado (mL)	Concentración D-limoneno (mg/L)	DQO soluble alimentada (mg/L)	$S_0/X_0$	D-limoneno / Sustrato
1	0	0	2,292.46	0.28	0
2	0	0	2,185.42	0.28	0
3	0	0	2,272.02	0.26	0
4	0	0	2,225.38	0.28	0

En cada experimento se montaron dos reactores anaerobios tipo batch con un volumen total de 550 mL por reactor; de los cuales 200 mL fueron para inóculo, 300 mL para sustrato y 50 mL para cámara de biogás. Uno de los dos reactores se utilizó para la toma de muestras y el otro para la cuantificación de biogás como se puede observar en la Figura 2.3. Por cada cinética, se montaron en total ocho reactores, los cuales fueron colocados en un agitador orbital Lab-line Instruments para mantener un mezclado homogéneo entre el inóculo, sustrato e inhibidor. Los reactores se mantuvieron en un cuarto a temperatura mesofílica de  $35 \pm 2$  °C. En cada reactor se reguló el pH por encima de la neutralidad, utilizando bicarbonato de sodio comercial.

Para las ocho cinéticas, se tomaron 10 mL de muestra a cada reactor en las horas cero, uno, dos y posteriormente a las 24, 48 y 72 horas. Los parámetros que se determinaron fueron pH, DQO<sub>s</sub> y volumen de biogás.

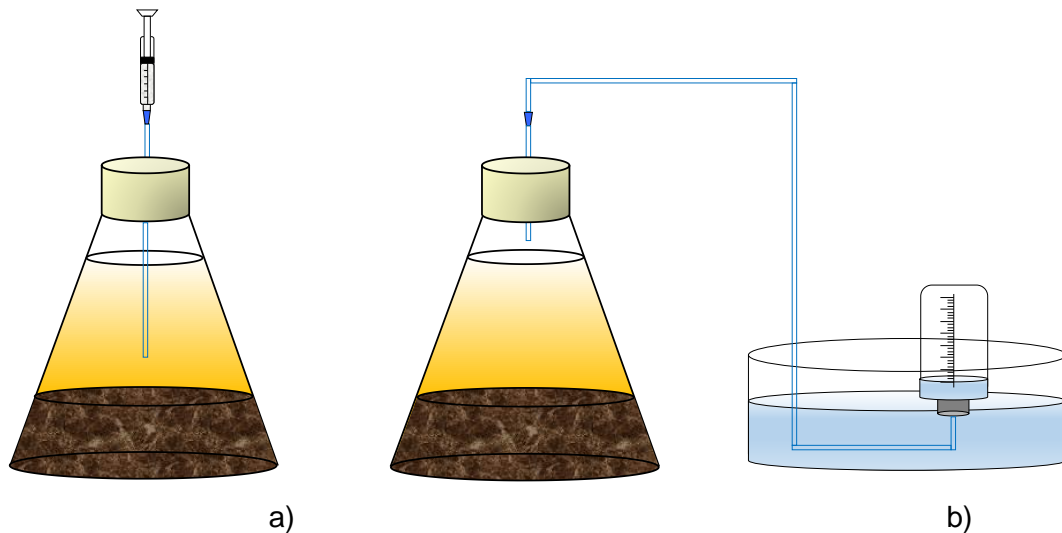


Figura 2.3 Reactor anaerobio batch: a) Toma de muestras, b) Cuantificación de biogás.

### **2.7.5 Determinaciones analíticas**

La determinación del pH se realizó con un potenciómetro Orion Model 250A.

La demanda química de oxígeno (DQO) se determinó por el método colorimétrico (APHA, 1995) y utiliza al dicromato de potasio en medio ácido ( $H_2SO_4$ ) como agente oxidante, en presencia de sulfato de plata y sulfato mercurico como catalizadores en la ebullición, se llevó a cabo en una placa digestora HACH a 150 °C durante 2 horas. Se determinó la DQO total ( $DQO_T$ ) al efluente cítrico concentrado y la DQO soluble ( $DQO_S$ ) a las muestras tomadas en cada reactor. Para efectuar la DQO soluble, se filtraron las muestras utilizando papel filtro de poro medio. Las muestras de  $DQO_T$  y  $DQO_S$  se leyeron en un espectrofotómetro HACH a 620 nm.

Los sólidos volátiles (SV) del lodo anaerobio, se determinaron por el método gravimétrico (APHA, 1995) se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron en un crisol a peso constante, después se colocó en una estufa Riossa a 105 °C durante 24 horas y posteriormente se calcinó en una mufla Barnstead/Themolyne a una temperatura de 550 °C durante 2 horas.

La cuantificación de biogás se realizó utilizando un dispositivo de desplazamiento gas-líquido, mientras que su composición fue determinada de manera similar a la explicada en la sección 2.4.4.

## **2.8 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOCINÉTICOS**

Para poder estimar los parámetros biocinéticos, se utilizaron dos modelos matemáticos: 1) El modelo de Michaelis – Menten y 2) Modelo de inhibición no competitiva (pura y mixta) (Nelson y Cox, 2008; Farrell, 2016).

### 2.8.1 Modelo de Michaelis – Menten

Es un modelo tipo enzimático para poder describir el comportamiento de los experimentos control, es decir; sin inhibidor.

$$V = \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots (2.5)$$

En donde:

v = Velocidad de reacción en un tiempo determinado [mg/Lh]

S = Concentración inicial de sustrato [mg DQO<sub>s</sub>/L]

t = Tiempo [h]

V<sub>max</sub> = Velocidad máxima de reacción [mg/Lh]

K<sub>m</sub> = Constante de Michaelis [mg/L]

### 2.8.2 Modelo de inhibición no competitiva

Es un modelo tipo enzimático para poder describir el comportamiento de los experimentos con ciertas concentraciones de inhibidor.

$$V = \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right)} \dots\dots\dots (2.6)$$

En donde:

v = Velocidad de reacción en un tiempo determinado [mg/Lh]

S = Concentración inicial de sustrato [mg DQO<sub>s</sub>/L]

t = Tiempo [h]

V<sub>max</sub> = Velocidad máxima de reacción [mg/Lh]

$K_m$  = Constante de Michaelis [mg/L]

$i$  = Concentración del inhibidor [mg D-limoneno/L]

$K_i$  = Constante de inhibición [mg/L]

Mediante los datos experimentales se calcularon las velocidades de consumo de sustrato para cada experimento y para cada cinética. A partir de estas velocidades, se estimaron los valores de los coeficientes biocinéticos de  $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $K_i$ , utilizando las gráficas de velocidad ( $v$ ) vs concentración de sustrato  $[S]$  y el diagrama de Lineweaver – Burk, conocido como diagrama de dobles recíprocos, es decir;  $1/v$  vs  $1/[S]$ .

Para la construcción del diagrama de Lineweaver – Burk, se emplearon las ecuaciones 2.5 y 2.6, transformándose en su forma lineal de la siguiente manera:

Linealización del modelo de Michaelis – Menten:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \dots\dots\dots (2.7)$$

En donde:

$1/v$  corresponde a los valores del eje “y”

$K_m/V_{max}$  es la pendiente “m”

$1/[S]$  corresponde a los valores del eje “X”

$1/V_{max}$  es la ordenada al origen “b”

Linealización del modelo de inhibición no competitiva:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max \text{ ap}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max \text{ ap}}} \dots\dots\dots (2.8)$$

ó

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) \dots\dots\dots (2.9)$$

En donde:

1/v corresponde a los valores del eje “y”

$K_m/V_{\max} (1 + [i]/K_i)$  es la pendiente “m”

1/[S] corresponde a los valores del eje “X”

$1/V_{\max} (1 + [i]/K_i)$  es la ordenada al origen “b”

Cuando la inhibición presenta un comportamiento no competitivo,  $K_m$  permanece constante, es decir; el valor de  $K_m$  del control será el mismo para los experimentos con concentraciones variables de inhibidor. Mientras que  $V_{\max}$  se ve afectada por la presencia de inhibidor, siendo  $V_{\max}$  menor a mayores concentraciones, llamándose velocidad máxima aparente ( $V_{\max \text{ ap}}$ ), definida como:

$$V_{\max \text{ ap}} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right)} \dots\dots\dots (2.10)$$

Dicho patrón de comportamiento puede observarse en las Figura 2.4 y 2.5.

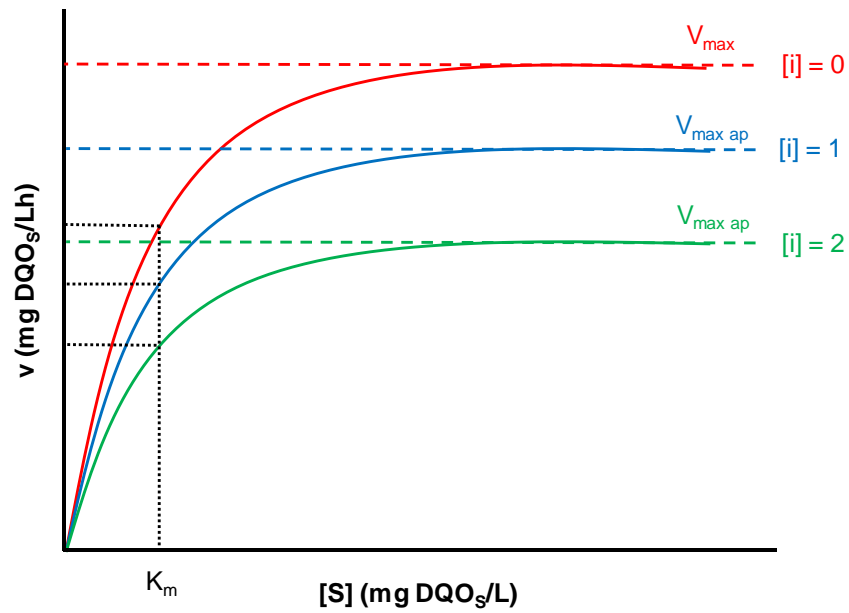


Figura 2.4 Representación del comportamiento de inhibición no competitiva. Velocidad de reacción vs Concentración de sustrato.

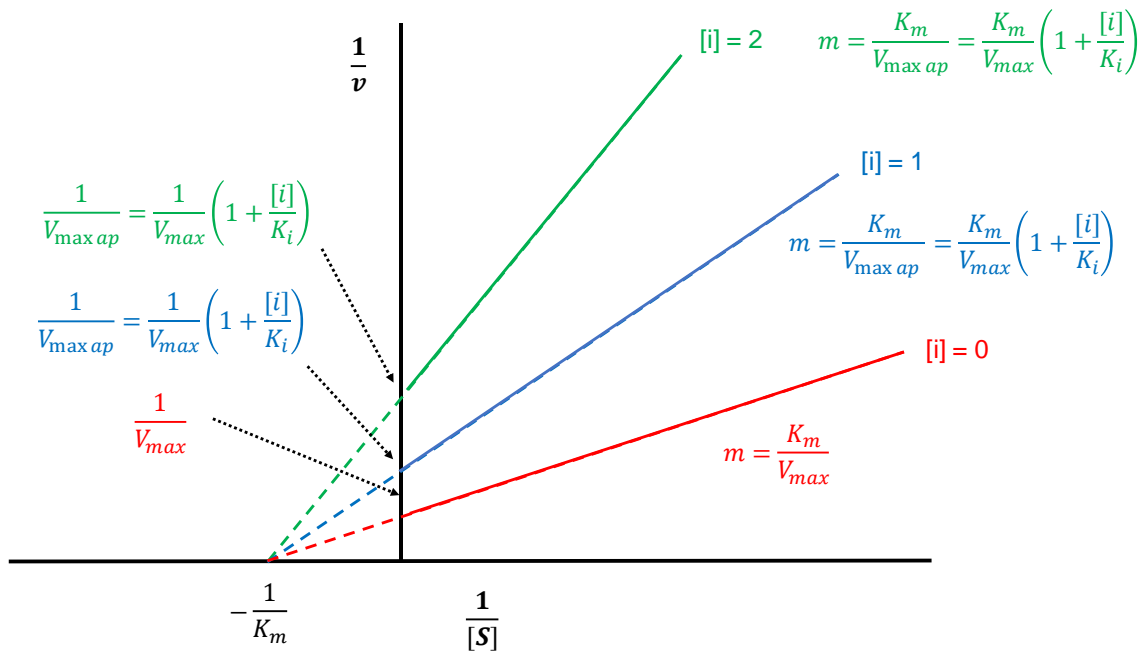


Figura 2.5 Diagrama de dobles recíprocos o diagrama de Lineweaver – Burk para inhibición no competitiva.

### 2.8.3 Modelo de inhibición no competitiva mixta

Existe una variante del modelo de inhibición no competitiva, que es el modelo de inhibición no competitiva mixta. Ésta es un tipo de inhibición no competitiva más común, en donde  $V_{\max}$  se reduce y  $K_m$  aumenta con el incremento de concentración del inhibidor. La ecuación diferencial o forma hiperbólica de la inhibición no competitiva mixta resulta en las Ecuaciones 2.11 y 2.12, respectivamente.

$$V = \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max ap} [S]}{K_m ap + [S]} \dots\dots\dots (2.11)$$

ó

$$V = \frac{d[S]}{dt} = \frac{\frac{V_{\max} [S]}{1 + \frac{[i]}{K_{ii}}}}{K_m \frac{(1 + \frac{[i]}{K_{ic}})}{(1 + \frac{[i]}{K_{ii}})} + [S]} \dots\dots\dots (2.12)$$

La linealización de las Ecuaciones 2.11 y 2.12 se presenta en la Ecuaciones 2.13 y 2.14, respectivamente; mientras que su patrón de comportamiento se puede apreciar en la Figura 2.6.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m ap}{V_{\max ap}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max ap}} \dots\dots\dots (2.13)$$

ó



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[i]}{K_{ic}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[i]}{K_{ii}}\right) \dots\dots\dots (2.14)$$

En donde:

1/v corresponde a los valores del eje “y”

$K_m/V_{max} (1 + [i]/K_{ic})$  es la pendiente “m”

1/[S] corresponde a los valores del eje “X”

$1/V_{max} (1 + [i]/K_{ii})$  es la ordenada al origen “b”

$K_{ii}$  y  $K_{ic}$  corresponden a las constantes de inhibición en  $V_{max}$  y  $K_m$  respectivamente.  $K_{ii}$  corresponde a la unión entre la enzima y el inhibidor,  $K_{ic}$  corresponde a la unión entre del inhibidor con el complejo enzima – sustrato.

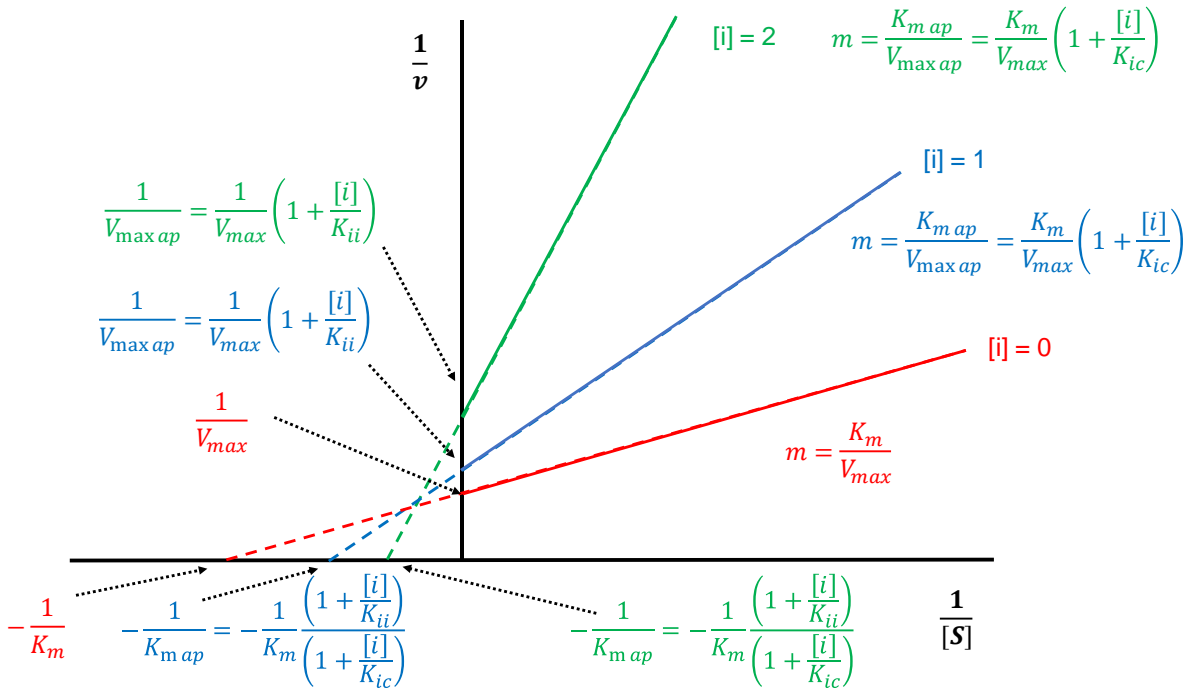


Figura 2.6 Diagrama de dobles recíprocos o diagrama de Lineweaver – Burk para inhibición no competitiva mixta.

Para encontrar el valor de  $K_{ii}$ , a partir de  $V_{\max}$  se tiene que:

$$V_{\max \text{ ap}} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[i]}{K_{ii}}\right)} \dots\dots\dots (2.15)$$

Despejando:

$$K_{ii} = \frac{[i]}{\frac{V_{\max}}{V_{\max \text{ ap}}} - 1} \dots\dots\dots (2.16)$$

Para encontrar el valor de  $K_{ic}$ , a partir de la pendiente “m” se tiene que:

$$m = \frac{K_{m \text{ ap}}}{V_{\max \text{ ap}}} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[i]}{K_{ic}}\right) \dots\dots\dots (2.17)$$

Tomando el segundo y tercer miembro de la Ecuación 2.17, se despeja y se obtiene:

$$K_{ic} = \frac{[i]}{\left(\frac{K_{m \text{ ap}}}{V_{\max \text{ ap}}}\right) \left(\frac{V_{\max}}{K_m}\right) - 1} \dots\dots\dots (2.18)$$

El valor de  $K_{ic}$ , también se puede encontrar a partir de  $K_{m \text{ ap}}$ :

$$K_{m \text{ ap}} = K_m \frac{\left(1 + \frac{[i]}{K_{ic}}\right)}{\left(1 + \frac{[i]}{K_{ii}}\right)} \dots\dots\dots (2.19)$$

Despejando la Ecuación 2.19:

$$K_{ic} = \frac{[i]}{\left(\frac{K_{m\ ap}}{K_m}\right)\left(1 + \frac{[i]}{K_{ij}}\right) - 1} \dots\dots\dots (2.20)$$

## 2.9 MODELACIÓN DEL CONSUMO DE SUSTRATO

Una vez obtenidos experimentalmente los parámetros biocinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{m\ ap}$ ,  $V_{max\ ap}$ ,  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$  por medio de los diagramas de Lineweaver – Burk, se resolvieron las Ecuaciones 2.5 y 2.12 mediante el método numérico Runge – Kutta de cuarto orden (RK 4), bajo las siguientes consideraciones:

1. Utilizando 308, 616 y 952 mg/L como concentraciones de inhibidor:

- El experimento se llevó a cabo en un intervalo de temperatura mesofílico, es decir;  $35 \pm 2$  °C.
- El pH del sustrato alimentado fue alrededor de 7.2
- Los tiempos de consumo de sustrato fueron medidos a las 0, 1, 2, 24, 48 y 72 h.
- El crecimiento de biomasa fue constante, tomando una concentración inicial de 12.30 gSV/L.
- Para experimento blanco, se empleó el modelo de Michaelis – Menten (Ecuación 2.5) y se utilizó un valor inicial de concentración de sustrato medida en forma de DQOs igual a 2,988.96 mg/L con una relación  $S_0/X_0$  cercana a 0.36 y no se suministró D-limoneno.  $K_m$  y  $V_{max}$  se obtuvieron experimentalmente.
- Para los experimentos con inhibidor, se utilizó el modelo de inhibición no competitiva mixta (Ecuación 2.12) y se emplearon concentraciones iniciales de DQOs cercanas a 2,900 mg/L con una relación  $S_0/X_0$  entre 0.34 y 0.36,

---

---

con concentraciones de D-limoneno iguales a 308, 616 y 952 mg/L.  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{m\ ap}$ ,  $V_{max\ ap}$ ,  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$  se obtuvieron experimentalmente.

2. Utilizando 952, 1,904 y 2,856 mg/L como concentraciones de inhibidor:

- El experimento se llevó a cabo en un intervalo de temperatura mesofílico, es decir;  $35 \pm 2$  °C.
- El pH del sustrato alimentado fue alrededor de 7.2
- Los tiempos de consumo de sustrato fueron medidos a las 0, 1, 2, 24, 48 y 72 h.
- El crecimiento de biomasa fue constante, tomando una concentración inicial de 12.30 gSV/L.
- Para experimento blanco, se empleó el modelo de Michaelis – Menten (Ecuación 2.5) y se utilizó un valor inicial de concentración de sustrato medida en forma de DQOs igual a 2,624.48 mg/L con una relación  $S_0/X_0$  cercana a 0.32 y no se suministró D-limoneno.  $K_m$  y  $V_{max}$  se obtuvieron experimentalmente.
- Para los experimentos con inhibidor, se utilizó el modelo de inhibición no competitiva mixta (Ecuación 2.12) y se emplearon concentraciones iniciales de DQOs alrededor de 2,600 mg/L con una relación  $S_0/X_0$  entre 0.29 y 0.36, con concentraciones de D-limoneno iguales a 952, 1,904 y 2,856 mg/L.  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{m\ ap}$ ,  $V_{max\ ap}$ ,  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$  se obtuvieron experimentalmente.

Con ello se realizó la simulación del consumo de sustrato respecto al tiempo mediante el Software Berkeley – Madonna Versión 8.3.14.

## 2.10 VALIDACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS

Para realizar la validación de los datos modelados, se graficaron las concentraciones de sustrato modeladas como  $DQO_s$  contra las concentraciones de sustrato experimentales medidas también como  $DQO_s$ . Este es un método similar al planteado por Martín *et al.* (2010b). De igual modo se obtuvieron los coeficientes de correlación  $R^2$  para cada experimento. Las condiciones bajo las cuales se desarrolló la validación de los modelos de Michaelis – Menten e inhibición no competitiva mixta fueron las mismas en la sección 2.9.

# *CAPÍTULO 3*

## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

---

---

### 3.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN REACTOR ANAEROBIO HÍBRIDO

El Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) en la parte superior estuvo conformado por un lecho fijo (LF) como se observa en la Figura 3.1(a), con un volumen total de 1.05 L de los cuales el 75% fue ocupado por los anillos de material polimérico para que sirviera de medio de soporte bacteriano y realizar las funciones de distribuidor de flujo. El LF estuvo conformado por dos tubos de acrílico concéntricos para que la parte interior del tubo central contuviera el medio de soporte, mientras que por la corona exterior del mismo tubo sirviera como medio de circulación del biogás generado durante el proceso de digestión anaerobia. En la Tabla 3.1 se muestran las longitudes y volúmenes del LF.



(a)



(b)

Figura 3.1 Reactor Anaerobio Híbrido (a) lecho fijo y (b) lecho fluidizado inverso.

Tabla 3.1 Dimensiones del LF.

<b>Filtro anaerobio</b>	
Longitud (cm)	23
Diámetro (in)	3
Diámetro (cm)	7.62
Volumen total (L)	1.05
Volumen útil (L)	0.26
Volumen ocupado (L)	0.79

Por otro lado, el Reactor Lecho Fluidizado Inverso (LFI) que ocupó la parte inferior del RAH como se muestra en la Figura 3.1(b), tuvo un volumen total de 4.96 L, de los cuales el 20% fue para la cámara de biogás, el 30% fue para el lecho (soporte colonizado) y 50% para el volumen útil como se puede apreciar a detalle en las Tablas 3.2 y 3.3

Tabla 3.2 Dimensiones del RLFI.

<b>RFLI</b>	
Longitud (cm)	80
Diámetro (in)	3.5
Diámetro (cm)	8.89
Volumen total (L)	4.96
Longitud lecho (cm)	24
Volumen de líquido (L)	2.5
Volumen lecho (L)	1.5
Soporte limpio (L)	1.2
Soporte colonizado (L)	0.3



Tabla 3.3 Distribución porcentual del RLFI.

	Cámara de biogás	Lecho	Volumen de líquido	Total
<b>Longitud (cm)</b>	15	24	41	80
<b>Volumen (L)</b>	0.9	1.5	2.5	4.9
<b>%</b>	20	30	50	100

### 3.1.1 Estimación de parámetros de diseño de un Reactor Anaerobio Híbrido

De acuerdo con la Ecuación 2.1, para las Cva descritas en la Tabla 2.2 que corresponden a 5, 8 y 10 gDQO/Ld y para diferentes concentraciones de DQO de alimentación con criterios de alta carga para efluentes cítricos correspondientes a 3.5, 6 y 12 gDQO/L, los flujos o caudales de alimentación calculados se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Caudal de alimentación (L/d) del RAH.

Cva (gDQO/Ld) \ DQO (g/L)	3.5	6	12
5	3.6	2.1	1.0
8	5.7	3.3	1.7
10	7.1	4.2	2.1

Se puede observar que a mayor Cva con DQO de alimentación constante, se requiere mayor flujo de alimentación. Mientras que a mayor DQO de alimentación y Cva constante se requiere menor flujo de alimentación. La DQO debe ser un parámetro que debe mantenerse fijo, ya que, si ésta cambia, la Cva y flujo de alimentación también lo hacen, lo que provoca que el reactor trabaje a cargas variables sin tener un control adecuado del proceso de digestión anaerobia.

Por otro lado, con las condiciones descritas en la Tabla 3.4 y utilizando el volumen útil del LFI igual a 2.5 L, el TRH estimado por medio de la Ecuación 2.2 se muestra en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. TRH (h) del RAH.

<b>Cva</b> <b>(gDQO/Ld)</b> \ <b>DQO</b> <b>(g/L)</b>	<b>3.5</b>	<b>6</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	16.8	28.8	57.6
<b>8</b>	10.5	18.0	36.0
<b>10</b>	8.4	14.4	28.8

Con variaciones en la Cva y manteniendo constante la DQO de alimentación, se pueden obtener menores TRH. Con Cva constante y con variaciones de DQO, se obtienen mayores TRH. Por lo que en el RAH se pueden tratar grandes volúmenes de agua residual con altas Cva en TRH cortos.

La velocidad descensional fue calculada por medio de la Ecuación 2.3, tomando como área transversal del RAH un valor de 0.0104 m<sup>2</sup> y los caudales obtenidos en la Tabla 3.4, obteniéndose como resultados los datos mostrados en la Tabla 3.6

Tabla 3.6.  $v_d$  (m/h) del RAH.

<b>Cva</b> <b>(gDQO/Ld)</b> \ <b>DQO</b> <b>(g/L)</b>	<b>3.5</b>	<b>6</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	0.0143	0.0083	0.0042
<b>8</b>	0.0229	0.0134	0.0067
<b>10</b>	0.0286	0.0167	0.0083

La  $v_d$  es directamente proporcional al caudal de alimentación. De acuerdo con los datos de la Tabla 3.6, la  $v_d$  mínima fue 0.0042 m/h y la  $v_d$  máxima fue 0.0286 m/h, con ello se puede determinar que la expansión del lecho fluidizado podría ser entre un 20 y 35%,

basado en pruebas de fluidización con soporte limpio y con soporte colonizado reportadas por Domínguez-Hernández (2016), lo cual significa que de una longitud (altura) inicial de lecho igual a 24 cm se podría expandir hasta 28.8 y 32.4 cm sin que el soporte corra peligro de salir del reactor. Para alcanzar una expansión de lecho del 100%, se podría utilizar una bomba de recirculación de flujo variable para favorecer un mayor contacto de la biopelícula con la materia orgánica a degrada sin que haya problemas por una sobreexpansión del medio de soporte.

Finalmente, la relación Sustrato/Biomasa fue estimada con la Ecuación 2.4, en la que se emplearon los datos de la Tabla 3.4 para el sustrato y como biomasa se utilizaron 1.5 L de soporte colonizado con un valor de MVA de 33.00 gSV/L en su etapa de colonización máxima, que es equivalente a 49.5 gSV (González-Paz, 2015). En la Tabla 3.7 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 3.7.  $S_0/X_0$  (gDQO/gSVLh) del RAH.

<b>Cva</b> (gDQO/Ld) \ <b>DQO</b> (g/L)	<b>3.5</b>	<b>6</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	0.25	0.25	0.25
<b>8</b>	0.40	0.40	0.40
<b>10</b>	0.51	0.51	0.51

Se puede observar que este tipo de reactores son capaces de manejar altas concentraciones de biomasa para el tratamiento de grandes volúmenes de efluentes con alta carga orgánica.

Todos los parámetros de diseño que fueron calculados indican que las dimensiones, geometría y configuración del RAH fueron adecuadas para una operación correcta de este sistema. Se pueden comparar estos resultados con las condiciones de operación en reactores anaerobios reportadas en la Tabla 1.7.

### 3.2 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS

Se puede apreciar en la Tabla 3.8 que los efluentes alimentados al RAH poseen diferentes características fisicoquímicas, lo que hace más simple de tratar al efluente hidrolizado de frutas y verduras teniendo un pH cercano a 7, menor contenido de materia orgánica en relación con el efluente cítrico y ausencia de GyA. Las desviaciones estándar son relativamente altas, ya que los parámetros medidos dependen del lote y del tiempo de muestro, así como de la operación de la planta de procesamiento de cítricos.

Tabla 3.8 Caracterización de sustratos empleados en la operación del RAH.

Parámetro	Unidades	Efluente hidrolizado de frutas y verduras		Efluente cítrico	
		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
<b>pH</b>		6.78	0.21	3.88	0.10
<b>DQO total</b>	mg/L	14,799	2,032	38,780	2,502
<b>DQO soluble</b>	mg/L	12,506	1,798	35,420	1,299
<b>COT</b>	mg/L	713	18	14,192	46
<b>ST</b>	mg/L	6,390	885	21,662	114
<b>SV</b>	mg/L	4,103	840	19,233	363
<b>NTK</b>	mg/L	13.87	2	21.79	2
<b>P</b>	mg/L	0.88	0.01	1.15	0.1
<b>GyA</b>	mg/L	-	-	413	28

Siles *et al.* (2010), presentan una caracterización similar de un agua residual proveniente del prensado de cáscara de naranja. Los valores que reportan son mayores debido a la naturaleza del proceso.

### 3.3 ARRANQUE DE UN REACTOR ANAEROBIO HÍBRIDO

#### 3.3.1 Sustrato

El sustrato utilizado durante el periodo de arranque del reactor fue el efluente hidrolizado de frutas y verduras. Este sustrato fue pretratado en un reactor de hidrólisis a escala piloto operado alrededor de 40 días, a pH de 5.5 para mantener las condiciones acidogénicas dentro del reactor, con un tiempo de retención hidráulica de 10 días. El reactor de hidrólisis alcanzó remociones de DQO en promedio del 22%, con una producción promedio de 1.2 g/L de ácidos grasos volátiles (AGV's) como se muestra en la Figura 3.2.

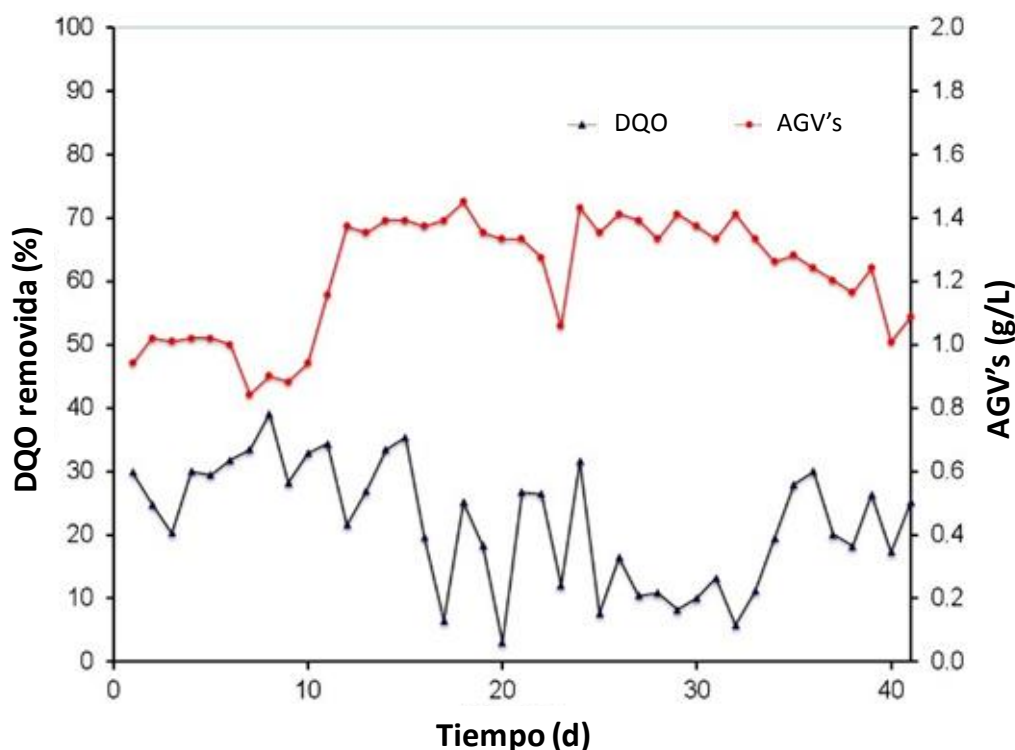


Figura 3.2. DQO removida y producción de AGV's en un reactor de hidrólisis a escala piloto.

El pretratamiento ofrece diferentes ventajas incluyendo las siguientes: 1) reducción de sólidos, 2) reducción de sustratos complejos provenientes de la hidrólisis de

macromoléculas y 3) producción de AGV's, los cuales son intermediarios en el proceso de digestión anaerobia para la producción de metano.

### 3.3.2 Inóculo

Después de 30 días de operación en el periodo de arranque, el material de soporte del LF y del LFI mostró una colonización importante.

El análisis de MVA en el soporte precolonizado usado como inóculo para la sección del LFI fue de 13.98 gSV/L. El LFI fue dividido en tres zonas de acuerdo con lo observado, esto debido a la colonización del soporte, las partículas de mayor densidad se acumularon en la zona inferior del lecho. Las tres zonas del lecho son: zona superior que corresponde al 23.75%, la zona de en medio 47.5% y la zona inferior 28.75% con una concentración de biomasa de 18.75, 20.05 y 47.87 gSV/L respectivamente. El total de biomasa acumulada en el reactor fue de 46.49 gSV.

Con respecto al LF, los tubos poliméricos utilizados como material de soporte no tenían biomasa adherida al arranque del reactor. Al final de este experimento cada uno de los 330 tubos de plástico estaban recubiertos por 0.0072 gSV, por lo tanto, el total de biomasa en esta sección fue de 2.4 gSV.

La rápida colonización del reactor en ambas secciones está relacionada con dos estrategias implementadas en experiencias anteriores: 1) el uso de un sustrato prehidrolizado para alcanzar la biodegradabilidad adecuada y 2) el uso de soporte precolonizado durante el arranque del reactor aplicando una Cva de 5 gDQO/Ld, equivalente a la Cva del reactor donde se obtuvo la fuente de inóculo.

Ambas estrategias, permitieron a las bacterias degradar una cantidad considerable de materia orgánica sin acidificación del medio y favoreciendo la adhesión de biomasa formada (anabolismo) sin aparente conversión a metano, como lo indica Michaud *et*

al. (2002) quienes demostraron que al inicio del periodo de arranque de reactor anaerobio, las bacterias utilizan el carbono removido para construir una matriz polimérica, reduciendo el rendimiento de metano, para que después ya en condiciones de estado estable, el carbón orgánico sea convertido a biogás y el rendimiento de metano sea cercano al valor teórico.

### 3.3.3 Operación inicial

Como se puede ver en la Figura 3.3, durante los primeros 11 días de operación, el rendimiento de metano fue cero aunque la remoción de DQO fue cercana al 20%. El balance de materia muestra que, si la materia orgánica degradada es usada para la formación de biomasa, el arranque del reactor puede reducirse a 15 días.

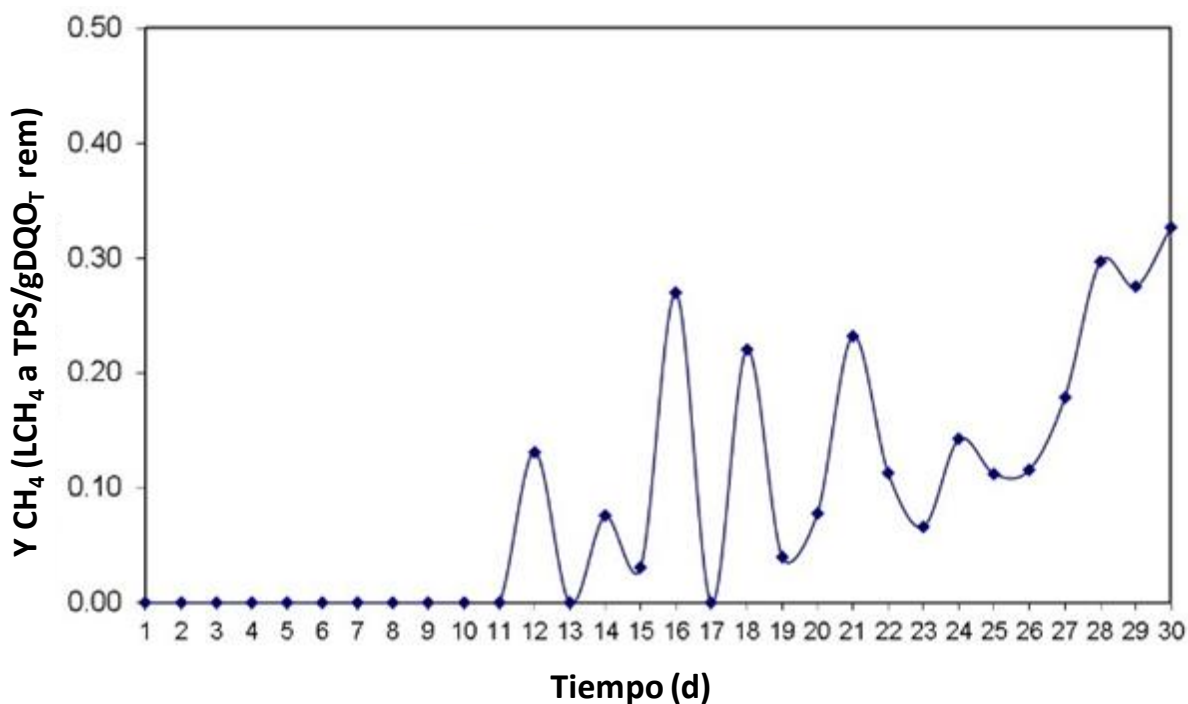


Figura 3.3. Rendimiento de metano basado en la DQO removida.

El pH de alimentación del reactor osciló entre 6.6 y 7.7, este parámetro no se ajustó con ningún tipo de solución amortiguadora, se alimentó tal cual provenía del reactor de hidrólisis. En el interior del reactor, el pH presentó valores entre 6.73 y 8.01, mientras que a la salida tuvo valores de entre 7.2 y 8.4. Esto demostró que la biopelícula tuvo la capacidad de amortiguar el pH, como se aprecia en la Figura 3.4. La mayoría de las bacterias desarrollan un buen metabolismo a pH de 6.8 a 7.2. Un nivel bajo de pH puede causar inhibición bacteriana asociada con ácidos grasos volátiles.

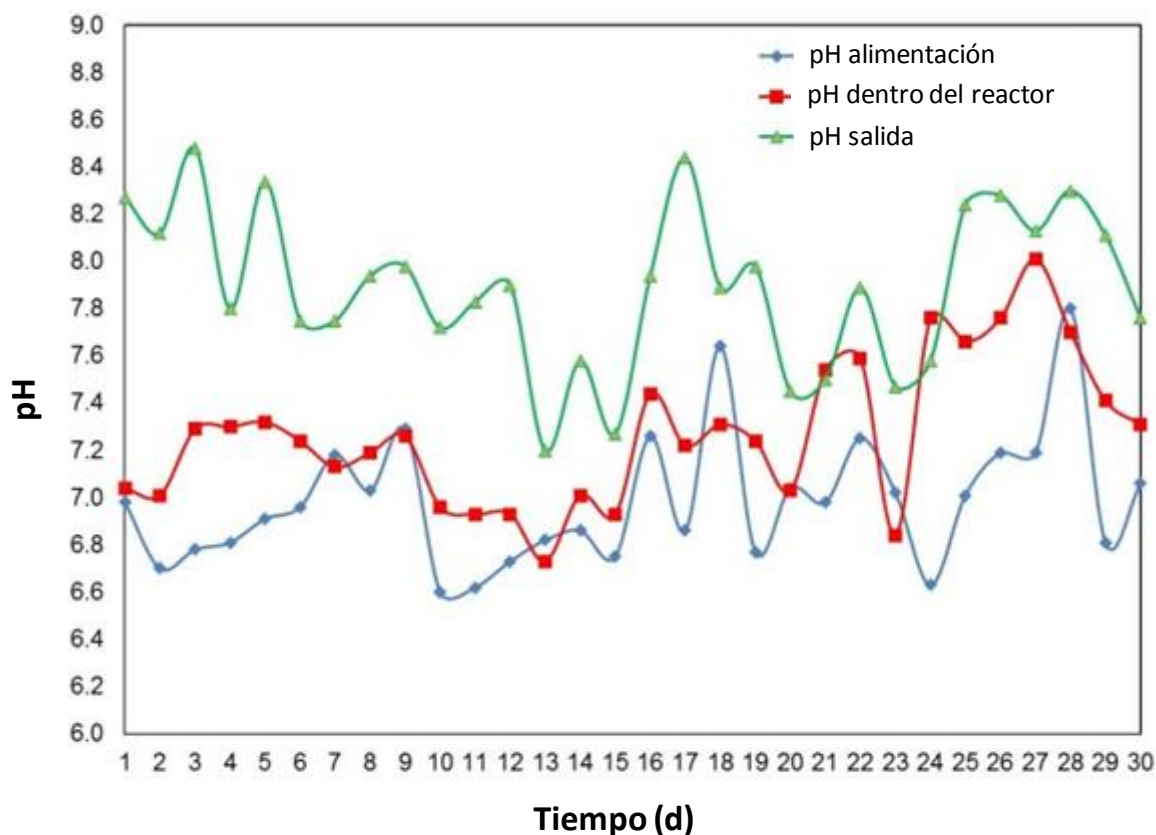


Figura 3.4 Valores de pH del RAH.

Al ser este un dispositivo que puede tratar efluentes de alta carga, durante este experimento se presentaron en promedio concentraciones de entrada de 11,200 y 8,200 mg/L medidas como DQO total y DQO soluble respectivamente. Es evidente la tendencia al alza en los porcentajes de remoción de la DQO total mostrada en la Figura



3.5. Durante los primeros 16 días estas remociones oscilaron entre valores del 10 y 30%, incrementándose de manera significativa hasta alcanzar valores entre el 50 y 70% durante los primeros 30 días de operación manteniendo constante la Cva en 5 gDQO/Ld.

Ying *et al.* (2014), aclimataron el lodo anaerobio de un reactor UASB que fue operado durante 120 días, alcanzando eficiencias de remoción de DQO del 85% con una carga de 8.64 gDQO/Ld. Esto hace pensar que para un RAH los valores esperados en la eficiencia de remoción de DQO pueden ser superiores al 90% si se opera durante un periodo de 30 a 120 días, ya que Alvarado-Lassman *et al.* (2008), observaron que, para dos tipos de soportes utilizados en reactores de lecho fluidizado inverso en el tratamiento de aguas residuales de cervecería, se pueden alcanzar remociones de DQO superiores al 90%.

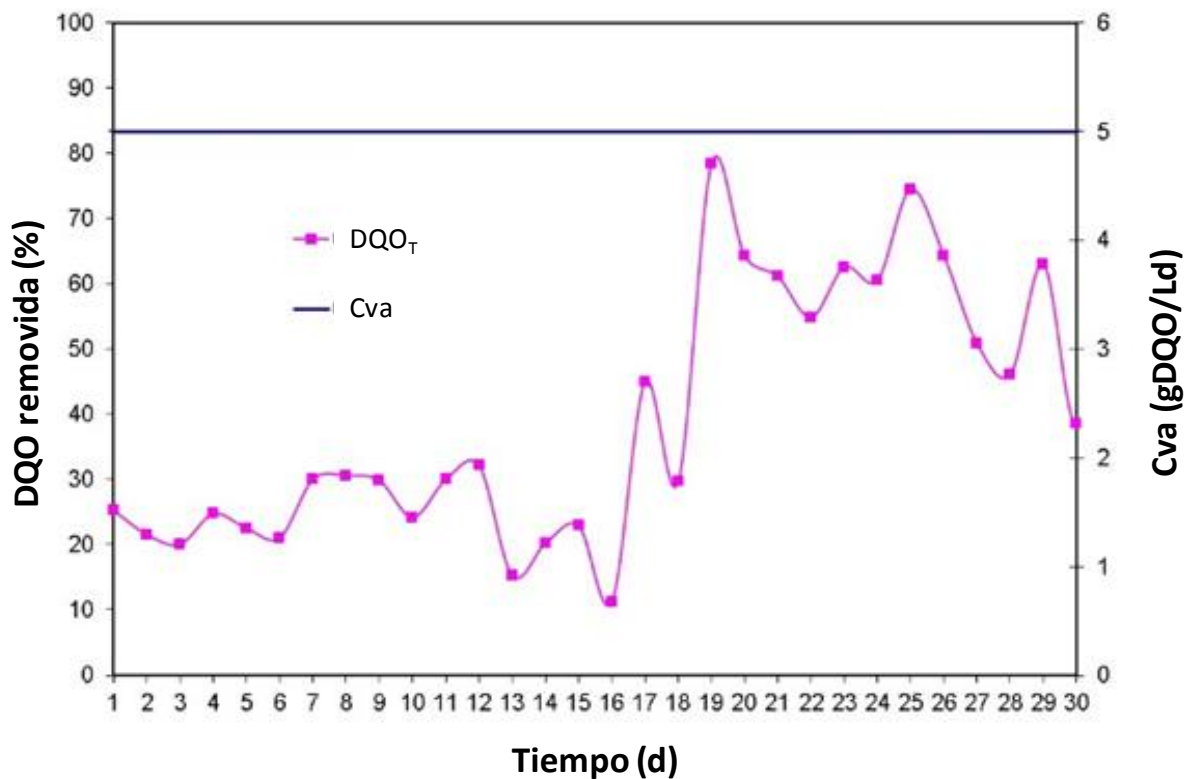


Figura 3.5. Porcentajes de remoción de DQO total del RAH.

Los reactores anaerobios se caracterizan por ser dispositivos que presentan bajas eficiencias de remoción de ST y SV. En el arranque, se observó que el RAH durante los primeros 7 días de operación no presentó eficiencia de remoción en estas dos formas de sólidos, del día 8 al 20 hubo un incremento notable teniendo valores entre 20 y 50% de remoción para ST y entre 20 y 70% para SV, pero observando una diferencia significativa entre ambas curvas como lo muestra la Figura 3.6. Del día 21 al 30, se observó que los porcentajes de remoción de ST y SV mejoraron, alcanzando valores entre 80 y superiores al 90% reduciendo la diferencia entre ambas curvas. Esto se puede deber a que el LF tiene la capacidad de retener sólidos. Generalmente los SV y los ST no dan ninguna información del estado del proceso biológico.

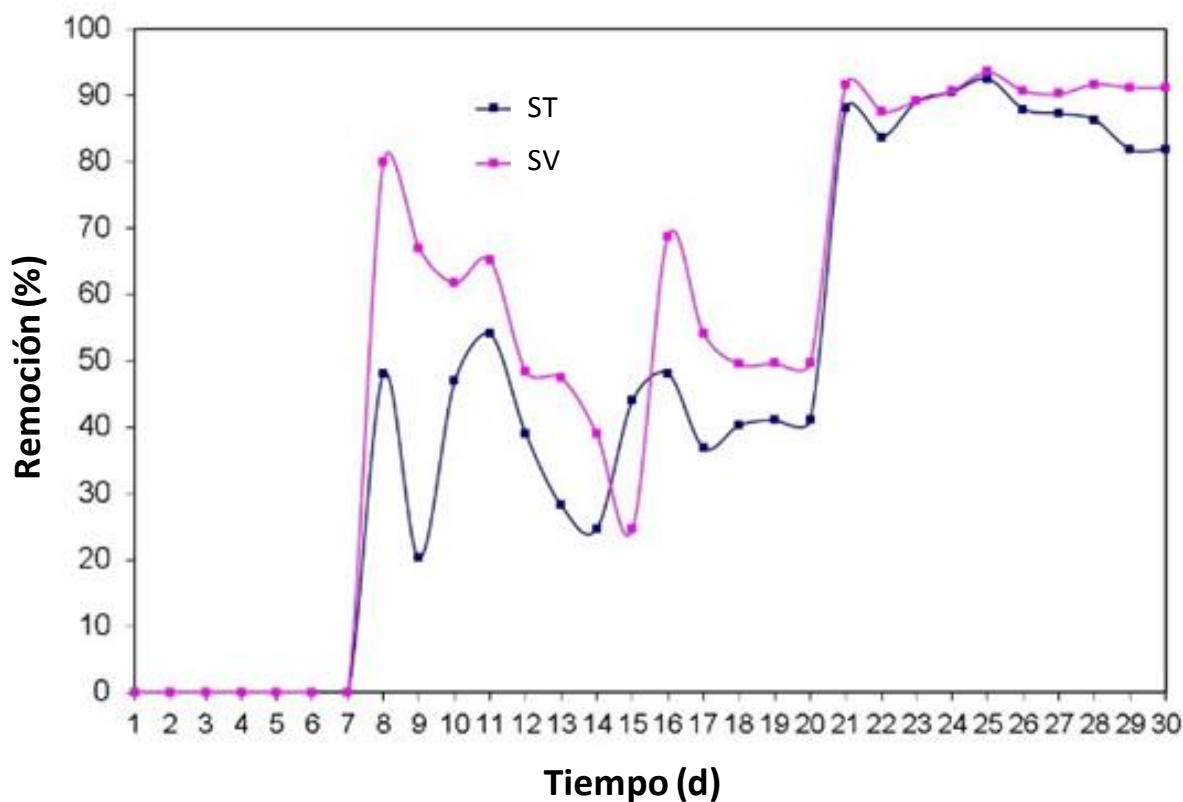


Figura 3.6. Eficiencias de remoción de ST y SV.

### 3.4 OPERACIÓN EN MODO CONTINUO DE UN REACTOR ANAEROBIO HÍBRIDO

Durante la operación del RAH, se puede apreciar en la Figura 3.7 que en la degradación de dos tipos de sustratos diferentes como lo son el efluente hidrolizado de frutas y verduras, así como el efluente cítrico, no se presentó acidificación del medio a excepción de la etapa 3, ya que hubo un cambio de sustrato, teniendo en promedio a la salida  $\text{pH} = 5.80 \pm 1.62$ . Sin embargo, en la etapa 4 es notorio que al disminuir la carga orgánica de 10 a 8  $\text{gDQO/Ld}$  hubo una recuperación del sistema, obteniendo valores de  $\text{pH}$  cercanos a la neutralidad ( $7.45 \pm 0.27$ ). Hussain y Kant (2017), encontraron un mayor potencial bioquímico para la generación de metano a  $\text{pH}$  de entre 7 y 7.8, ya que a  $\text{pH}$  de 6 a 6.5 se presenta una inhibición en la actividad metanogénica. Mientras que Lee *et al.* (2009), reportan que la metanogénesis ocurre eficientemente a  $\text{pH}$  de entre 6.5 y 8.2.

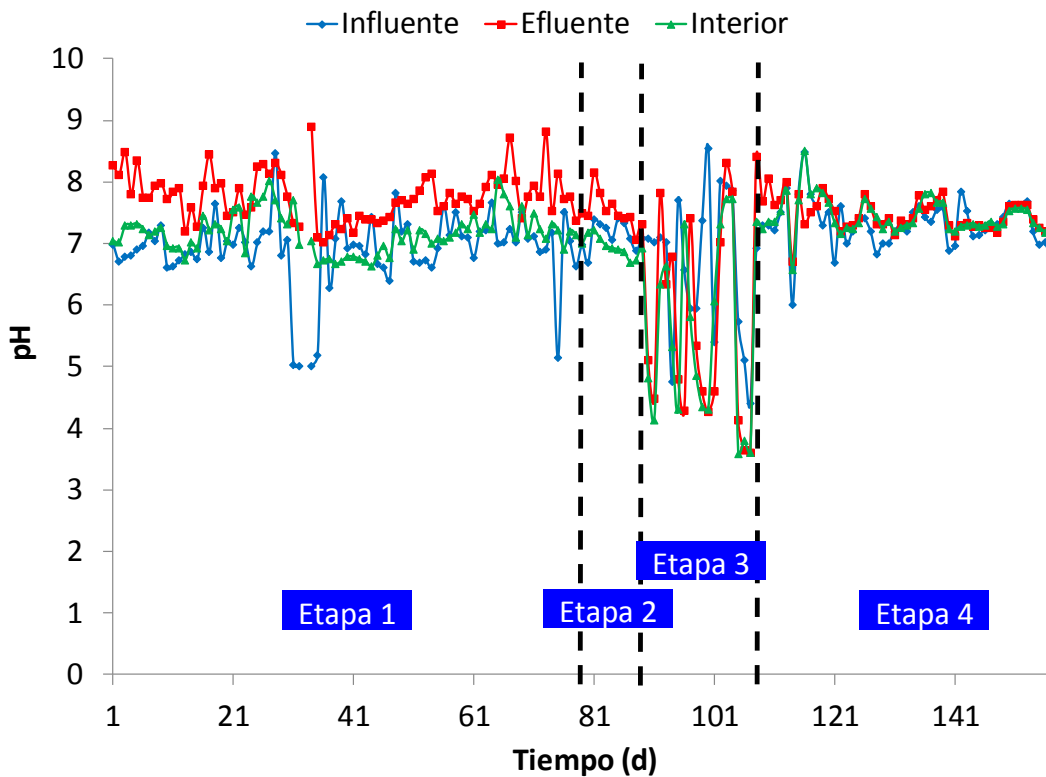


Figura 3.7 Tendencia de  $\text{pH}$  durante la operación del RAH.

Se observó que el uso de bicarbonato de sodio ayuda a mantener homogéneo el pH durante el proceso de digestión anaerobia con efluentes cítricos, ya que cuando se usó hidróxido de sodio, el efluente tiende a cambiar de color, se aglomeran los componentes sólidos presentes en el líquido y el medio se acidifica constantemente, provocando que se suministre una mayor cantidad de este producto químico.

En términos de DQO, durante la etapa 1 en promedio se alimentaron alrededor de 7,800 y 5,200 mg/L de DQO en forma total y soluble, respectivamente, de aquí en los primeros 19 días, la remoción osciló entre el 20 y 30%, esto debido a que la inoculación fue con el 25% de soporte colonizado adaptado a un sustrato de jugo de manzana y el 75% de soporte limpio. Mientras que para la etapa 2, hubo un incremento en la DQO removida llegando a ser de hasta del 95%.

Una vez alcanzada la estabilización en la operación del RAH, se realizó el cambio de sustrato del efluente hidrolizado de frutas y verduras por el efluente cítrico cuyas concentraciones promedio en la alimentación fueron 12,400 y 9,300 mg/L para la  $DQO_T$  y  $DQO_s$ . En la Figura 3.8 se aprecia como decrecen las remociones de DQO del 95 al 70%. Por esta razón se redujo la Cva de 10 a 8 gDQO/Ld, alimentando en promedio  $DQO_T = 9,700$  mg/L y  $DQO_s = 8,200$  mg/L, durante los primeros 20 días de la etapa 4 se aprecia que la flora bacteriana se vio afectada por la concentración de sustrato, sin embargo, existió una recuperación en la DQO removida, alcanzando valores entre el 75 y 85%.

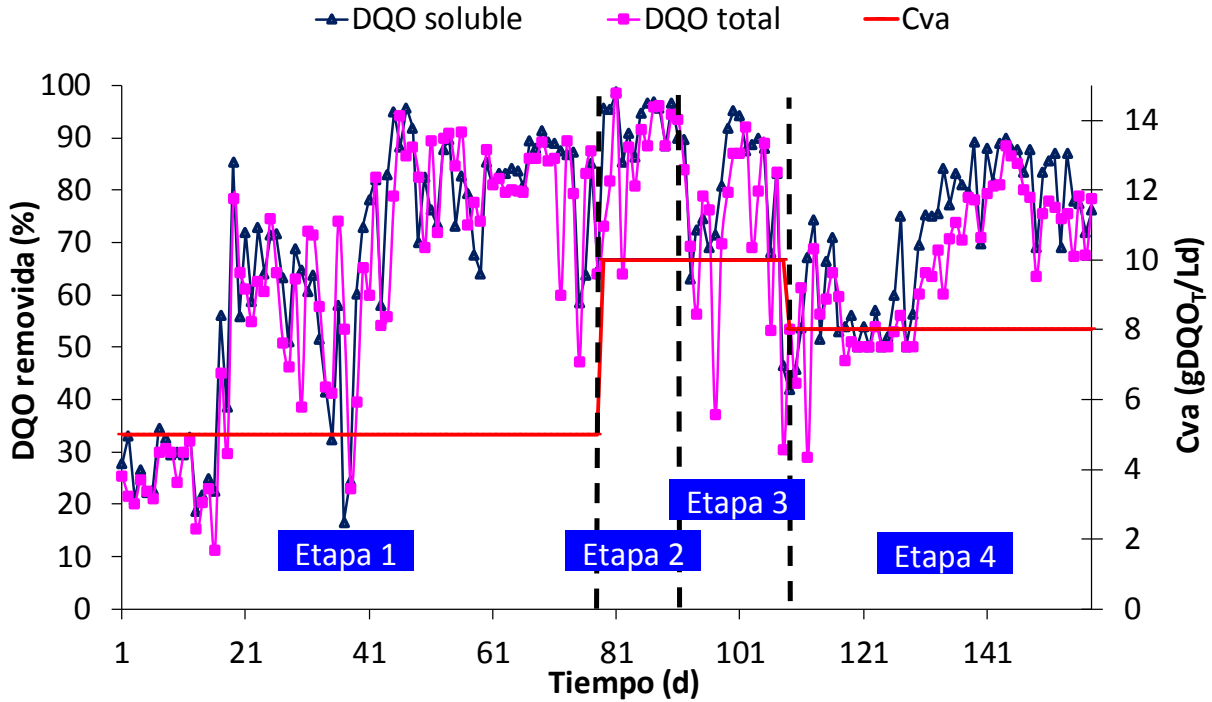


Figura 3.8 Eficiencias de remoción de DQO total y soluble.

Siles *et al.* (2007), encontraron 88.2% de remoción de carbono orgánico total en pruebas batch en tiempos de 48 a 72 horas, sin embargo; reportan efectos de inhibición debidos a la concentración de sustrato y no por causa de D-limoneno, ya que eliminaron por pretratamiento este aceite esencial para evitar efectos tóxicos. Estos resultados son equiparables a los reportados en esta investigación, ya que los valores obtenidos en los porcentajes de remoción de DQO tratando efluentes cítricos son altos, debido a que no hubo eliminación del D-limoneno remanente del proceso presente en el efluente y además el RAH fue operado en modo continuo. En este trabajo, el suministro de nutrientes fue hecho con las relaciones DQO/N/P = 350/7/1, debido a que había que proporcionar los nutrientes necesarios para el metabolismo de los organismos durante el proceso. Sin embargo, usando otros residuos Maroušek *et al.* (2014) encontraron un método convencional de manejo de nutrientes en relaciones COT/NT y CT/NT a partir de residuos de fitomasa.

Por otro lado, el contenido de ST y SV en el efluente fue 8,700 y 6,900 mg/L para la etapa 3, mientras que para la etapa 4 fueron 6,200 y 4,100 mg/L, respectivamente. Esto provocó que para la etapa 3 se removieran 49 y 68% de ST y SV; a su vez para la etapa 4, 42 y 53%, respectivamente.

Algunos residuos provenientes de la aplicación de agroquímicos como fertilizantes, contiene N, P y K, teniendo N como sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) (Kidd *et al.*, 2017). Los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y amonio libre ( $\text{NH}_3$ ) son dos principales formadores de nitrógeno inorgánico. Estas formas son directa e indirectamente causantes de inhibición en sistemas de digestión anaerobia (Yenigün y Demirel 2013).

Un comportamiento similar al de la DQO ocurrió para los rendimientos de metano, en los primeros días de operación de la etapa 1, los rendimientos fueron 0  $\text{LCH}_4$  a  $\text{TPS/gDQO}_{\text{rem}}$  debido a que toda la DQO removida se utiliza para la generación de células nuevas, Michaud *et al.* (2002) obtuvieron un rendimiento de metano igual a cero durante los primeros 7 días de experimentación. De los días 21 al 41 se lograron rendimientos del 0.15 al 0.3  $\text{LCH}_4$  a  $\text{TPS/gDQO}_{\text{rem}}$ . Para la etapa 3, los rendimientos de metano decayeron del 0.3 a 0.05  $\text{LCH}_4$  a  $\text{TPS/gDQO}_{\text{rem}}$ , esto puso de manifiesto un posible efecto inhibitor por la presencia de D-Limoneno en el efluente cítrico. En la etapa 4, al ajustar la Cva se presentó una recuperación en los rendimientos de metano, obteniendo valores cercanos a 0.15  $\text{LCH}_4$  a  $\text{TPS/gDQO}_{\text{rem}}$  como se muestra en la Figura 3.9.

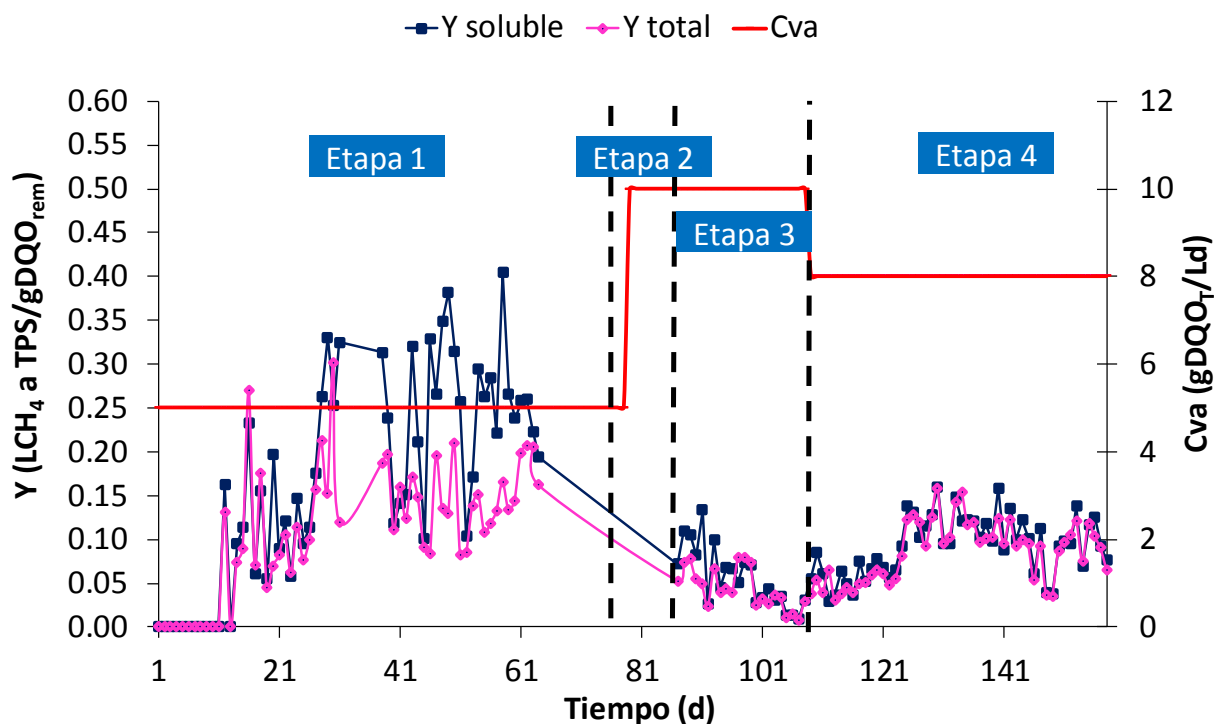


Figura 3.9 Rendimientos de metano.

Estos resultados son congruentes respecto a otras investigaciones, ya que reportan valores similares, pero en tiempos de residencia hidráulica superiores y con cargas orgánicas más bajas. Calabrò *et al.* (2016), reportan un comportamiento de decaimiento en la generación de biogás similar al de la etapa 3 medido como rendimiento de metano, a excepción que el sustrato empleado fue cáscara de naranja degradada en modo batch bajo condiciones mesofílicas con diferentes dosis de exposición con D-limoneno. Es evidente que el uso de un sustrato a base de naranja provoca una disminución en el rendimiento de metano.

### 3.5 ANÁLISIS ENERGÉTICO

Los combustibles fósiles como el carbón, petróleo y gas natural son actualmente una fuente de energía primaria en el mundo (Yatim *et al.*, 2016), por el contrario, el uso de fuentes de energía alternas como el biogás está teniendo una mayor demanda para la generación de energía (Nguyen *et al.*, 2014).

Los volúmenes de metano generado a partir del efluente cítrico a base de naranja son variables y dependen de la estabilidad del sistema, en la Figura 3.10 se observa una mayor estabilidad cuando la Cva es de 8 gDQO<sub>T</sub>/Ld, obteniendo claramente tres tendencias; la primera con 322 m<sup>3</sup>, la segunda con 907 m<sup>3</sup> y la tercera con 736 m<sup>3</sup> de metano a TPS, pero en promedio se obtuvieron hasta 549 m<sup>3</sup> de metano a TPS por día. Mientras que cuando la Cva se mantuvo en 10 gDQO<sub>T</sub>/Ld, se generaron 760 m<sup>3</sup> en sus puntos más altos y en promedio se calcularon 390 m<sup>3</sup> de metano a TPS por día.

A partir del volumen de metano generado, se estimó la conversión teórica a energía eléctrica. Para la Cva de 10 gDQO<sub>T</sub>/Ld la tendencia en sus puntos más elevados fue 7,558 kWh y en promedio fue 3,879 kWh. Para la Cva de 8 gDQO<sub>T</sub>/Ld, nuevamente se aprecian tres tendencias con 3,205, 9,015 y 7,316 kWh respectivamente, obteniendo en promedio 5,458 kWh, La cantidad de energía eléctrica disponible depende de la eficiencia del generador, un generador eléctrico comercial tiene una eficiencia de conversión del 30% aproximadamente (Rosas-Mendoza *et al.*, 2017), con los datos anteriores para la Cva de 10 gDQO<sub>T</sub>/Ld se pueden obtener 2,267 kWh en su tendencia más alta y en promedio 1,164 kWh por día. Mientras que para la Cva de 8 gDQO<sub>T</sub>/Ld, se pueden tener disponibles 961, 2,705 y 2,195 kWh en sus puntos de generación bajo, alto y medio, alcanzando en promedio 1,637 kWh por día. Este comportamiento se puede apreciar en la Figura 3.10.



La planta procesadora de cítricos requiere 67,000 kWh por día para operar, con la energía eléctrica disponible en promedio se puede satisfacer el 1.7% y el 2.4% para cuando el sistema opere a cargas de 10 y 8 gDQO<sub>T</sub>/L\*d, respectivamente. Yatim *et al.* (2016), reportan el 1.47% de aprovechamiento de biogás como fuente de energía renovable para diferentes aplicaciones.

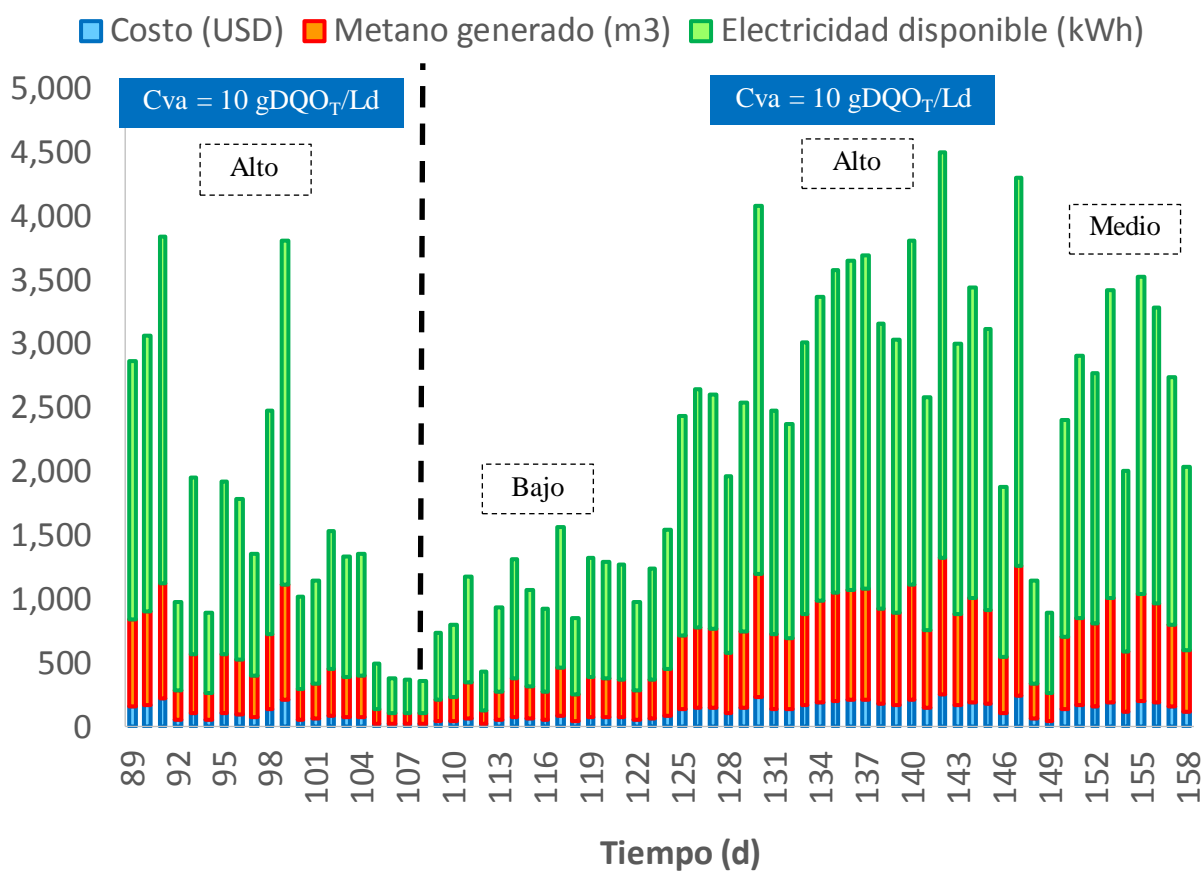


Figura 3.10 Tendencia energética y económica a partir de la generación de biogás.

De manera global, en 70 días de operación con un efluente cítrico, se pueden obtener hasta 350,461 kWh dejando disponibles 105,138 kWh para contribuir al 2.2% de la energía eléctrica total consumida por la planta procesadora. La energía eléctrica que está disponible representa un ahorro y evita consumirla de la red eléctrica de Comisión Federal de Electricidad, esto significa ahorrar cerca de 8,537 USD (161,000 MXN) en

un periodo de poco más de dos meses. La tendencia económica por día se puede observar en la Figura 3.10.

### 3.6 CINÉTICAS BATCH DE INHIBICIÓN CON D-LIMONENO

En total se hicieron ocho cinéticas, es decir; ocho pruebas batch y para cada una de ellas se montaron cuatro experimentos (1, 2, 3 y 4) con las características indicadas en las Tablas 2.4, 2.5 y 2.6. La biomasa (inóculo) que se empleó en cada experimento fue la misma, esto con la finalidad de observar el efecto causado con las variaciones de D-limoneno en la degradación del sustrato.

#### 3.6.1 Evaluación de parámetros (pH, %DQO soluble removida y biogás)

Para el experimento 1 que sirvió como control, en el que no se suministró D-limoneno, se obtuvo el valor más alto de pH con un promedio de  $7.28 \pm 0.13$  en el batch uno, mientras que el valor más bajo fue en los batch seis y ocho obteniéndose en promedio  $6.61 \pm 0.09$  y  $6.61 \pm 0.17$ , respectivamente como se observa en la Figura 3.11a). En el experimento 2, el nivel de pH promedio más alto fue  $7.21 \pm 0.09$  y el más bajo  $6.16 \pm 0.31$ , correspondientes a los batch uno y cuatro mostrados en la Figura 3.11b). El experimento 3, presentó pH promedio de  $7.25 \pm 0.09$  y  $6.03 \pm 0.09$  también en los batch uno y cuatro como valores más alto y más bajo, respectivamente. Finalmente, para el experimento 4 se mostró un comportamiento similar a los dos anteriores, obteniéndose  $7.20 \pm 0.10$  y  $5.79 \pm 0.09$ . Liu *et al.* (2008), reportan que el intervalo favorable para un máximo rendimiento de biogás en digestión anaerobia es con pH de 6.5 a 7.5. Ward *et al.* (2008), encontraron que el intervalo ideal de pH es de 6.8 a 7.2. Mientras que Lee *et al.* (2009), reportan que la metanogénesis ocurre eficientemente a pH de entre 6.5 y 8.2.

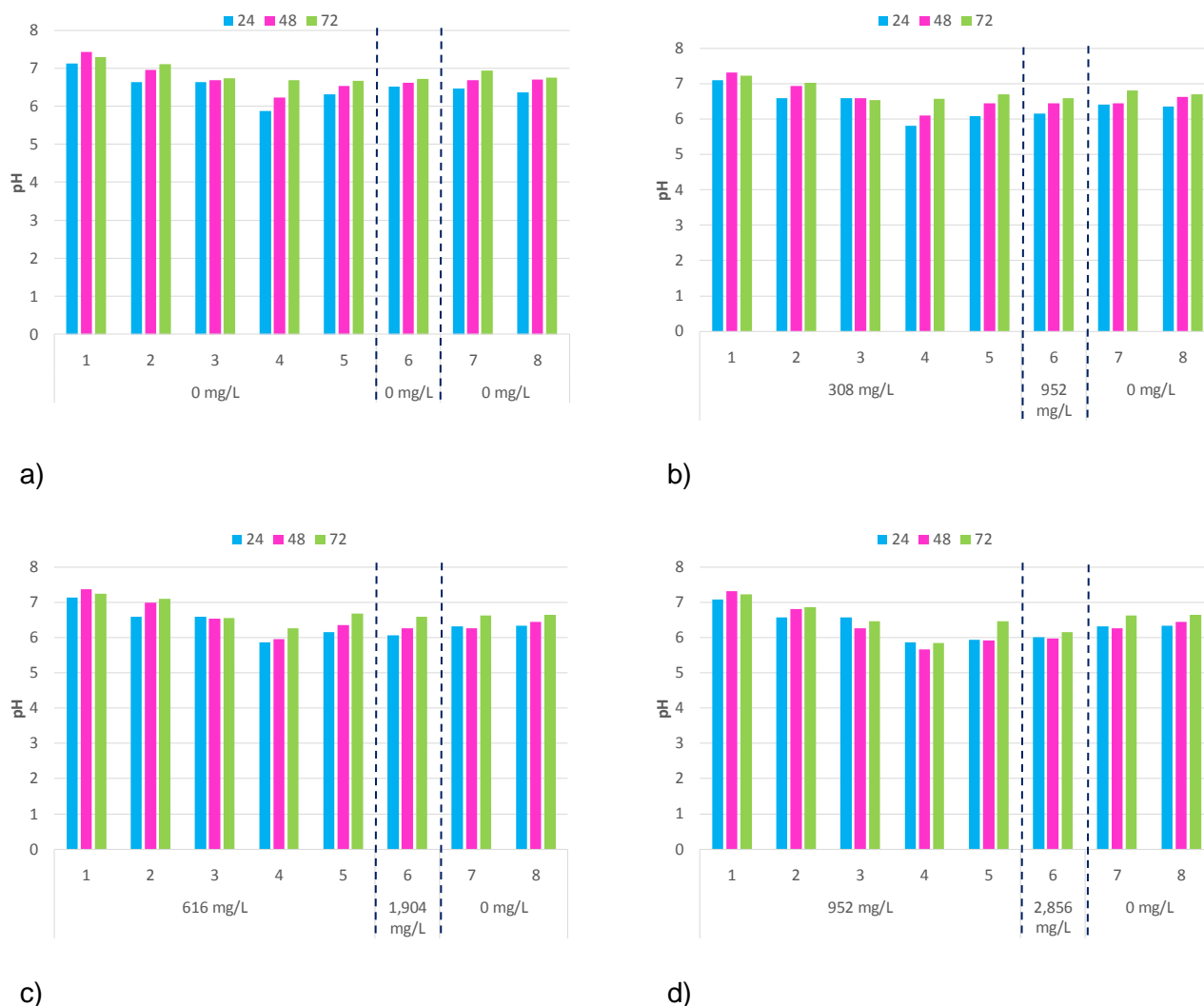


Figura 3.11. Comportamiento de pH. a) Experimento 1, b) Experimento 2, c) Experimento 3 y d) Experimento 4.

En relación con el análisis anterior, con el suministro de D-limoneno en diferentes concentraciones, los experimentos muestran una ligera acidificación al aumentar las dosis de inhibidor y el tiempo de contacto medido en términos del número de cinética o batch. Sin embargo, parece ser que las bacterias logran adaptarse a estas altas concentraciones de inhibidor, ya que para el batch seis en los experimentos 2, 3 y 4 se aumentaron drásticamente las concentraciones de inhibidor y el comportamiento de pH fue similar a como lo venía haciendo. También se observó que para los batch siete

y ocho, cuando se dejó de agregar D-limoneno, los experimentos logran aumentar ligeramente sus valores de pH a las 72 horas.

En cuanto a los porcentajes de DQOs removida, se puede apreciar en la Figura 3.12, que para todos los experimentos en sus respectivos batch, la menor cantidad de materia removida fue a las 24 horas, seguida de las 48 y 72 horas, lo cual es lógico debido al tiempo de residencia del sustrato en cada uno de los reactores. Como siempre se deseaba alcanzar la máxima eliminación de materia contaminante, ésta se dio a las 72 horas, por lo que en el experimento 1 se obtuvieron remociones alrededor del  $82\% \pm 4$  en la mayoría de sus batch. Sin embargo, el experimento 2 en sus primeras cinco cinéticas con 308 mg/L de D-limoneno, alcanzó remociones promedio de  $71\% \pm 7$ , presentando una disminución respecto al experimento 1. Este valor disminuyó a 58% para la cinética seis, ya que se aumentó la dosis de inhibidor a 952 mg/L. Para verificar el efecto de recuperación del sistema, para las cinéticas siete y ocho se obtuvo en promedio  $60\% \pm 4$  como remoción. Todos estos comportamientos se pueden observar en la Figura 3.12b).

El experimento 3 en sus primeros cinco cinéticas con 616 mg/L de D-limoneno, se observa en la Figura 3.12c) un decaimiento de remoción de la cinética uno con 78% a la cuatro con 27% y ésta se recupera en la cinética cinco logrando 61%. En este lapso se obtuvo en promedio  $60\% \pm 18$  de remoción en promedio. Este valor es cercano al que se obtuvo en el mismo periodo del experimento 2. Siguiendo con el experimento 3, se aumentó a 1,904 mg/L la concentración de D-limoneno en la cinética seis, la remoción bajó a 47%, lo que demostró el efecto nocivo de aceite esencial en la flora bacteriana. Este efecto perduró, ya que para las cinéticas siete y ocho a penas se alcanzaron en promedio remociones de  $43\% \pm 2$ .

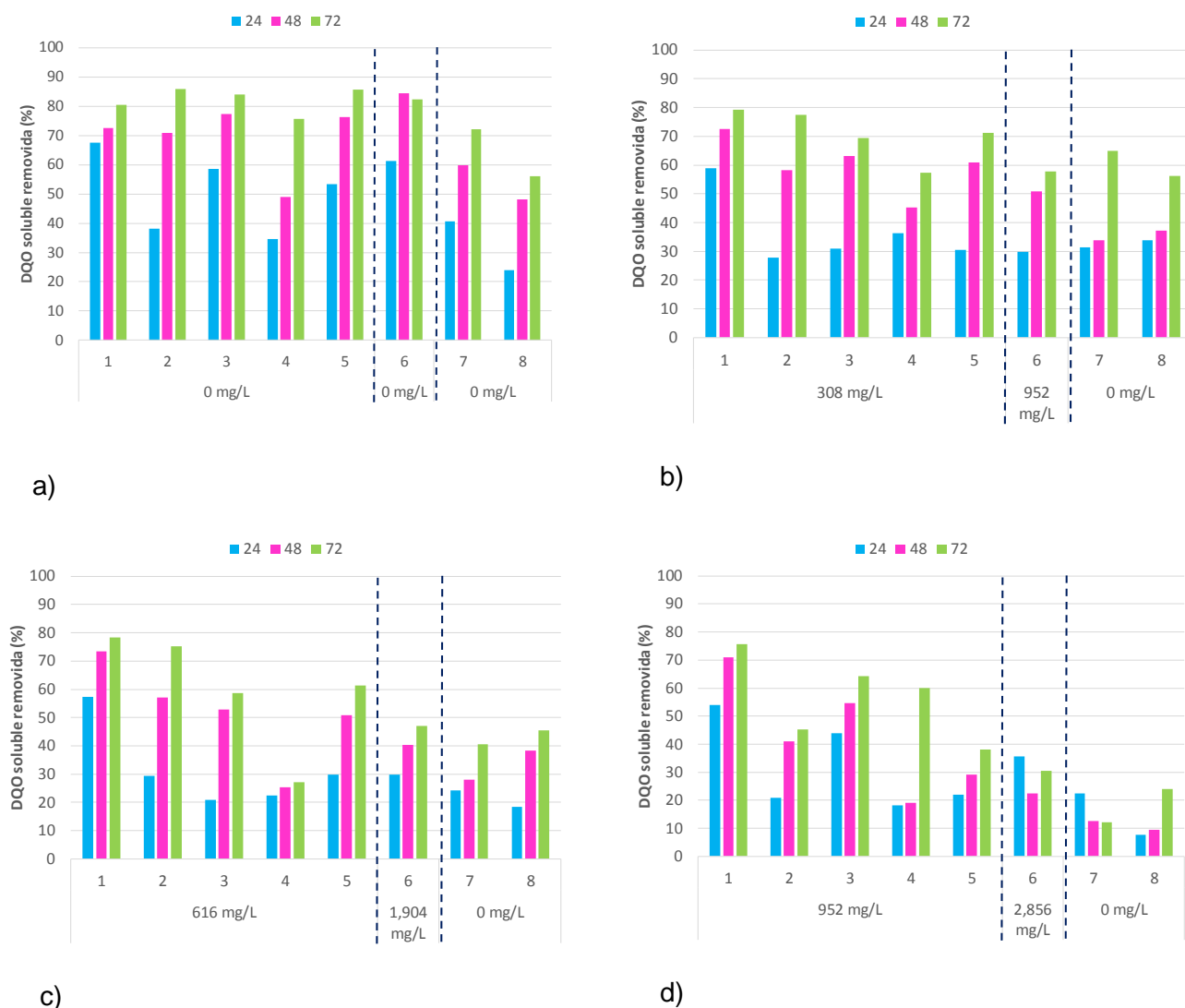


Figura 3.12. Evaluación del porcentaje de DQO soluble removida. a) Experimento 1, b) Experimento 2, c) Experimento 3 y d) Experimento 4.

Por último, en el experimento 4 con dosis máximas de D-limoneno de 952 mg/L, se aprecia en la Figura 3.12d) una disminución rápida de remoción de la cinética uno con 76% a la dos con 45%, incrementado ligeramente sus valores para las cinéticas tres y cuatro con alrededor de 60%, pero descendiendo nuevamente en la cinética cinco hasta 38%. En este periodo en promedio de obtuvieron  $57\% \pm 11$  de remoción. Cuando

se suministraron 2,856 mg/L de inhibidor, la remoción descendió a 36%. El efecto inhibidor continuó para las cinéticas siete y ocho, ya que las remociones que se obtuvieron fueron en promedio  $23\% \pm 1$ , esto a pesar de haber dejado de suministrar aceite esencial.

La investigación de Martín *et al.* (2010b), reporta valores de DQO total igual a 147,680 mg/L, de los cuales existen en forma de COT, 52,970 mg/L. Esto significa que la fracción biodegradable es aproximadamente 35.86%, que es la forma de carbono que puede ser removida por digestión anaerobia, constituida principalmente por glucosa, fructosa y sacarosa (Viuda-Martos *et al.*, 2011). El 64.14% restante corresponde a componentes no biodegradables como celulosa y hemicelulosa (Bicas *et al.*, 2008), que pueden ser removidos por métodos alternativos a los sistemas biológicos. Siles *et al.* (2007), encontraron 88.2% de remoción de COT en pruebas batch en tiempos de 48 a 72 horas, sin embargo, reportan efectos de inhibición debidos a la concentración de sustrato y no por causa de D-limoneno, ya que eliminaron por pretratamiento este aceite esencial para evitar efectos tóxicos. Todo esto hace destacar los resultados encontrados en este estudio cinético, ya que los porcentajes de remoción corresponden a DQO soluble, que contiene componentes biodegradables y no biodegradables, teniendo para el control 82% de remoción en 72 horas y cuando se usó una dosis de D-limoneno 30 veces superior a la de la industria citrícola, se alcanzó 57% de remoción en 72 horas.

La concentración mínima de D-limoneno de este trabajo fue 308 mg/L, que es semejante a la encontrada por Begoña y Flotats (2016), ya que mencionan que el limoneno en la cáscara de los cítricos tiene un efecto inhibidor sobre la digestión anaeróbica para concentraciones superiores a 200 mg/kg. Este efecto inhibidor parece deberse al cimeno, que se produce a partir del limoneno durante la digestión anaerobia.

Los batch siete y ocho de todos los experimentos, es decir cuando se deja de suministrar D-limoneno parecen tener cierta tendencia a la reversibilidad de la inhibición, esto es semejante a lo que indican Begoña y Flotats (2016), ya que observaron signos de recuperación de la actividad anaerobia para diferentes concentraciones de limoneno, a pesar del mecanismo de inhibición no reversible informado en la literatura.

En términos de biogás, siempre se buscó obtener la cuantificación acumulada a las 72 horas, es decir; al final de cada ciclo, pero sin dejar de reportar los volúmenes a las 24 y 48 horas. La cinética uno para los cuatro experimentos fue la que presentó los mayores volúmenes acumulados, obteniéndose 540, 520, 500 y 470 mL, respectivamente; existió una ligera disminución de los experimentos 2, 3 y 4 respecto al experimento control, es decir, a los que presentaron dosis de D-limoneno. En relación con el experimento 1, los volúmenes más altos en promedio fueron 454 mL  $\pm$  40. Para el experimento 2, en los cinco primeros batch se produjeron en promedio 430 mL  $\pm$  52, para el batch seis al triplicar las dosis de D-limoneno no se presentó un decaimiento en la generación, ya que tuvo valores similares al batch previo, alrededor 400 mL. Es probable que el efecto de inhibición se vio reflejado hasta los batch siete y ocho, ya que el biogás disminuyó a 180 mL  $\pm$  20 como se aprecia en la Figura 3.13b).

En el caso del experimento 3, se produjeron en promedio 390 mL  $\pm$  19 en durante las cinco primeras cinéticas, sin embargo; para la cinética seis al incrementar el suministro de D-limoneno, se alcanzó un volumen de biogás de 360 mL, valor parecido a 380 mL del batch cinco. Y nuevamente el efecto de inhibición se ve reflejado en las cinéticas siete y ocho, decayendo a 170 mL  $\pm$  10. El experimento 4 presentó en promedio, durante las cinco primeras cinéticas, un volumen de 330 mL  $\pm$  37.

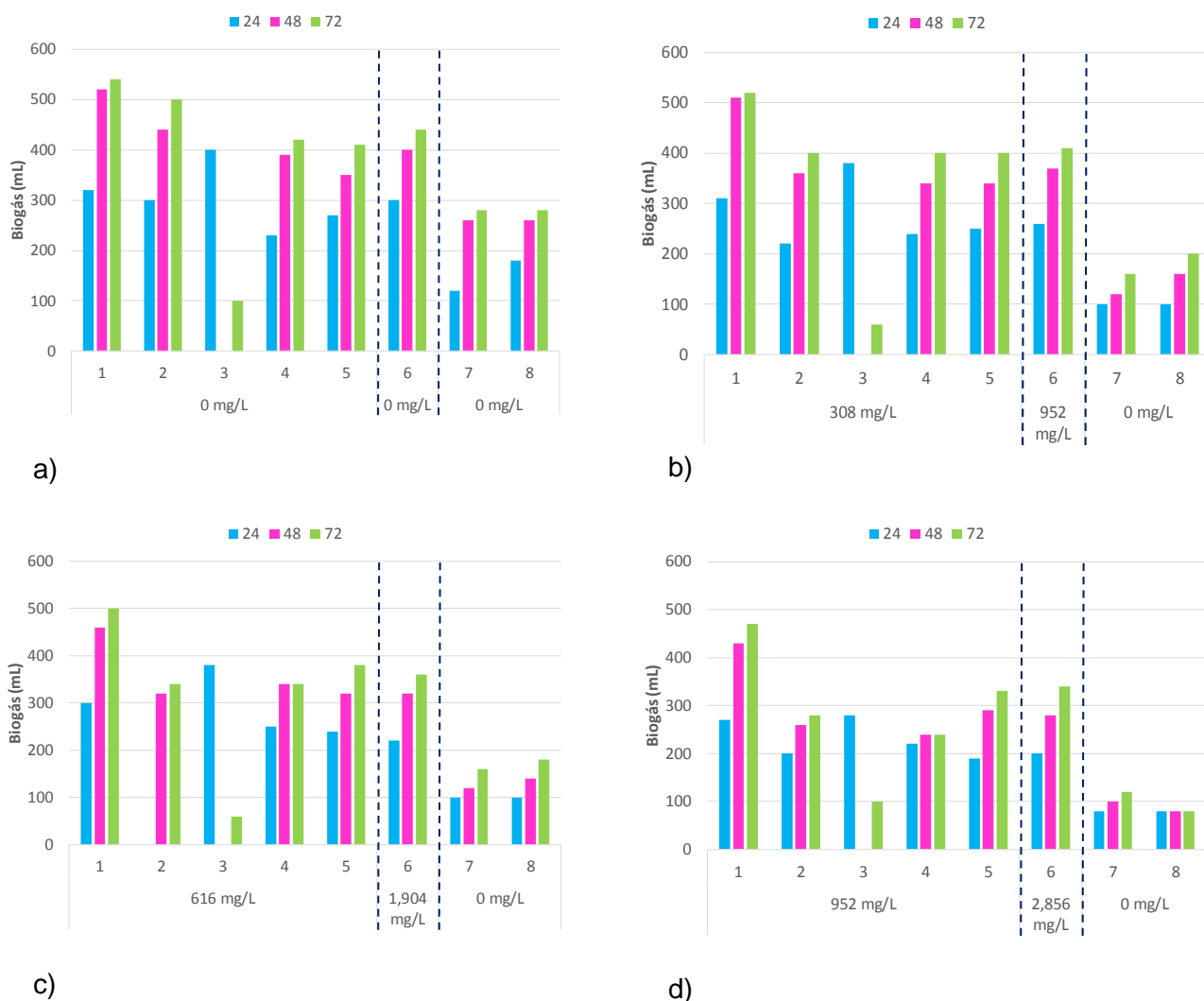


Figura 3.13. Monitoreo en la producción de biogás. a) Experimento 1, b) Experimento 2, c) Experimento 3 y d) Experimento 4.

Los experimentos 2, 3 y 4 presentaron el mismo fenómeno, que consistió en ver reflejado el efecto de inhibición en los batch posteriores al suministro de D-limoneno, y cuando se incrementó la dosis que se venía manejando, nuevamente se presenta la inhibición en los batch posteriores. Otra similitud, es que las bacterias logran adaptarse a las condiciones de inhibidor y es evidente que a mayor concentración de D-limoneno, menor es el volumen de biogás producido.



El análisis cromatográfico presentó 57, 53, 49 y 44% de contenido de metano en el biogás de los experimentos con 0, 308, 616 y 952 mg/L de D-limoneno, respectivamente y en cuanto a los rendimientos de metano, se alcanzaron valores de 0.260, 0.251, 0.248 y 0.210 LCH<sub>4</sub> a TPS/gDQOs removida. Se observaron rendimientos altos a pesar de las elevadas dosis de inhibidor que se manejaron. Estos valores son comparables con Calabrò *et al.* (2016), ya que encontraron rendimientos de metano entre 0.305 y 0.367 LCH<sub>4</sub> normales/gSV removido en un tiempo de 30 días para la degradación anaerobia de residuo de cáscara de naranja, suministrando dosis de aceite esencial (D-limoneno) de 240, 500, 1,000 y 2,000 mg/L bajo condiciones mesofílicas (T = 35 °C). Begoña y Flotats (2016), en la digestión anaerobia de residuos de cáscara de naranja bajo condiciones mesofílicas y en más de 200 días de operación, reportan rendimientos de metano entre 0.05 y 0.150 LCH<sub>4</sub>/gSV removido con suministro de limoneno de 2,000 y 3,000 mg/kg, respectivamente.

### 3.6.2 Consumo de sustrato

En la Figura 3.14 se logra apreciar a detalle el consumo de sustrato respecto al tiempo para cada cinética o batch en presencia de las diferentes concentraciones de D-limoneno. Cuando se utilizaron 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor, a medida que transcurrían los batch, el efecto de inhibición se iba manifestando de manera más clara. Por ejemplo, durante la cinética uno, en la Figura 3.14a) se observa una ligera diferencia a las 24 horas entre el control y los experimentos con dosis de aceite esencial, sin embargo; esta diferencia se reduce a las 48 y 72 horas llegando a tener valores similares en la concentración final de sustrato.

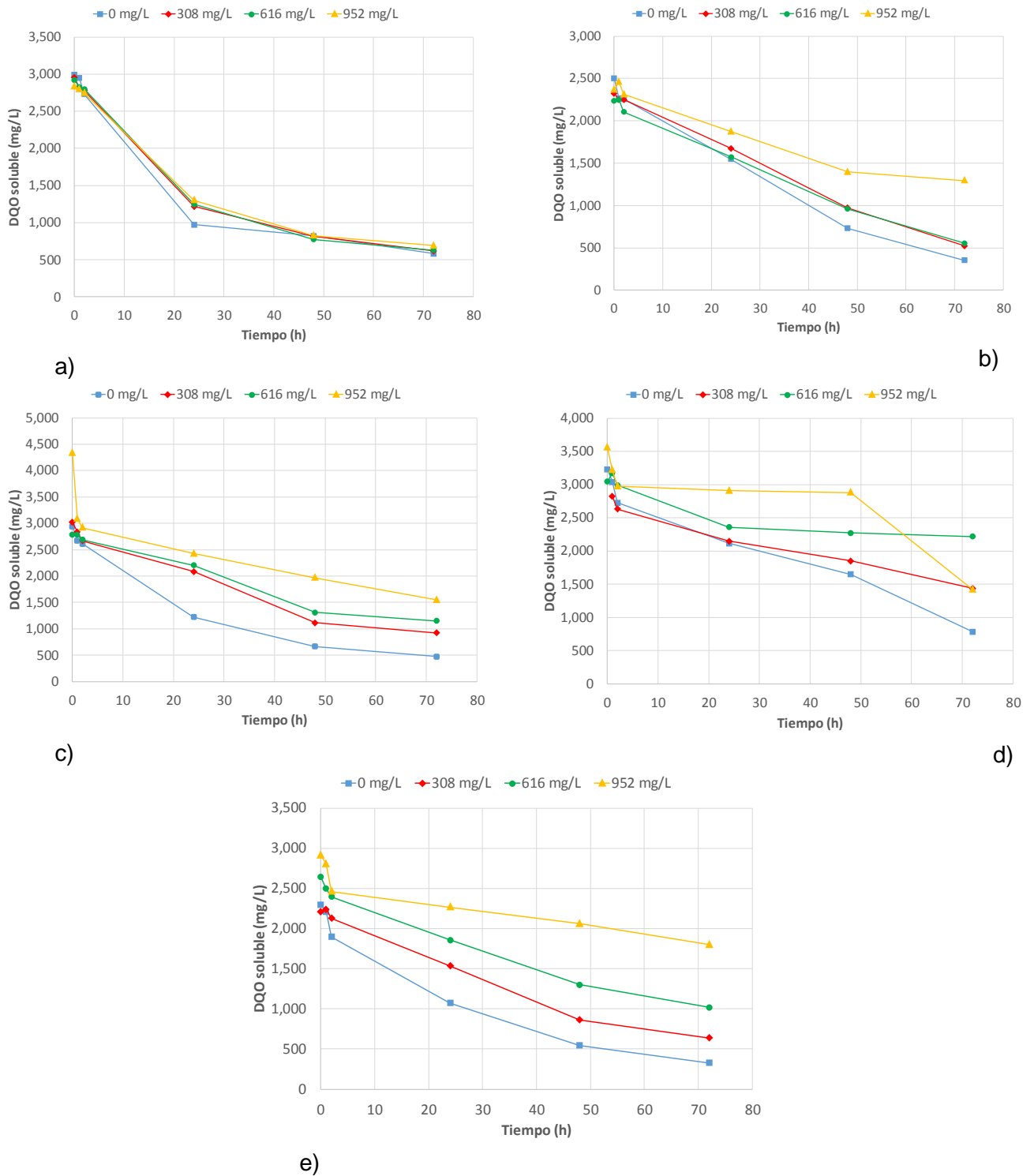


Figura 3.14. Perfil de degradación experimental de sustrato vs tiempo a) Cinética 1, b) Cinética 2, c) Cinética 3, d) Cinética 4 y e) Cinética 5.

Para la cinética dos, ya se aprecia una diferencia muy clara del control con la dosis máxima, pero la diferencia entre las dosis intermedias es mínima entre ellas. En la cinética tres, los cuatro experimentos ya denotan un patrón; sin embargo, la diferencia entre las dosis de 308 y 616 seguía siendo reducida. En el batch cuatro, se observa una diferencia bien marcada que se terminó por acentuar en la cinética cinco.

Una vez logrado este efecto, para evaluar el comportamiento de la biomasa, se aumentaron a 952, 1,904 y 2,856 mg/L las exposiciones de D-limoneno, para lo cual se observa en la Figura 3.15 un patrón similar al de la cinética cinco.

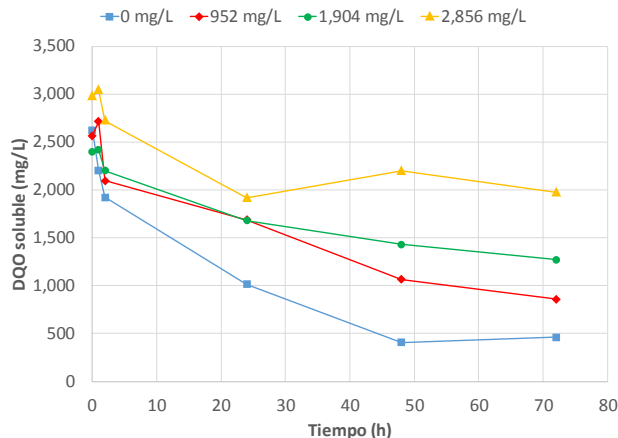


Figura 3.15. Perfil de degradación experimental de sustrato vs tiempo. Aumento de dosis de inhibidor. Cinética 6.

En las últimas cinéticas, se dejó de aplicar inhibidor a la biomasa de todos los experimentos lográndose observar un comportamiento inestable comparado con la cinética 5. Se presentaron diferencias pequeñas a las 24 horas del experimento 1 con el 2 y del experimento 3 con el 4 como se puede ver en la Figura 3.16, pero a las 48 y 72 horas esta diferencia se incrementa y se aprecia muy marcada.

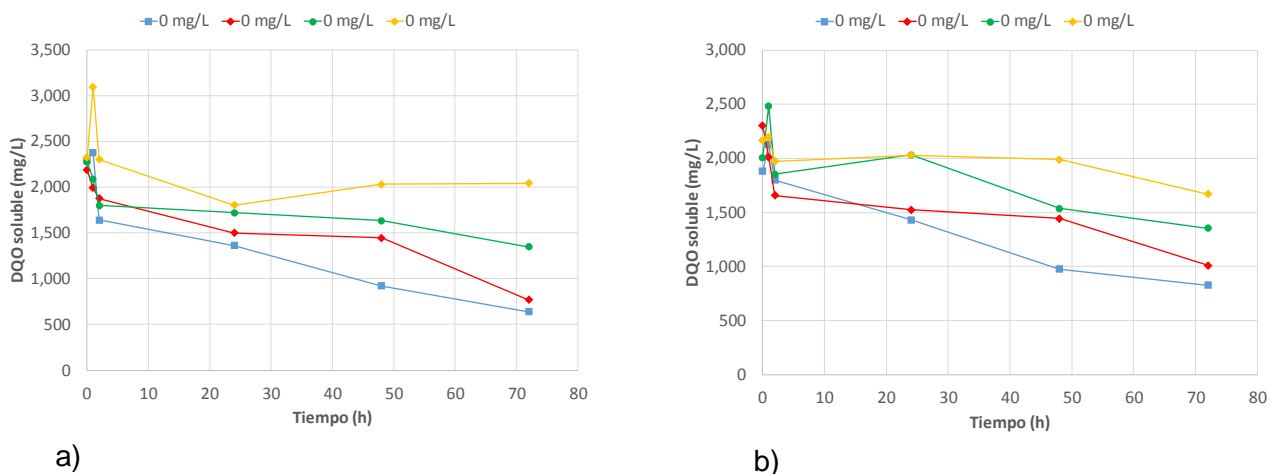


Figura 3.16. Perfil de degradación experimental de sustrato vs tiempo. Sin inhibidor. a) Cinética 7 y b) Cinética 8.

### 3.6.3 Determinación de parámetros biocinéticos con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor

Se realizó la obtención de los coeficientes biocinéticos a partir de la cinética cinco, ya que fue en donde se aprecia un perfil bien definido de inhibición como se describió anteriormente. De acuerdo, al patrón de comportamiento para inhibición no competitiva de la Figura 2.5 y de inhibición no competitiva mixta de la Figura 2.6, se puede apreciar en la Figura 3.17 que el tipo de inhibición para la cinética cinco es no competitiva y no competitiva mixta. Se observa que las intersecciones de la extrapolación de los experimentos con 308 y 616 de D-limoneno no coinciden con la línea extrapolada del experimento control (0 mg/L de D-limoneno), pero el experimento con 952 mg/L logra coincidir en el eje “x” con el control.

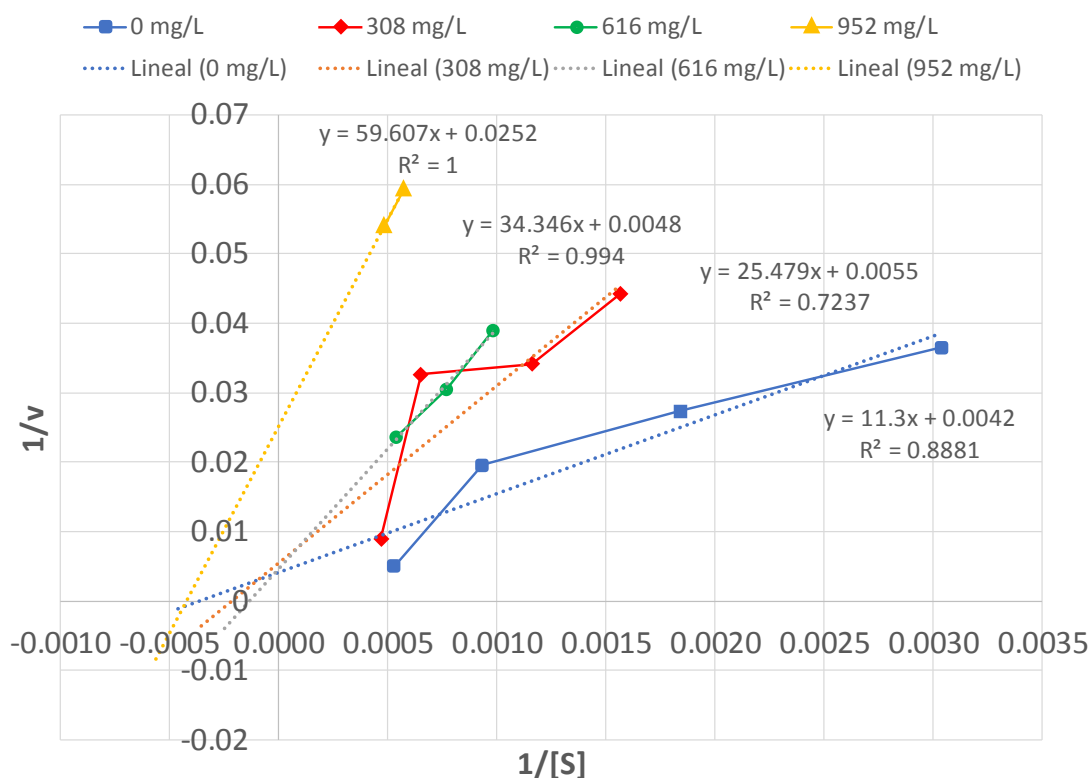


Figura 3.17. Patrón de inhibición no competitiva y no competitiva mixta de los datos experimentales de la cinética 5. Diagrama de Lineweaver – Burk.

Con la linealización de las velocidades de reacción contra las concentraciones de sustrato, se construyó el gráfico de dobles recíprocos o Lineweaver – Burk mostrado en la Figura 3.17. De aquí se encontraron los valores para los coeficientes biocinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{m\ ap}$ ,  $V_{max\ ap}$ ,  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$ , que se encuentran en la Tabla 3.9.

Para obtener los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ , se usó la Ecuación 2.5, estos valores sirvieron de referencia para calcular  $K_{m\ ap}$ ,  $V_{max\ ap}$ ,  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$ , por medio de las Ecuaciones 2.11 a 2.20.

Tabla 3.9. Coeficientes biocinéticos experimentales con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.

<i>Exp</i>	DQO <sub>s</sub> inicial (mg/L)	D-limoneno (mg/L)	K <sub>m</sub> (mg/L)	V <sub>max</sub> (mg/Lh)	K <sub>ii</sub> (mg/L)	K <sub>ic</sub> (mg/L)	K <sub>m ap</sub> (mg/L)	V <sub>max ap</sub> (mg/Lh)
1	2,299	0	2,690	238	-	-	-	-
2	2,212	308	2,690	238	995	245	4,633	182
3	2,872	616	2,690	238	4,312	302	7,155	208
4	2,963	952	2,690	238	190	223	2,365	40

Estos valores tienen un comportamiento lógico de acuerdo con el patrón de la Figura 3.17, sin embargo, fueron optimizados por medio del Software Berkeley – Madonna Versión 8.3.14 con las herramientas “Curve Fit” y “Define Sliders” cuyos valores se presentan en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Coeficientes biocinéticos optimizados con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.

<i>Exp</i>	DQO <sub>s</sub> inicial (mg/L)	D-limoneno (mg/L)	K <sub>m</sub> (mg/L)	V <sub>max</sub> (mg/Lh)	K <sub>ii</sub> (mg/L)	K <sub>ic</sub> (mg/L)	K <sub>m ap</sub> (mg/L)	V <sub>max ap</sub> (mg/Lh)
1	2,299	0	1,144	81	-	-	-	-
2	2,212	308	7,528	125	2,455	812	4,854	112
3	2,872	616	6,700	100	4,500	900	3,500	88
4	2,963	952	6,800	106	330	960	879	27

En relación con K<sub>m</sub>, para el control se encontró un valor de 1,144 mg/L que es alrededor del 50% menor que la concentración inicial de sustrato, lo cual demuestra una alta afinidad de las enzimas producidas vía bacteriana con el sustrato. Cuando se emplearon concentraciones de inhibidor de 308 y 616 mg/L, se observa que los valores de K<sub>m</sub> y por lo tanto los valores de K<sub>m ap</sub> aumentan respecto a la K<sub>m</sub> del control y

respecto a la concentración inicial de sustrato para cada experimento, lo cual indica que, a mayor concentración de inhibidor, menor es la afinidad de las enzimas con el sustrato. No obstante, con 952 mg/L de D-limoneno, se obtuvo un valor de  $K_{m\ ap}$  de 879 mg/L, es decir; cercano al valor de  $K_m$  que presentó el control, pero muy por debajo de su respectiva concentración inicial de sustrato (2,963 mg/L).

El control presentó una  $V_{max}$  de 81 mg/Lh, la tendencia de manera general para cuando se utilizaron concentraciones de aceite esencial es una reducción en  $V_{max\ ap}$  al aumentar las dosis como se muestra en la Tabla 3.10. Los valores de  $K_{ii}$  indican el equilibrio para determinar el rompimiento o unión del inhibidor con el complejo enzima-sustrato, con 308 y 616 mg/L de inhibidor se encontraron  $K_{ii}$  en aumento proporcional igual a 2,455 y 4,500 mg/L, respectivamente. Pero con 952 mg/L,  $K_{ii}$  disminuyó a 330 mg/L. En el caso de  $K_{ic}$ , los valores fueron en aumento gradual conforme se incrementó la dosis de D-limoneno, estos valores indican que el inhibidor se unió a la enzima, formando un complejo enzima – inhibidor, pero los valores resultaron ser muy parecidos promediando 890 mg/L. Las diferencias de los valores de  $K_{ic}$  y  $K_{ii}$  son amplias, excepto para el experimento 4, en el que la diferencia es mucho menor, pudiendo asumirse que  $K_{ic} = K_{ii}$  y por tanto que  $K_{ic} = K_{ii} = K_i$  que es la constante de inhibición no competitiva referida a la formación de un complejo enzima – inhibidor.

Por lo tanto, las inhibiciones de los experimentos 2 y 3 respecto al control, son de tipo no competitiva mixta, en la que el sustrato y el inhibidor se unen a la enzima en sitios activos diferentes, pero también el inhibidor afecta la unión del sustrato con la enzima, aumentando los valores de  $K_m$  y disminuyendo los valores de  $V_{max}$ . Mientras que el experimento 4 respecto al control, presentó una inhibición no competitiva en la que el sustrato y el inhibidor se unen a la enzima en sitios activos diferentes, pero el inhibidor afecta la catálisis de la reacción, disminuyendo  $V_{max\ ap}$  respecto a  $V_{max}$  del control y teniendo un valor cercano para  $K_{m\ ap}$  respecto al valor de  $K_m$  del control. Todos esto se puede observar con detalle en la Figura 3.17.

### 3.6.4 Determinación de parámetros biocinéticos con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor

Para estas concentraciones, se siguió un análisis similar al de la sección 3.6.3, pero tomando como referencia los datos de la cinética o batch seis. Los inversos de las velocidades de reacción y de las concentraciones de sustrato se muestran en la Figura 3.18.

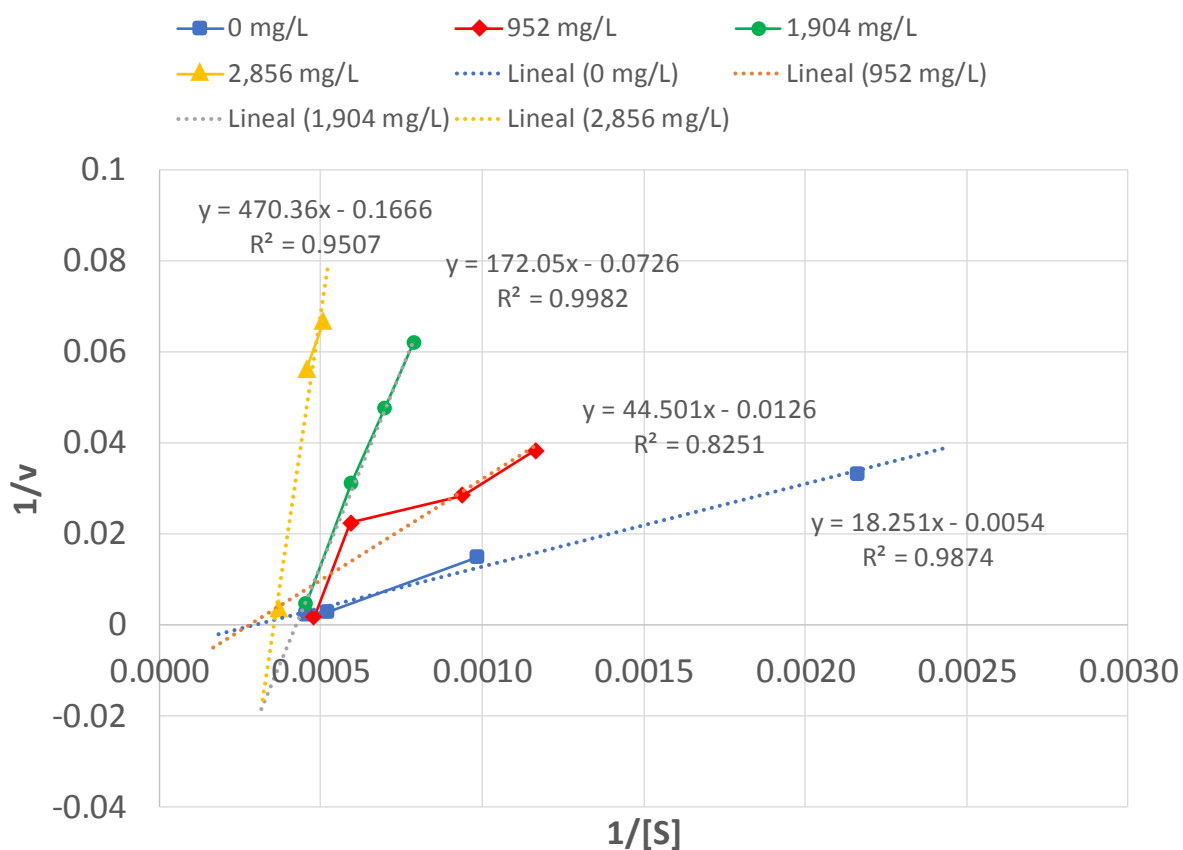


Figura 3.18. Patrón de inhibición no competitiva mixta de los datos experimentales de la cinética 6. Diagrama de Lineweaver – Burk.

Gráficamente, se lo logra apreciar una tendencia hacia un tipo de inhibición no competitiva pura, lo cual hace suponer que los valores de las constantes  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$  de la



inhibición no competitiva mixta tenderán a ser similares, pudieron decirse que  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$  sean  $K_i$ , que es la constante de inhibición no competitiva que se da entre la unión del inhibidor con la enzima. También se logra apreciar en la Figura 3.18 que la pendiente de la línea recta es directamente proporcional a la concentración de inhibidor.

Los coeficientes determinados experimentalmente mostrados en la Tabla 3.11, confirman las observaciones realizadas de manera gráfica, se nota que los valores de  $K_m$  con inhibidor son similares de los de  $K_m$  del control y a su vez muestran cierta tendencia de afinidad entre la enzima y el sustrato.  $V_{max}$  disminuye con el aumento de concentración de D-limoneno.  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$  presentan valores tendientes a la igualdad.

Tabla 3.11. Coeficientes biocinéticos experimentales con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.

<i>Exp</i>	DQO <sub>s</sub> inicial (mg/L)	D-limoneno (mg/L)	$K_m$ (mg/L)	$V_{max}$ (mg/Lh)	$K_{ii}$ (mg/L)	$K_{ic}$ (mg/L)	$K_m$ ap (mg/L)	$V_{max}$ ap (mg/Lh)
1	2,624	0	3,380	185	-	-	-	-
2	2,568	952	3,380	185	714	662	3,532	79
3	2,397	1,904	3,380	185	153	227	2,356	14
4	2,976	2,856	3,380	185	96	115	2,823	6

Estos coeficientes fueron optimizados como se presenta en la Tabla 3.12 y empleando la misma herramienta descrita con anterioridad. Se puede resumir que:  $K_m$  podría promediarse con  $K_m$  del control y  $K_m$  ap de los experimentos 2, 3 y 4 para obtener un valor común de  $K_m = 968$  mg/L válido para todos los casos y con una alta afinidad del sustrato con la enzima. Al aumentar la concentración de D-limoneno,  $V_{max}$  ap disminuye con relación a  $V_{max}$  del control. Los valores de las constantes  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$  son similares por los que podrían promediarse y renombrarse como  $K_i$ , siendo  $690 \pm 30$ ,  $261 \pm 20$  y  $191 \pm 1$  mg/L para 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor, respectivamente.

Las constantes  $K_i$  antes mencionadas, pueden ser tomadas como  $IC_{50}$  y compararse con las reportadas por Begoña y Flotats (2016), en la digestión anaerobia de residuos de cáscara de naranja bajo condiciones mesofílicas, con una constante de inhibición al 50% ( $IC_{50}$ ) = 423 y 669 mg/L, manejando hasta 3,000 mg/kg de limoneno, en la que mencionan que  $K_i = IC_{50}$ . Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos son inferiores a la concentración habitual de limoneno en los residuos de cítricos (Salgado-Segado *et al.*, 2012) y, por lo tanto, es de esperar una inhibición de la digestión anaeróbica de los residuos de cítricos por limoneno.

Calabrò *et al.* (2016) y Begoña y Flotats (2016), atribuyen el efecto de inhibición al p-cimeno, que es un terpeno derivado a partir del D-limoneno después de la digestión anaerobia de residuos a partir de productos cítricos.

Siles *et al.* (2008), determinaron tres constantes cinéticas,  $K_0$  de la materia orgánica a productos intermedios,  $K_1$  de productos intermedios a AGV's y  $K_2$  de AGV's a metano, para la digestión anaerobia de agua residual del proceso de prensado de cáscara de naranja. Los valores de  $K_0$  fueron  $0.85 - 0.18 \text{ h}^{-1}$ , para  $K_1 = 0.90 - 0.30 \text{ h}^{-1}$  y  $K_2 = 0.50 - 0.15 \text{ h}^{-1}$ . Concluyen que las constantes disminuyen con el aumento de carga orgánica, mostrando inhibición. El decremento más pronunciado fue para  $K_0$ , lo cual indica que la hidrólisis es el paso más afectado por la inhibición. Martín *et al.* (2010b), encontraron siete constantes cinéticas ( $K_0, K_1, K_2, K_3, K_4, K_5$  y  $K_6$ ) con un modelo más detallado al de Siles *et al.* (2008). Concluyen que la mejor relación inóculo/sustrato fue  $1.70 - 1.75 \text{ gSSV/gDQO}$  y que el fenómeno de inhibición ocurre cuando disminuye la relación inóculo/sustrato. Ambos trabajos asocian la inhibición con el incremento de carga orgánica.

Tabla 3.12. Coeficientes biocinéticos optimizados con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.

<i>Exp</i>	DQO <sub>s</sub> inicial (mg/L)	D-limoneno (mg/L)	K <sub>m</sub> (mg/L)	V <sub>max</sub> (mg/Lh)	K <sub>ii</sub> (mg/L)	K <sub>ic</sub> (mg/L)	K <sub>m ap</sub> (mg/L)	V <sub>max ap</sub> (mg/Lh)
1	2,624	0	1,144	81	-	-	-	-
2	2,568	952	419	80	720	660	441	34
3	2,397	1,904	2,385	340	241	280	2,087	38
4	2,976	2,856	199	340	192	190	200	21

### 3.7 MODELACIÓN DEL CONSUMO DE SUSTRATO CON 308, 616 y 952 mg/L DE INHIBIDOR

Con los coeficientes biocinéticos optimizados, se obtuvo el perfil de consumo de sustrato respecto al tiempo mostrado en la Figura 3.18, por medio de las Ecuaciones 2.5 y 2.11 con la ayuda de Berkeley – Madonna Versión 8.3.14.

Se puede observar un comportamiento similar de los datos modelados al que describen los datos experimentales, sin embargo, para poder validar este comportamiento, se graficaron los datos modelados contra los datos experimentales en términos de DQO soluble como se muestra en la Figura 3.19.

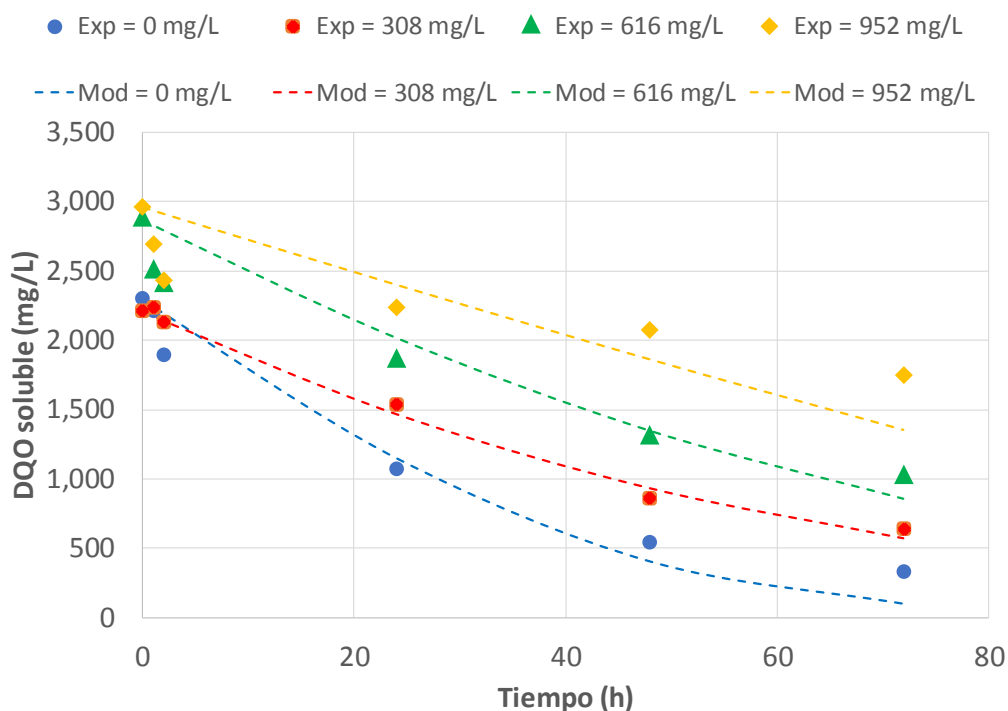


Figura 3.19. Consumo de sustrato respecto al tiempo, datos experimentales y datos modelados con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.

### 3.7.1 Validación de modelos matemáticos

La validación de los datos modelados se representa en la Figura 3.20, graficándolos contra los datos experimentales. Martín *et al.* (2010b), realizaron un método de validación similar y reportan desviaciones de datos modelados contra experimentales entre el 10 y 20%. Siles *et al.* (2008), reportan desviaciones menores al 20% de datos modelados contra experimentales en el modelado de agua residual proveniente del proceso de prensado de cáscara de naranja.

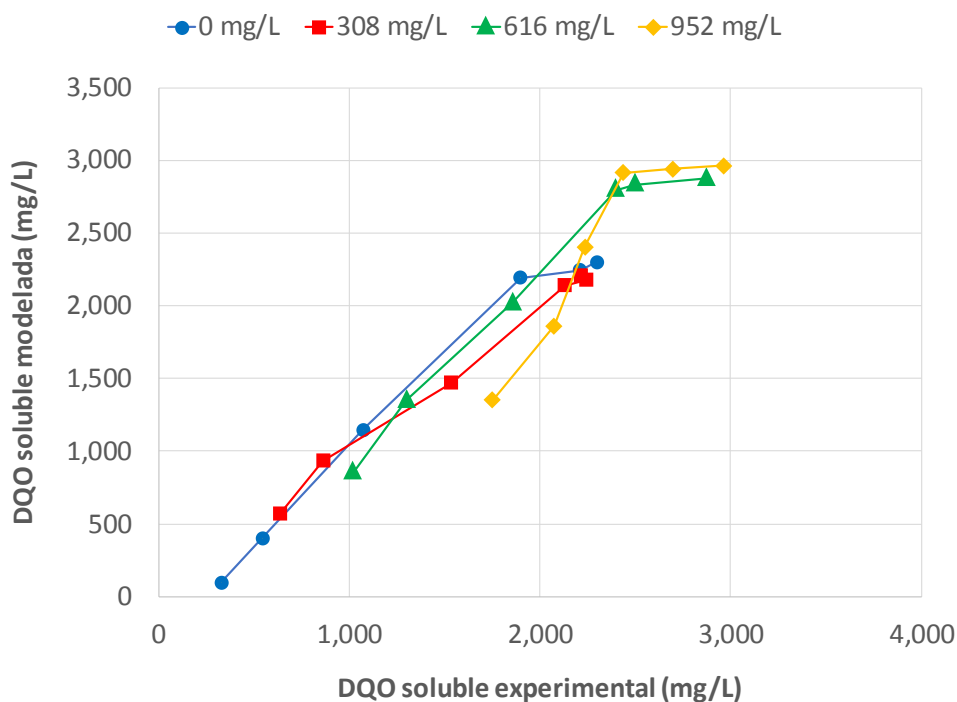


Figura 3.20. Datos modelados vs datos experimentales con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.

Tabla 3.13. Coeficientes de correlación de los datos modelados vs datos experimentales con 308, 616 y 952 mg/L de inhibidor.

<i>Experimento</i>	DQO <sub>s</sub> inicial (mg/L)	D-limoneno (mg/L)	R <sup>2</sup>
1	2,299	0	0.9808
2	2,212	308	0.9938
3	2,872	616	0.9593
4	2,963	952	0.8509

También, se presenta en la Tabla 3.13 el coeficiente de correlación  $R^2$  para cada experimento. Se observa que a mayor concentración de inhibidor  $R^2$  disminuye,

encontrando una desviación máxima del 15% pero aun si, estos valores son adecuados ya que Martín *et al.* (2010b) y Siles *et al.* (2008) encontraron desviaciones menores al 20% de los modelos cinéticos que propusieron respecto a los datos experimentales.

### 3.8 MODELACIÓN DEL CONSUMO DE SUSTRATO CON 952, 1,904 y 2,856 mg/L DE INHIBIDOR

Como se describió en la sección 3.7, los datos modelados de consumo de sustrato respecto al tiempo utilizando muy altas concentraciones de inhibidor se comparan contra los datos experimentales y siguen el comportamiento mostrado en la Figura 3.21.

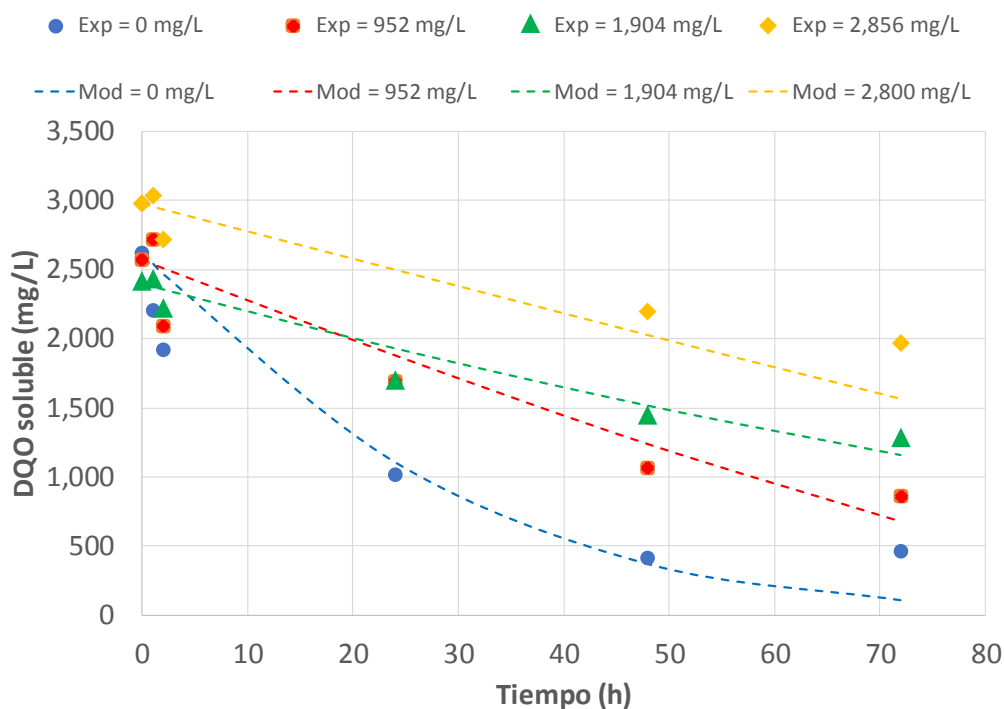


Figura 3.21. Consumo de sustrato respecto al tiempo, datos experimentales y datos modelados con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.

### 3.8.1 Validación de modelos matemáticos

La validación y coeficientes de correlación para muy altas concentraciones de inhibidor se muestran a la Figura 3.22 y Tabla 3.14.

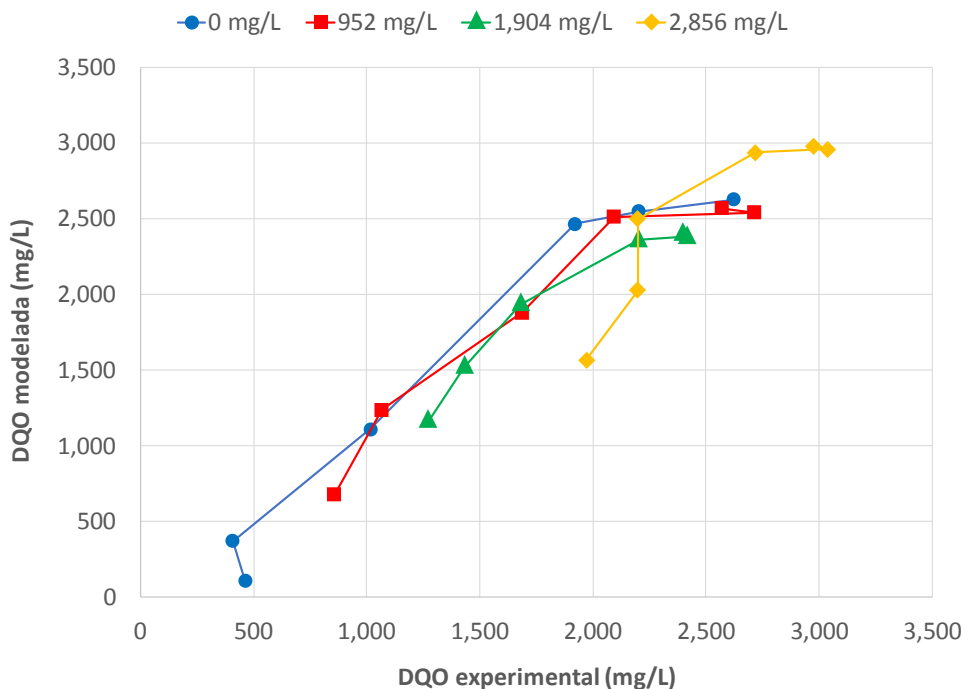


Figura 3.22. Datos modelados vs datos experimentales con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.

Tabla 3.14. Coeficientes de correlación de los datos modelados vs datos experimentales con 952, 1,904 y 2,856 mg/L de inhibidor.

<i>Experimento</i>	DQO <sub>s</sub> inicial (mg/L)	D-limoneno (mg/L)	R <sup>2</sup>
1	2,624	0	0.9520
2	2,568	952	0.9139
3	2,397	1,904	0.9346
4	2,976	2,856	0.8245

---

---

Los coeficientes de correlación son menores cuando se manejan concentraciones de inhibidor mucho más altas. Se pueden comparar las  $R^2$  de la Tablas 3.13 y 3.14 y, aun así, el modelo de inhibición describe de manera adecuada el consumo de sustrato (efluente cítrico) proveniente de la industria citrícola vía digestión anaerobia en presencia de inhibidor en altas y muy altas concentraciones, dadas las siguientes condiciones:

1. Utilizando 308, 616 y 952 mg/L como concentraciones de inhibidor:

- Temperatura  $35 \pm 2$  °C y pH alrededor de 7.2
- Los tiempos de consumo de sustrato 0, 1, 2, 24, 48 y 72 h.
- El crecimiento de biomasa fue constante, tomando una concentración inicial de 12.30 gSV/L.
- Para experimento blanco, se empleó el modelo de Michaelis – Menten (Ecuación 3.1) y se utilizó un valor inicial de concentración de sustrato medida en forma de DQO<sub>s</sub> igual a 2,988.96 mg/L con una relación  $S_0/X_0$  cercana a 0.36 y no se suministró D-limoneno.
- Para los experimentos con inhibidor, se utilizó el modelo de inhibición no competitiva mixta (Ecuación 3.2) y se emplearon concentraciones iniciales de DQO<sub>s</sub> cercanas a 2,900 mg/L con una relación  $S_0/X_0$  entre 0.34 y 0.36, con concentraciones de D-limoneno iguales a 308, 616 y 952 mg/L.

2. Utilizando 952, 1,904 y 2,856 mg/L como concentraciones de inhibidor:

- Temperatura  $35 \pm 2$  °C y pH alrededor de 7.2
- Los tiempos de consumo de sustrato 0, 1, 2, 24, 48 y 72 h.
- El crecimiento de biomasa fue constante, tomando una concentración inicial de 12.30 gSV/L.
- Para experimento blanco, se empleó el modelo de Michaelis – Menten (Ecuación 3.1) y se utilizó un valor inicial de concentración de sustrato medida en forma de DQO<sub>s</sub> igual a 2,624.48 mg/L con una relación  $S_0/X_0$



cercana a 0.32 y no se suministró D-limoneno.  $K_m$  y  $V_{max}$  se obtuvieron experimentalmente.

- Para los experimentos con inhibidor, se utilizó el modelo de inhibición no competitiva mixta (Ecuación 3.2) y se emplearon concentraciones iniciales de DQOs alrededor de 2,600 mg/L con una relación  $S_0/X_0$  entre 0.29 y 0.36, con concentraciones de D-limoneno iguales a 952, 1,904 y 2,856 mg/L.

$$V = \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots (3.1)$$

$$V = \frac{d[S]}{dt} = \frac{\frac{V_{max} [S]}{1 + \frac{[i]}{K_{ii}}}}{K_m \frac{(1 + \frac{[i]}{K_{ic}})}{(1 + \frac{[i]}{K_{ii}})} + [S]} \dots\dots\dots (3.2)$$

# *CONCLUSIONES*

---

---

---

---

## CONCLUSIONES

### 1. Diseño, arranque y acondicionamiento del RAH:

- Los parámetros de diseño que fueron calculados como flujo de alimentación, tiempo de residencia hidráulica, velocidad descensional y relación sustrato/biomasa, todos ellos en función de la DQO de alimentación y de la carga volumétrica aplicada, indicaron que las dimensiones, geometría y configuración del RAH fueron adecuadas para una operación correcta de este sistema para el tratamiento de efluentes con alta carga orgánica como los que provienen de la industria citrícola.
- El tiempo de arranque y estabilización del RAH fue corto con respecto a experiencias previas, principalmente por el uso de un sustrato hidrolizado de frutas y verduras para alcanzar la biodegradabilidad adecuada y el uso de soporte precolonizado como inóculo acondicionado a una alta Cva, todo esto desde el inicio del experimento.

### 2. En modo continuo:

- El RAH operado con alta carga orgánica de 8 gDQO/Ld en modo continuo durante 70 días con un efluente cítrico, presentó valores de pH cercanos a 7, remociones de DQO total y DQO soluble del 75 y 85%, respectivamente, remociones de ST y SV del 42 y 53%, respectivamente; así como rendimientos de metano alrededor de 0.15 LCH<sub>4</sub>/gDQO<sub>rem</sub> en condiciones estándar de temperatura y presión (TPS).
- Se observó un efecto de inhibición por la presencia de D-limoneno en el efluente cítrico, ya que no se empleó pretratamiento para la eliminación de este aceite

---

---

esencial, existiendo un efecto de decaimiento de remociones de DQO y rendimientos de metano.

- Se puede implementar a nivel piloto e industrial el uso del RAH para el tratamiento de efluentes cítricos y así generar y aprovechar una fuente de energía renovable como el biogás. De este modo extrapolando los datos, se puede generar hasta el 2.2% de la energía eléctrica requerida para la operación de una planta procesadora de cítricos. Con este análisis, es posible dar origen a la primera red eco-industrial de cítricos para México, buscando minimizar los impactos negativos en términos ambientales, económicos, tecnológicos y sociales.

### 3. En modo batch:

- Cuando el D-limoneno fue suministrado en concentraciones de 0, 308, 616 y 952 mg/L, se obtuvieron valores de pH igual a 6.92, 6.84, 6.80 y 6.61; remociones de DQO soluble del 82, 71, 60 y 57%; volúmenes de biogás de 313, 277, 244 y 195 mL con rendimientos de metano de 0.260, 251, 248 y 0.210 LCH<sub>4</sub> a TPS/gDQOs rem, respectivamente. Al aumentar las concentraciones de inhibidor a 952, 1,904 y 2,856 mg/L, el pH tendió a la acidificación llegando a 6.40, 6.30 y 6.04; las remociones de DQO soluble disminuyeron a 58, 47 y 34%, respectivamente. Y cuando se dejaron de suministrar dosis de inhibidor, el pH logró incrementar sus niveles a 6.56, 6.44 y 6.44; mientras que la DQO soluble alcanzó 60, 43 y 23% de remoción.
- La biomasa presentó un efecto de inhibición en presencia de D-limoneno, disminuyendo sus valores de pH, porcentaje de DQO soluble removida, generación de biogás y rendimiento de metano cuando las concentraciones de

---

---

este aceite esencial exceden los 308 mg/L. La biomasa mostró un efecto de reversibilidad cuando se dejó de suministrar inhibidor.

- El diagrama de Lineweaver – Burk, demostró que cuando se aumentan las concentraciones de D-limoneno la pendiente de la línea recta también va en aumento, por lo que la inhibición inicia siendo no competitiva mixta a no competitiva pura.
- En concentraciones a partir de 308 hasta 616 mg/L, el D-limoneno actuó como inhibidor no competitivo mixto en la digestión anaerobia de efluentes de la industria citrícola, uniéndose a la enzima y al complejo enzima – sustrato, aumentando los valores de  $K_m$ , disminuyendo las  $V_{max}$  y con amplias diferencias entre  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$ . En concentraciones de 952 mg/L en adelante, el D-limoneno se comportó como inhibidor no competitivo puro, ya que  $V_{max}$  disminuye al aumentar sus dosis, pero  $K_m$  tiene valores similares, siendo  $K_{ii}$  y  $K_{ic}$  muy parecidas transformándose en  $K_i$  afectando la unión enzima – inhibidor.

#### 4. Modelos matemáticos:

- Para los coeficientes biocinéticos: En concentraciones de inhibidor menores a 616 mg/L de D-limoneno,  $K_m = 1,144$  mg/L,  $V_{max}$  por debajo de 112 mg/Lh,  $K_{ii}$  en el intervalo de 330 – 4,500, y  $K_{ic}$  alrededor de 890 mg/L. Utilizando dosis por arriba de 952 mg/L de inhibidor, el valor de  $K_m$  es igual a 968 mg/L,  $V_{max}$  disminuye con relación a  $V_{max}$  del control y los valores de las constantes  $K_{ii} = K_{ic} = K_i = IC_{50} = 690, 261$  y  $191$  mg/L para 952, 1,904 y 2,856 mg/L de D-limoneno, respectivamente.
- Los coeficientes biocinéticos determinados y aplicados en los modelos de Michaelis – Menten y de inhibición no competitiva mixta presentaron

---

---

coeficientes de correlación entre 0.8245 – 0.9938 en referencia con los datos experimentales.

5. Aportaciones al estado del arte:

- Con la implementación del RAH se resuelve una problemática minimizando los efectos de inhibición del D-limoneno en la digestión anaerobia de efluentes cítricos, se encontraron resultados similares a los ya reportados en términos de remoción de DQO, pero con mejoras sustanciales en tiempos de residencia hidráulica y en rendimientos de metano. En la metodología, se dejó de utilizar un pretratamiento para la eliminación de D-limoneno y se implementó una técnica nueva para el tratamiento de estos efluentes.
- Por medio de una metodología y técnica nuevas en el desarrollo experimental y en la modelación matemática, se obtuvieron distintos parámetros biocinéticos, los cuales logrando algunos resultados diferentes y algunos resultados comunes a los ya reportados.

# *RECOMENDACIONES*

---

---

---

---

## RECOMENDACIONES

1. Continuar operando el RAH y verificar parámetros como pH, DQO en sus dos formas, sólidos en todas sus formas, contenido de biogás, rendimiento de metano y GyA pero utilizando otro tipo de efluentes cítricos a base de limón, toronja, piña y tangerina.
2. Realizar incrementos de Cva con los sustratos sugeridos en punto anterior.
3. Probar un sistema difusor o distribuidor de flujo diferente para amortiguar el flujo de alimentación y que éste no descolonice el soporte de la parte superior del lecho.
4. Realizar estudios de hidrodinámica del RAH por medio Dinámica de Fluidos Computacional (Computational Fluid Dynamics, CFD) utilizando efluentes cítricos.
5. Aplicar fenómenos de transporte como difusión de materia orgánica en el proceso de digestión anaerobia con efluentes cítricos.
6. Generar un inóculo especializado en la degradación de cítricos y adaptado a cargas medias y altas de D-limoneno para la optimización de la digestión anaerobia.
7. Utilizar la técnica Reacción de Cadena en Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) para la generación de un inóculo especializado en la degradación de residuos cítricos.
8. Realizar un balance de energía integral en el procesamiento de cítricos para evaluar la cantidad de energía generada vía digestión anaerobia de residuos sólidos y líquidos de una planta procesadora de cítricos.
9. Evaluar con otros modelos matemáticos como primer orden, segundo orden y orden variable los coeficientes biocinéticos de cinéticas de inhibición tipo batch de efluentes cítricos.



- 
- 
10. Realizar cinéticas batch para la aplicación de modelos de primer orden, segundo orden y orden variable, con diferentes relaciones sustrato/biomasa.
  11. Efectuar cinéticas de inhibición en modo continuo con Cva de 8 a 20 gDQO/Ld.
  12. Efectuar cinéticas de inhibición en modo continuo con Cva constante, pero con dosis variables de inhibidor.
  13. Verificar la ruta de rompimiento del D-limoneno en digestión anaerobia por medio de cromatografía de gases y detección de masas.
  14. Analizar los productos intermedios para definir con claridad la ruta metabólica de la digestión anaerobia de efluentes cítricos.
  15. Determinar coeficientes biocinéticos mediante el desarrollo de un modelo propio para la degradación de sustratos cítricos.
  16. Medir el crecimiento de biomasa en todas las pruebas anteriores por medio de técnicas como ATP y ADN para evitar interferencias.
  17. Tratar vía digestión anaerobia los efluentes cítricos derivados del tratamiento avanzado con remanentes de coagulantes y floculantes.

*PRODUCTOS  
ACADÉMICOS*

---

---

---

---

## PRODUCTOS ACADÉMICOS

### Artículos internacionales

#### **Conditioning of an anaerobic hybrid reactor for the treatment of effluents from the citrus industry**

International Journal of Multidisciplinary and Current Research

Estatus: Publicado

ISSN: 2321-3124

### Artículos dentro del JCR

#### **Use of citrus effluents for biogas production: current situation and opportunities in México and Veracruz state**

Revista Mexicana de Ingeniería Química. JCR

Estatus: Enviado RMIQ-190816-2

Factor de impacto: 0.924

#### **Anaerobic co-digestion of citrus waste with cattle manure for biogas production**

Por definir

Estatus: Correcciones y pendiente de enviar

Factor de impacto: Por definir

#### **Anaerobic digestion of citrus industry effluents using an anaerobic hybrid reactor**

Clean Technologies and Environmental Policy. JCR

Estatus: Aceptado

Factor de impacto: 3.331

---

---

## **Congresos nacionales**

### **Acondicionamiento de un reactor anaerobio híbrido para el tratamiento de efluentes provenientes de la industria citrícola**

Coloquio de Investigación Multidisciplinaria CIM 2014

ISSN: 2007-8102

### **Efecto inhibitor del D-limoneno sobre la digestión anaerobia de efluentes de la industria citrícola**

Coloquio de Investigación Multidisciplinaria CIM 2016

ISSN: 2007-8102

### **Pruebas de inhibición de la digestión anaerobia por D-limoneno de un efluente de la industria citrícola**

XXXVIII Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química

ISBN: 978-607-95593-4-2

## **Congresos internacionales**

### **Anaerobic co-digestion of citrus waste with cattle manure for biogas production**

Venice 2016 - Sixth International Symposium on Energy from Biomass and Waste

14 – 17 noviembre 2016

Modalidad oral

---

---

## **Proyectos financiados por CONACYT – SENER**

**Reducción en valores de la DQO del licor de prensa generado en la transformación de biomasa agroindustrial mediante procesos físico-biológicos para su disposición final en PTAR**

ITO-CITREX

Programa de Estímulos a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2016

Estatus: Concluido

## **Patentes**

**Aparato, método y sistema de tratamiento de aguas residuales mediante el aprovechamiento de la fracción de los residuos sólidos orgánicos**

Patente en trámite

*REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

---

---

---

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aivasidis, A. y Diamantis, V.I. 2005. Biochemical reaction engineering and process development in anaerobic wastewater treatment; *Adv. Biochem. Eng/Biotechno.* **92**:49-76.
2. Aiyuk, S., Forrez, I., Lieven K., Van Haandel, A. y Verstraete, W. 2006. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates – A review. *Biores. Technol.* 97, 2225.
3. Alvarado-Lassman, A., Rustria, E., García-Alvarado, M., Rodríguez-Jiménez, G. y Houbroun, E. 2008. Brewery wastewater treatment using anaerobic inverse fluidized bed reactors. *Bioresource Technology.* **(9)**,3009–3015.
4. Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D., Plugge, C. y Stams, J. 2011. Biomethanation and Its Potential, *Methods Enzymol.* 494.
5. Antonio-Quaia, E. 2011. Reducción de la carga orgánica de las aguas de lavado de cáscara del limón por fermentación con levaduras y obtención de alcohol etílico. Tesis de Maestría. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Tucumán.
6. APHA. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation). Washington D.C.
7. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. 2007. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol*, 46, 446–475.
8. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chem Toxicol*, 46: 446–475.

- 
- 
9. Balat, M. y Balat, H. 2009. Biogas as a renewable energy source. *Energy sources, Part A – recovery utilization and. Environ. Eff.* 31(14): 1280–1293.
  10. Baldasano, J. y Soriano, C. 2000. Emission of greenhouse gases from anaerobic digestion processes: comparison with other municipal solid waste treatments. *Water Science and Technology* 41 (3), 275-282.
  11. Bauer, K., Garbe, D. y Surburg, H. 2001. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses, 4th edn. Weinheim: Wiley – VCH.
  12. Begoña, R. y Flotats, X. 2016. Effect of limonene on batch anaerobic digestion of citrus peel waste. *Biochemical Engineering Journal.* 109, 9-18.
  13. Behera, S.K., Park, J.M., Kim, K.H. y Park, H. 2010. Methane production from food waste leachate in laboratory-scale simulated landfill. *Waste Manage* 30, 1502-1508.
  14. Bicas, J.L., Fontanille, P., Pastore, G.M. y Larroche, C. 2008. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *J Appl Microbiol* 105:1991–2001.
  15. Braddock, R. J. 1999. Hand Book of Citrus By-Products and Processing Technology. New York: John Wiley & Sons, Inc.
  16. Buffière, P., Pierre, B.J. y Moletta, R. 2000. The inverse Turbulent Bed: A novel Bioreactor for Anaerobic Treatment. *Water. Res.* **34**(2): 673-677.
  17. Buffière, P., Steyer, J.P., Fonade, C. y Moletta, R. 1998. Modeling and experiments on the influence of biofilm size and mass transfer in a fluidized reactor for anaerobic digestion. *Water Res.* **32**(2): 657-668.



- 
- 
18. Calabrò, P.S., Pontoni, L., Porqueddu, I., Greco, R., Pirozzi, F. y Malpei, F. 2016. Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: Preliminary batch results. *Waste Manage.* 48:440-447.
19. Campbell, M.K. y Farrell, S.O. 2016. Bioquímica. Vol. I. 8a ed. CENGAGE Learning, México, D.F.
20. Castilla, P., Meraz, M., Monroy, O. y Noyola, A. 2000. Anaerobic treatment of low concentration waste water in an inverse fluidized bed reactor. *Water Sci. Technol.* 41: 245-251.
21. Chee, H., Kim, H. y Lee, M. 2009. In vitro antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. *Mycobiology*, 37: 243–246.
22. Chen, Y., Cheng, J. y Creamer, S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technol.* 99:4044–4064.
23. Citrofrut. Colaterales. 2015a. <http://www.citrofrut.com.mx/producto2.html> (consultada abril, 2015).
24. Citrofrut. Productos cítricos. 2015b. <http://www.citrofrut.com.mx/producto1.html> (consultada abril, 2015).
25. Cosme, R.G. 2005. Operación en continuo y estabilización de la biopelícula de un reactor de lecho fluidizado inverso en la remoción de contaminantes de un agua residual. Tesis de grado. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

- 
- 
26. Dambolena, J., López, A., Cánepa, M., Theumer, M. y Zygadlo, J. 2008. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Toxicon*, 51: 37–44.
27. Domínguez-Hernández, E. 2016. Diseño e implementación de un reactor de lecho semifluidizado inverso para el tratamiento anaerobio de un efluente de la industria cítrica. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
28. Duque, M., Giraldo, A., Gauthier, A. y Núñez, A. 1998. Arranque de un reactor anaerobio piloto usando lógica difusa. Universidad de los Andes, Centro de Innovación y Desarrollo Tecnológico (CITEC). Bogotá, Colombia.
29. Edelman, W., Engeli, H. y Gradenecker, M. 2000. Co-digestion of organic solid waste and sludge from sewage treatment. *Water Sci Technol.* 41, 213-221.
30. Electricity SA Residential. Energy Price Fact Sheet. 2016. [https://www.originenergy.com.au/content/dam/origin/residential/docs/energy-price-fact-sheets/sa/20160616/SA\\_Electricity\\_Residential\\_SA%20Power%20Networks\\_Origin%20Everyday5.PDF](https://www.originenergy.com.au/content/dam/origin/residential/docs/energy-price-fact-sheets/sa/20160616/SA_Electricity_Residential_SA%20Power%20Networks_Origin%20Everyday5.PDF) (consultada enero, 2018).
31. Enel. Distribución informa medidas y Plan Preventivo por pronóstico de lluvia en Santiago. 2017. <https://www.eneldistribucion.cl/20170808-enel-distribucion-informa> (consultada enero, 2018).
32. Escudié, R., Conte, T., Steyer, J., P. y Delgenes, J.P. 2005. Hydrodynamic and biokinetic models of an anaerobic fixed-bed reactor. *Process Biochemistry*, 40: 2311-2323.

- 
- 
33. Espina, L., Somolinos M., Loraín S., Conchello, P. y García, D. 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22: 896–902.
34. Fisher, K. y Phillips, C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. *Trends Food Sci Technol*, 19: 156–164.
35. García-Gonzalo, D., Espina, L., Gelaw, T., De Lamo-Castellvi, S. y Pagán, R. 2013. Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and Its potential use in food preservation combined processes. *Plos One*, 8, 1-11.
36. Gavala, H.N. y Lyberatos, G. 2001. Influence of anaerobic culture acclimation on the degradation kinetics of various substrates. *Biotech. and bioeng.* **74**(3):181-195.
37. Gerardi, M. 2003. The microbiology of anaerobic digesters. John Wiley & Sons. pp. 51.
38. Gershenzon, J. y Dudareva, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol.* 3, 408–414.
39. Gomec, Y. 2010. High-rate anaerobic treatment of domestic wastewater at ambient operating temperatures: A review on benefits and drawbacks. *J. Environment. Sci. Health Part A.* 45, 1169.
40. Gómez, M.A. y Schwentesius, R. 1997. La agroindustria de naranja en México. 1st ed. México: CIESTAAM.

- 
- 
41. González-Paz, J.R. 2015. Tratamiento anaerobio del efluente proveniente del proceso de una industria citrícola en un reactor híbrido. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
42. Graunlich, T.R. 1983. Potential fermentation products from citrus processing wastes. *Food Technol.* 12,94-97.
43. Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L. y Leach, D.N. 1999. The structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flav Fragr J.* 14, 322–332.
44. Gujer, W. y Zehnder, A. 1993. Conversion process in anaerobic digestion, *Water Sci. Technol.* 15:123–167.
45. Hu, W., Thayanithy, K. y Foster, C. 2002. A kinetic study of the anaerobic digestion of ice-cream wastewater. *Process Biochem.* 37, 965–971.
46. Hussain, A. y Kant, S. 2017. Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. *Appl Water Sci* 7:535–542.
47. INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2015. Cuantificando la clase media en México: un ejercicio exploratorio. México; [http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/investigacion/Experimentales/Clase\\_media/doc/clase\\_media\\_resumen.pdf](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/investigacion/Experimentales/Clase_media/doc/clase_media_resumen.pdf) (consultada abril, 2015).
48. IQCitrus (Internacional Química de Cobre, división Cítricos). 2015. Proceso de extracción. [http://www.iqcitrus.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=72&Itemid=82](http://www.iqcitrus.com/index.php?option=com_content&view=article&id=72&Itemid=82) (consultada abril, 2015).
- 
-

- 
- 
49. Jaroenkit, P., Matan, N. y Nisoa, M. 2011. In vitro and in vivo activity of citronella oil for the control of spoilage bacteria of semi dried round scad (*Decapterus maruadsi*). *Int J Med Arom Plants* 1: 234–239.
50. Jennett, J. y Dennis, N. 1975. Anaerobic filter treatment of pharmaceutical waste. *J Wat Pollut Cont Fed.* 45:104-21.
51. Jeong, E., Kim, H., Nam, J. y Shin, H. 2010. Enhancement of bioenergy production and effluent quality by integrating optimized acidification with submerged anaerobic membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 101, 1873-2976.
52. Juguera Allende. Procesos. 2015. <http://www.jugueraallende.com/> (consultada abril, 2015).
53. Kaparaju, N. y Rintala, A. 2006. Thermophilic anaerobic digestion of industrial orange waste. *Environ Technol.* 27:623e33.
54. Kidd, J., Manning, P., Simkin, J., Peacock, S. y Stockdale, E. 2017. Impacts of 120 years of fertilizer addition on a temperate grassland ecosystem. *PLoS ONE* 12(3): e0174632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174632>
55. Kleerebezem, R. y Macarie, H. 2003. Treating industrial wastewater: Anaerobic digestion comes of age. *Chemical engineering.* 56-64.
56. Koppa, A. y Pullammanappallil. P. 2013. Anaerobic digestion of peel waste and wastewater for onsite energy generation in a citrus processing facility. *Energy.* (60) 62-68.
57. Lane, A.C. 1982. Prospects for anaerobic treatment of food processing effluents in Australia. *Food Technol. in Australia,* 34,410-411.
- 
-

- 
- 
58. Lee, D.H., Behera, S.K., Kim, J. y Park, H.S. 2009. Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: a lab scale study. *Waste Manage.* vol. 29, 876–882.
59. Liu, C., Yuan, X., Zeng, G., Li, W. y Li, J. 2008. Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* 99, 882-888.
60. López, I. y Borzacconi, L. 2009. Modelling a full scale UASB reactor using a COD global balance approach and state observers. *Chemical Engineering Journal*, 146: 1-5.
61. López-Sánchez, J.R. 2008. Simulación de un reactor UASB para el tratamiento de efluentes de la industria de pulpa y papel. Tesis de maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
62. Lubken, M., Wichern, M., Schlattmann, M., Gronauer, A. y Horn, H. 2007. Modelling the energy balance of an anaerobic digester fed with cattle manure and renewable energy crops. *Water Research* 41, pp. 4085-4096.
63. Mahmoud, N. 2003. Solids removal in upflow anaerobic reactors a review. *Biores. Tech.* 90:1-9.
64. Malina, J.F. y Pohland, F.G. 1992. Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal waste. Tech. Pub. 7
65. Markou, G., Brule, M., Balafoutis, A., Kornaros, M., Georgakakis, D. y Papadakis, G. 2017. Biogas production from energy crops in northern Greece: economics of electricity generation associated with heat recovery in a greenhouse. *Clean Techn Environ Policy* 19:1147–1167.

- 
- 
66. Maroušek, J., Hašková, S., Zeman, R., Váchal, J. y Vaníčková, R. 2014. Nutrient Management in Processing of Steam-Exploded Lignocellulose Phytomass. *Chem Eng Technol* 37:1945–1948.
67. Martín, A., Borja, R. y Banks, C. 1994. Kinetic model for substrate utilisation and methane production during the anaerobic digestion of olive mill wastewater and condensation water waste, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 60 7–16.
68. Martín, M., Siles, J., Chica, A. y Martín, A. 2010a. Biomethanization of orange peel waste. *Bioresource Technology* 101, 8993–8999.
69. Martín, M., Siles, J., Chica, A., y Martín, A. 2010b. Modelling the anaerobic digestion of wastewater derived from the pressing of orange peel produced in orange juice manufacturing. *Bioresource Technology* 101, 3909–3916.
70. Mata, J. 2003. Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes, IWA Publishing, London.
71. Mc Nary, R. y Wolford, R. 1951. Experimental treatment of citrus waste water. *Food Technol.* 8, 319-322.
72. Metcalf y Eddy. 1985. Ingeniería sanitaria. Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales, Segunda edición, Labor, S. A. España.
73. Michaud, S., Bernet, N., Buffie`re, P., Roustan, M. y Moletta, R. 2002. Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. *Water Res.* (36), 1385–1391.
74. Markou, G., Brule, M., Balafoutis, A., Kornaros, M., Georgakakis, D. y Papadakis, G. 2017. Biogas production from energy crops in northern Greece: economics of

- 
- 
- electricity generation associated with heat recovery in a greenhouse. *Clean Techn Environ Policy* 19:1147–1167.
75. Moosbrugger, R.E., Wentzel, M.C., Ekama, G.A. y Marais, G. 1993. Weak acid/bases and pH control in anaerobic systems. A review. *Water S.A.* 19(1):1-30.
76. Muylaert, M.S. y Sala, J. y de Freitas M. 2000. Consumo de energia e aquecimento do planeta: Análise do mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL) do Protocolo de Quioto. Case studies. Rio de Janeiro: Post-graduate Engineering Programs Coordination (COPPE).
77. Naseem, U., Muhammad, A., Javid, A., Asfandyar, K., Zia-ur-R., Sahibzada, M., Farhat, A., Arshad, H., Muhammad, Khu. y Muhammad, N. 2012. Chemical composition and antimicrobial activity evaluation of sweet oranges (*Citrus cinenses*) peels essential oil. *Journal of pharmacy research*, 5 (3), 1698-1700.
78. Nelson, D.L. y Cox M.M. 2008. Lehninger Principles of Biochemistry. 5th ed.: W. H. Freeman and Company. New York.
79. Nguyen, H., Heaven, S. y Banks, C. 2014. Energy potential from the anaerobic digestion of food waste in municipal solid waste stream of urban areas in Vietnam. *Int J Energy Environ Eng* 5:365–374.
80. NMX-AA-029-SCFI-2001. Análisis de aguas - determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba (cancela a la NMX AA- 029-1981).
81. Nutiu, E. 2014. Anaerobic purification installation with production of biogas and liquid fertilizers, *Procedia Technology*. 12:632 – 636
- 
-



- 
- 
82. Olthof, M. y Oleszkiewick, J. 1982. Anaerobic treatment of industrial wastewater, *Chem. Eng.* 15:1321–1326.
83. Pöschl, M., Ward, S. y Owende, P. 2010. Evaluation of energy efficiency of various biogas production and utilization pathways. *Appl Energy* 87:3305–3321.
84. Ramalho, R.S. 1991. Tratamiento de aguas residuales, Reverté S. A. España.
85. Rezzadori, K., Benedetti, S. y Amante, E. 2012. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food and Bioproducts Processing.* 90:106.
86. Rico, C., Muñoz, N., Fernández, J. y Rico, J. 2015. High-load anaerobic co-digestion of cheese whey and liquid fraction of dairy manure in a one-stage UASB process: Limits in co-substrates ratio and organic loading rate. *Chem Eng J.* (262) 794–802.
87. Rosas-Mendoza, E.S. 2007. Evaluación de la competencia entre bacterias desnitrificantes y bacterias metanogénicas en un reactor anaerobio. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
88. Rosas-Mendoza, E.S., Méndez-Contreras, J.M., Martínez-Sibaja, A., Vallejo-Cantú, N.A. y Alvarado-Lassman, A. 2017. Anaerobic digestion of citrus industry effluents using an Anaerobic Hybrid Reactor. *Clean Technol Envir.* DOI 10.1007/s10098-017-1483-1
89. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2015. Estudio de Mercado para identificación de necesidades de infraestructura logística para la comercialización de jugo de cítricos en Veracruz;

---

---

[http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercado/SIST\\_PROD\\_CITRICOS.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/SIST_PROD_CITRICOS.pdf) (consultada abril, 2015).

90. Salgado-Segado, S., Lozano, L.J., de los Ríos, A.P., Hernández-Fernández, F.J., Godínez, C. y Juan, D. 2012. Process design and economic analysis of a hypothetical bioethanol production plant using carob pod as feedstock. *Biores Technol*, 104, 324-328.
91. Sandoval-Ramos, A. 2006. Implementación y evaluación del desempeño de reactores de biopelícula y lodo granular anaerobio para el tratamiento de agua residual industrial. Tesis de maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
92. SARH y BANCOMEXT. 1986. La industria de la naranja en México 1993.
93. Sattar, A. y Mahmud, S. 1986. Citrus Oil Composition of Monoterpenes of the peel oil of Orange, Kinnow, and Lemon. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* 29: 196-198.
94. Secretaría de Economía, Universidad Autónoma Chapingo. 2002. Estudio para dar valor agregado en cítricos. México.
95. SEMARNAT (Secretaría de Marina y Recursos Naturales). 2015. Volumen de descarga de aguas residuales industriales y municipales. [http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi\\_apps/WFServlet?IBIF\\_ex=D3\\_AGUA07\\_10&IBIC\\_user=dgeia\\_mce&IBIC\\_pass=dgeia\\_mce](http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_AGUA07_10&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce) (consultada abril, 2015).
96. SENER (Secretaría de Energía). 2015. Balance Nacional de Energía 2012. Disponible en: [http://sener.gob.mx/res/PE\\_y\\_DT/pub/2012/Balance%20Nacional%20de%20Energia%202012%20\(Vf\).pdf](http://sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/2012/Balance%20Nacional%20de%20Energia%202012%20(Vf).pdf) (consultada junio, 2015).

- 
- 
97. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2015. Cierre de la producción agrícola por cultivo. México. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (consultada junio, 2015).
98. Siles, J., Li, Q. y Thompson, I. 2010. Biorefinery of waste orange peel. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30(1): 63–69.
99. Siles, J.A., Martin, M.A., Martin, Chica, A. y Borja, R. 2008. Kinetic modelling of the anaerobic digestion of wastewater derived from the pressing of orange rind produced in orange juice manufacturing. *Chem. Eng. J.*, 55, 145-156.
100. Siles, J.A., Martin, M.A., Martin, A., Raposo, F. y Borja, R. 2007. Anaerobic Digestion of Wastewater Derived from the Pressing of Orange Peel Generated in Orange Juice Production. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1905-1914.
101. Speece, R.E. 1983. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 17:416–427.
102. Sun, J. 2007. D-limonene: Safety and clinical applications. *Altern Med Rev.*, 12, 259-264.
103. Surendra, K.C., Takara, D., Hashimoto, A.G. y Khanal, S.K. 2014. Biogas as a sustainable energy source for developing countries: Opportunities and challenges. *Renew Sust Energ Rev* 31, 846–859.
104. Tor Mc Partland, T. 2004. Ant spray containing d-limonene and methods of making and using the same. Patente US6784211 B1.
105. USDA. FAS (United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service). 2015. Oranges, Fresh: Production, Supply and Distribution in Selected

---

---

Countries.

<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Oranges%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2366&hidReportRetrievalTemplateID=8> (consultada junio, 2015).

106. USDA. FAS (United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service). 2015a. Oranges, Fresh: Production, Supply and Distribution in Selected Countries (Continued)

[http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Oranges%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries+\(Continued\)&hidReportRetrievalID=2367&hidReportRetrievalTemplateID=8](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Oranges%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries+(Continued)&hidReportRetrievalID=2367&hidReportRetrievalTemplateID=8)  
(consultada junio, 2015).

107. USDA. FAS (United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service). 2015b. Lemons and Limes, Fresh: Production, Supply and Distribution in Selected Countries

<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Lemons+and+Limes%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2184&hidReportRetrievalTemplateID=8>  
(consultada junio, 2015).

108. USDA. FAS (United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service). 2015c. Grapefruit, Fresh: Production, Supply and Distribution in Selected Countries

<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Grapefruit%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2183&hidReportRetrievalTemplateID=8> (consultada junio, 2015).

- 
- 
109. U.S. Energy Information Administrator. 2017. [https://web.archive.org/web/20101007133609/http://www.eia.gov/cneaf/electricity/electricity/table5\\_6\\_a.html](https://web.archive.org/web/20101007133609/http://www.eia.gov/cneaf/electricity/electricity/table5_6_a.html) (consultada enero, 2018).
110. Valdés, P., Guerrero, B., Nieves, G. y De la Torre, V. 1994. Tratamiento de aguas residuales cítricas por vía anaerobia. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10 (2), 69-75.
111. Van Haandel, C. y Lettinga, G. 1994. *Anaerobic Sewage Treatment: A Practical Guide for Region with a Hot Climate.* John Wiley & Sons: New York.
112. Vavilin, V.A. y Angelidaki, I. 2005. Anaerobic degradation of solid material: importance of initiation centers for methanogenesis, mixing intensity, and 2D distributed model. *Biotechnology Bioengineering*, 89(1): 113-122.
113. Viot, M. 2008. Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination: Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *Journal of Chromatography A.*, 1196-1197, 147-152.
114. Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E. y Pérez-Álvarez, J.A. 2011. Physicochemical characterization of the orange juice waste water of a citrus by-product. *J Food Process Preserv.* 35:264–271.
115. Vuuren, S. y Viljoen, A. 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr J*, 22: 540–544.
116. Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J. y Jones, D.L. 2008. Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.*, vol. 99, 7928–7940.
- 
-

- 
- 
117. Wilkins, M., Suryawat, L., Maness, O. y Chrz, D. 2006. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *Microbiol. Biotechnol.* 23:8–1161.
118. Winkler, M.A. 1994. *Tratamiento Biológico de Aguas de Desecho*. Editorial Limusa. Tercera Edición. México, Pp 28-29, 315-322.
119. World Health Organization. 1998. Concise international chemical assessment document nº5, Limonene.
120. Yatim, P., Mamat, M., Mohamad-Zailani, S. y Ramlee, S. 2016. Energy policy shifts towards sustainable energy future for Malaysia. *Clean Technol Envir* 18:1685–1695.
121. Yenigün, O. y Demirel. 2013. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochem* 48:901–911.
122. Ying, Z., Yang, L., Miao, H. y Zhao, J. 2014. Acclimation of the trichloroethylene-degrading anaerobic granular sludge and the degradation characteristics in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Sci Technol.* (69), 120-127.
123. Zukerman, I. 1951. Effect of oxidized d-limonene on micro-organisms. *Nature*, 168: 517–517.

*ANEXO A*

*DETERMINACIONES  
ANALÍTICAS*

---

---

---

---

## DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### Demanda Química de Oxígeno (DQO) Método colorimétrico.

La demanda química de oxígeno es empleada como una medida del oxígeno equivalente de la materia orgánica contenida en una muestra que es susceptible a oxidación por un oxidante químico fuerte.

#### Material y Equipo

- Placa digestora
- Vortex
- Espectrofotómetro a una longitud de onda de 620nm
- Celdas para espectrofotómetro
- Tubos de ensaye con tapones de rosca y juntas de teflón
- Gradilla
- 1 piseta
- 1 matraz aforado de 1000mL
- 1 matraz aforado de 500mL
- 1 probeta
- 1 espátula
- 1 magneto
- 1 barra magnética
- 1 dispensador de 5mL
- 1 dispensador de 1mL

#### Reactivos

- Dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ )
- Sulfato mercuríco ( $HgSO_4$ )
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ )
- Sulfato de Plata ( $AgSO_4$ )
- Biftalato de potasio ( $HOOCC_6H_4COOK$ ) en cristales
- Agua destilada

#### Preparación de Soluciones

##### *I. Solución Digestora*

Estos reactivos deberán pesarse en material de plástico o de vidrio.

- Secar durante 1 hora a  $105^\circ C$  la cantidad necesaria de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), enfriar en desecador y pesar 21.128g
- Pesar 16.6g de sulfato mercuríco ( $HgSO_4$ )
- En el matraz aforado de 500mL, disolver el dicromato de potasio en 200mL de agua destilada.
- Añadir el sulfato mercuríco.
- Adicionar en baño de hielo y muy lentamente 83.5mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) puro. Cuando se haya enfriado la mezcla, disolver lentamente y después aforar a 500mL con agua destilada.

##### *II. Solución de Ácido Sulfúrico puro con sulfato de Plata.*

- Pesar 10.1103 g de sulfato de plata ( $AgSO_4$ ) y agregar en un matraz aforado de 1000mL



---

---

- Agregar 500mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y dejar en reposo un día para que se disuelva y después completar el volumen 1000mL.

### *III. Preparación de la Curva Patrón.*

1. Secar la cantidad necesaria de Biftalato de potasio durante una hora a 105° C.
2. Pesar 0.6375g de biftalato de potasio y disolverlo perfectamente en agua destilada.
3. Aforarlo en un matraz de 500ml.
4. Preparar 7 tubos conteniendo un volumen de 2.0mL, para ello, realizar las diluciones necesarias como se indica en la siguiente tabla:

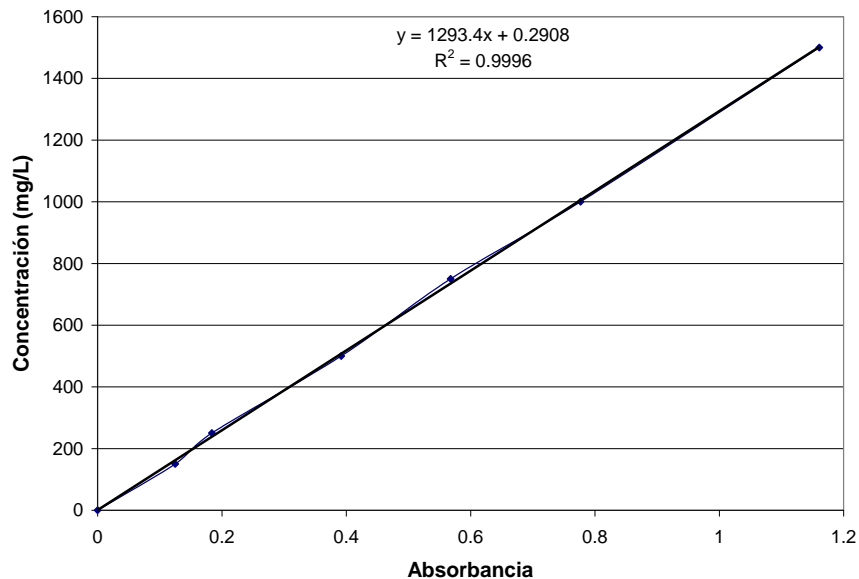
Tubos	Concentración Teórica mg DQO/L	Solución de Biftalato de potasio (mL)	Agua destilada (mL)
1	0	0.000	2.000
2	150	0.200	1.800
3	250	0.333	1.667
4	500	0.667	1.333
5	750	1.000	1.000
6	1000	1.333	0.667
7	1500	2.000	0.000

### *Metodología.*

1. Encender la placa digestora y dejarla calentando hasta alcanzar los 150° C.
2. En un tubo con tapa rosca agregar 2.0mL de la muestra a analizar en la dilución apropiada y 2.0mL de agua destilada para el blanco.
3. Añadir 1.0mL de la solución digestora.
4. Añadir lentamente 2.0mL de solución de ácido sulfúrico con sulfato de plata.
5. Tapar perfectamente y homogeneizarla mezcla mediante agitación suave.
6. Colocar los tubos en la placa digestora a 150° C durante 2 horas.
7. Transcurrido el tiempo retirarlos de la placa digestora y dejar enfriar.
8. Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 620nm.
9. Ya fríos los tubos, calibrar con el blanco preparado y leer las muestras.
10. Realizar una curva de calibración siguiendo el protocolo descrito en el punto III de ésta técnica con concentraciones de 0 a 1500mg/L
11. Lavar correctamente los tubos con agua y mantener los tubos y tapones limpios con una solución al 20% de ácido sulfúrico, enjuagar perfectamente con agua destilada y después secar para utilizarlos.

Nota: Se recomienda trabajar en el intervalo de 0 a 1500mg/L realizando una dilución si es necesario.

### *CURVA DE CALIBRACIÓN*



Mediante la manipulación de los datos a través de Excel, se graficó la curva de calibración mediante las lecturas de absorbancia contra la concentración teórica. A continuación con las lecturas obtenidas a través de una regresión lineal se obtiene un valor de correlación así como una fórmula para determinar la concentración de DQO en mg/L, como se muestra en el ejemplo:

$$y = 1293.4x + 0.2908$$

$$R^2 = 0.9996$$

En donde “x” es la lectura de la absorbancia y “y” la lectura de DQO en mg/L.

### **Determinación de Sólidos Suspendedos Totales y Volátiles (Método Gravimétrico).**

Los sólidos suspendidos totales son los sólidos constituidos por sólidos sedimentables, sólidos en suspensión y sólidos coloidales, cuyo tamaño de partícula no pasa el filtro estándar de fibra de vidrio.

Este método se basa en la filtración a vacío, con la ayuda de un papel de microfibras de vidrio. Se filtra una muestra con un filtro estándar de fibra de vidrio y el residuo retenido en el mismo se seca a un peso constante 103-105° C. El aumento de peso del filtro representa los sólidos totales en suspensión.

#### **Material y Equipo**

- Equipo de filtración con diámetro de 47mm.
- Matraz Kitazato de 1 a 2 litros de capacidad.
- Accesorios para filtración.
- Pinzas para crisol.

- 
- 
- Desecador con deshidratante adecuado.
  - Discos de microfibra de vidrio grado 934AH de 47mm de diámetro.
  - Probeta de 100mL de capacidad.
  - Pipeta serológica de 10mL de capacidad
  - Piseta.
  - Balanza analítica con sensibilidad de 0.1mg
  - Estufa eléctrica capaz de operar a 100-120° C
  - Mufla eléctrica capaz de operar a 550+- 50° C
  - Bomba de vacío

Metodología para Sólidos Suspendidos Totales.

*Preparación de papel filtro.*

- Humedecer el papel filtro agua destilada e introducirlo a la estufa por espacio de 1hora a 110° C
- Transcurrido este tiempo pasarlo a un desecador y dejar enfriar.
- Con ayuda de unas pinzas pesar el papel (P<sub>1</sub>)

*Preparación de la muestra.*

- Colocar el disco en el aparato de filtración, humedecer el disco con agua destilada y aplicar vacío.
- Medir con una probeta o pipeta volumétrica un volumen adecuado de cantidad seleccionada de la muestra previamente homogeneizada.
- Filtrar la muestra a través del disco y aún aplicando vacío, lavar el disco tres veces con 10mL de agua destilada, dejando que el agua drene totalmente en cada lavado.
- Suspende el vacío y colocar el papel filtro en una cápsula de porcelana y secar en la estufa a una temperatura de 103 a 105° C durante 12 horas.
- Transcurrido este tiempo, sacar la cápsula, dejar enfriar en desecador a una temperatura ambiente y determinar el peso del papel (P<sub>2</sub>).

FÓRMULAS DE CÁLCULO DE RESULTADOS.

El contenido de sólidos suspendidos totales, se calcula por la siguiente fórmula:

$$SSV = ((P_2 - P_1)/V) \times 10^6$$

En donde:

SST = Sólidos suspendidos totales en mg/L

P<sub>1</sub> = Peso del disco, en g

P<sub>2</sub> = Peso del disco con el residuo, en g

V = Volumen de la muestra, en mL

Metodología para Sólidos Suspendidos Volátiles.

- 
- 
- Para conocer el contenido de sólidos suspendidos volátiles, se procede de la manera siguiente:
- La cápsula conteniendo el disco con el residuo se introduce a la mufla a una temperatura de 550+- 25° C durante 20min.
  - Sacar la cápsula, dejar enfriar en un desecador a temperatura ambiente y determinar su peso (P<sub>3</sub>).

#### FÓRMULAS DE CÁLCULO DE RESULTADOS.

La cantidad de sólidos suspendidos volátiles, se calcula con la siguiente fórmula:

$$SSV = ((P_2 - P_3)/V) \times 10^6$$

En donde:

SV = Sólidos suspendidos volátiles en mg/L

P<sub>2</sub> = Peso de la cápsula con el residuo, en g

P<sub>3</sub> = Peso de la cápsula con el residuo después de la calcinación, en g

V = Volumen inicial de la muestra, en mL

NOTA: En caso de no contar con el papel filtro Wattman que se requiere en esta técnica, se puede realizar centrifugando a la mayor velocidad posible del equipo (aprox. 12000rpm) durante 30 minutos. Realizado lo anterior se procede a eliminar el líquido sobrenadante del tubo con mucho cuidado y evitando mover el fondo. Todo esto se realiza con la ayuda de agua destilada en pequeños volúmenes y enjuagando al menos dos veces el tubo para verter todo el fondo del tubo a un crisol a peso constante o a una cápsula de porcelana y se procede de la misma manera, con los tiempos que marca la técnica.

2 **APROVECHAMIENTO DE EFLUENTES CÍTRICOS PARA LA PRODUCCIÓN**  
3 **DE BIOGÁS: SITUACIÓN ACTUAL Y OPORTUNIDADES EN MÉXICO Y**  
4 **ESTADO DE VERACRUZ**

5 **USE OF CITRUS EFFLUENT FOR BIOGAS PRODUCTION: CURRENT**  
6 **SITUATION AND OPPORTUNITIES IN MÉXICO AND VERACRUZ STATE**

7 E.S. Rosas-Mendoza<sup>1</sup>, J.M. Méndez-Contreras<sup>1</sup>, S.A. Martínez-Delgadillo<sup>2</sup>, N.A. Vallejo-  
8 Cantú<sup>1</sup> y A. Alvarado-Lassman<sup>1\*</sup>

9 <sup>1</sup>*División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Orizaba, Av.*  
10 *Oriente 9, 852. Col. Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, México.*

11 <sup>2</sup>*Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco,*  
12 *Av. San Pablo 180, Col. Reynosa Tamaulipas, C.P. 02200 México, D.F., México.*

13 Fecha de envío: día, agosto, 2016

14 **Resumen:**

---

15 El consumo de jugos procesados de cítricos en México ha tenido un considerable  
16 incremento ya que en 2008 se produjeron 60 mil T de jugo de naranja, mientras que en  
17 2013 se alcanzó una producción de 80 mil T. Esta demanda de jugos se ve reflejada en el  
18 incremento de la producción de cítricos, especialmente en la naranja, ya que en 2008 y  
19 2013 se procesaron 3,930,000.00 T y 4,428,000.00 T respectivamente. El Estado de  
20 Veracruz es el líder nacional en producción de cítricos con alrededor de 47% de la  
21 producción nacional destacando la naranja con 1,996,000 T promedio por año. La industria  
22 procesadora de cítricos en el Estado de Veracruz desecha anualmente de 0.79 a 1.25 m<sup>3</sup> de  
23 agua residual por cada tonelada de naranja procesada, por lo que Veracruz se podría  
24 convertir en el estado líder en la generación de biogás aportando 2.61 GWh/año si se  
25 aprovechan las aguas residuales en la producción de biogás por medio de digestión  
26 anaerobia. El presente trabajo tiene como objetivo realizar un estudio de la situación actual  
27 de la producción y procesamiento de cítricos en México y el Estado de Veracruz, así como  
28 la evaluación de los efluentes generados y su posible aprovechamiento mediante digestión  
29 anaerobia para la obtención de metano como fuente renovable de energía.

30 *Palabras clave:* Digestión anaerobia, industria citrícola, efluentes cítricos, biogás.

31 

---

32 **Abstract:**

33 In México, the consumption of processed citrus juices has grown significantly in recent years.  
34 Considering solely the case of orange juice, a 25% increase in production has been observed in a  
35 relatively short time period (2008-2013), rising to 80,000 T by 2013. This increase in citrus fruit  
36 production has positioned México as the third biggest producer in the world, with 4,428,000 T  
37 produced in 2013. The state of Veracruz is the national leader in citrus production in México,  
38 responsible for about 47% of national production, producing an annual average of

---

\* Autor para la correspondencia. E-mail: lassman@prodigy.net.mx  
Tel. 01-272-72-5-70-56, Fax 72-5-70-56

39 1,996,000 T of oranges. Annually, the citrus processing industry in the state of Veracruz  
40 discharges around 0.79 to 1.25 m<sup>3</sup> of wastewater per ton of processed orange. Given that  
41 this wastewater is not currently treated, Veracruz could become the leading Mexican state  
42 in the generation of biogas, where it could produce up to 2.61 GWh/year of biogas through  
43 the treatment of this wastewater with anaerobic digestion. The aim of the paper is to present  
44 the current situation with regard to the production and processing of citrus fruits in México  
45 and in the state of Veracruz, as well as an assessment of effluents and their possible use for  
46 obtaining methane for use as a renewable energy source via anaerobic digestion.  
47

48 *Keywords:* Anaerobic digestion, citrus industry, citrus effluents, biogas.

---

49

## 50 **1. Introduction**

### 51 *1.1 Consumption of citrus products in México*

52 The volume of processed citrus juices worldwide is between 2,000,000 and 2,500,000 T per  
53 year, fueled mostly by Brazil, United States and México in order of importance, with  
54 México registering a production of 60,000 T of orange juice, which, in 2008, was mostly  
55 exported to the United States.  
56

57 Juice demand in both the United States and México is linked directly to the income level of  
58 consumers, where consumption of the product increases in line with income. In the case of  
59 México, lower social classes have been identified as consuming the product freshly  
60 squeezed in their homes, while it is consumed by the middle classes in their homes, or  
61 purchased from restaurants or streetstalls, and the upper classes are able to purchase it in  
62 already processed form to be consumed in their homes. These consumption levels  
63 correspond to 59.13, 39.16 and 1.71% of the population, respectively (INEGI, 2015). It is  
64 important to mention that lifestyle changes show people tending to spend less time  
65 preparing their food, resulting in increased demand for processed juices. Under this  
66 scenario, México would have to increase its current juice exports by about 100% over the  
67 next 10 years and increase its processing capacity at a rate of 1 30,000 lb (13,607.77 kg) per  
68 evaporation capacity juicer every two years. This would clearly require significant  
69 technological development aimed at improving productivity, increased availability of the  
70 raw material to be processed, and alternatives for the disposal of the solid waste and  
71 effluents generated during the processing of citrus products.  
72

#### 73 *1.1.1 Production of citrus in México*

74

75 Citrus fruit is a basic agricultural product in México and an important part of the diet of its  
76 population. It is estimated that more than 90,000 Mexican families depend on citrus fruit  
77 farming, occupying 571,959.77 planted hectares across the country, of which 90.52% is  
78 harvested, generating 7,897,980.75 T of oranges, lemons, pineapples, grapefruits and  
79 tangerines. This sector generates a value of production of \$1,023,123,687 USD, according  
80 to the 2013 statistics from the Secretariat of Agriculture, Livestock, Rural Development,

81 Fisheries and Food, México (SIAP, 2015). Fig. 1 shows the geographical distribution of  
82 citrus fruit production in México, as well as presenting the leading states in order in terms  
83 of production.

84  
85 Fig. 1. The main citrus producing states in México.

86  
87 Orange is the most harvested citrus fruit, accounting for an average 54.66% of the total  
88 production between 2009 and 2013, corresponding to 4,080,310.21 T, and followed, in  
89 order of percentage of production, by lemon, pineapple, grapefruit and tangerine. As seen  
90 in Fig. 2., México produced an average of 7,460,412.69 T over the last 5 years, with the  
91 highest production of 7,897,980.75 T occurring in 2013, as shown in Table 1.

92  
93 Fig. 2. % of citrus production in México from 2009 to 2013.

94  
95 Table 1. Citrus production in México from 2009 to 2013. (SIAP, 2015)

### 96 97 *1.1.2 Citrus production in Veracruz*

98  
99 The state of Veracruz is the main citrus producer in México, generating 3,700,724.73 T in  
100 2013, which is the highest level of production in the past five years and corresponds to a  
101 value close to 47% of total national production, followed by the states of Tamaulipas,  
102 Michoacán, San Luis Potosí and Nuevo León. Fig. 3 details citrus production between 2009  
103 and 2012 in the state of Veracruz.

104  
105 From 2009 to 2013, Veracruz produced, on average: 2,020,593.78 T orange; 540,184.91 T  
106 lemon; 533,729.90 T pineapple; 249,252.70 T grapefruit; and, 166,574.57 T tangerine. Fig.  
107 4 shows the comparative production of Veracruz in percentage terms.

108  
109 Fig. 3. Production of citrus in Veracruz from 2009 to 2013.  
110 (SIAP, 2015)

111  
112 Fig. 4. % of citrus production in Veracruz from 2009 to 2013 compared to domestic  
113 production.

### 114 115 *1.2 National supply and distribution of citrus products*

116 The highest levels of orange and grapefruit production, 4,428,000.00 T and 427,000.00 T  
117 respectively, were achieved in 2013, while the highest level of lemon production,  
118 2,135,000.00 T, was achieved in 2011, as can be seen in Fig. 5.

119  
120 Fig. 5. Production of citrus products in México from 2010 to 2013.  
121 (USDA. FASa, 2015; USDA. FASb, 2015; USDA. FASc, 2015; USDA. FASd, 2015)

122  
123 Citrus supply is destined for three uses: export, processing (industrialization) and fresh  
124 consumption. The lemon is citrus fruit most exported by México, averaging 24.85%,  
125 followed by grapefruit at 4.34% and orange at 0.57%. An average of 25.20% of oranges  
126 were processed, followed by grapefruit and lemon, with 21.43% and 15.56% respectively.

127 Most of the citrus supply is earmarked for fresh consumption in households, as shown in  
128 Fig. 6, comprising 74.24, 74.23 and 59.59% of total grapefruit, orange and lemon  
129 production, respectively.

130

131 Fig. 6. Distribution of citrus in México from 2010 to 2013 in terms of export, processing  
132 and consumption.

133 (USDA. FASa, 2015; USDA. FASb, 2015; USDA. FASc, 2015; USDA. FASd, 2015)

134

### 135 *1.3 Citrus processing*

136 The citrus processing industry is a recent development in México, with the first juice  
137 concentrate (orange) processing plant established in Montemorelos, Nuevo León in 1972.  
138 In 1980, there were 9 processing plants in the country, while there were 22 by 1991  
139 (Gómez y Schwentesius, 1997). There are various plants in the eastern part of México (Gulf  
140 of México) that process the concentrated juice of some varieties of orange, Persian lime,  
141 Italian lemon, tangerine and grapefruit in the states of Tamaulipas, Nuevo León, San Luis  
142 Potosí, Veracruz, Tabasco and Yucatán. The processing plants are Citrex, Citrus Tabasco,  
143 Citrofrut, Citromax, Juguera Allende S.A. de C.V., Procimart, Procitrus, IQC, Citrotam and  
144 Unión de Ejidos (SAGARPA, 2015).

145

146 Veracruz is the leading citrus processing state, with a milling capacity of 800,000 T/year  
147 spread across seven processing plants, followed by Tamaulipas and Nuevo León with 2  
148 plants each, and San Luis Potosí, Tabasco and Yucatán with one plant each, as can be seen  
149 in Table 2.

150

151 Table 2. Citrus grinding capacity, México 2009. (SAGARPA, 2015)

152

153 In 2009, the production of citrus fruit for processing was less than the milling capacity of  
154 the processing plants, with two reasons for this underuse of citrus processing plants  
155 attributed as being: 1) That there was no integration between the production of the raw  
156 material and the transformation process; and, 2) That the development of México's citrus  
157 industry has been largely improvised (Gómez and Schwentesius, 1997).

158

#### 159 *1.3.1 The orange – México's main citrus product and its processing*

160

161 The recent development of orange processing in México has been notable, with a  
162 processing capacity in the eastern region of 855,000 T/year in 2009. The years 2000 to  
163 2008 saw an average of 12% (485,120 T/year) of the orange supply occupied by the  
164 processing industry, 87% used for consumption, and 1% exported (SAGARPA, 2015), a  
165 clear underutilization of the industry's processing power could be identified.

166

167 From 2010 to 2013, the picture changed, with an average of 25.20% (1,027,215 T/year) of  
168 the orange supply occupied by the processing industry, 74.23% used for consumption, and  
169 0.57% exported (USDA. FASa, 2015; USDA. FASb, 2015), as seen in Fig.7. The 2009  
170 processing capacity figures reveal overuse, where the citrus industry's capacity has been  
171 superseded, pointing to the need to increase orange processing capacity once more.

172



173 Fig. 7. % of oranges used for processing from 2000 to 2013.  
174 (USDA. FASa, 2015; USDA. FASb, 2015; SAGARPA, 2015)

175  
176 The increasing industrialization, described above, meant that, in 2013, 34.10% (1,510,000  
177 T/year) of total orange production was processed, representing a 11.67% increase on the  
178 previous year. Given the increasingly high demand on the industrial sector for processed  
179 orange, fresh orange consumption appeared to decrease, to 65.20%, compared to 2012,  
180 while exports remained at largely the same level, at 0.7% (USDA. FASa, 2015; USDA.  
181 FASb, 2015). It is now known that a single plant in the northern part of Veracruz has the  
182 capacity to process 229,400 T of oranges per year, representing 15.2% of the annual  
183 amount spent on the processing of this product.

184  
185 Fig. 8. Process diagram for orange.  
186 (SAGARPA, 2015; Juguera Allende, 2015; IQCitrus, 2015; Citrofruta, 2015; Citrofrutb,  
187 2015)

188  
189 Various products are obtained from orange, such as fresh juice, juice concentrate, oils,  
190 flavorings and peel, as shown in the process flow diagram above (Fig. 8). During juice  
191 extraction, about 50 to 60% becomes a solid residue composed of peel, seeds and  
192 membrane (Secretaría de Economía, 2002; Wilkins *et al.*, 2006), while 40 to 50% is  
193 concentrated juice (Rezzadori *et al.*, 2012). From one ton of orange, the following is  
194 obtained: 75.70 L of concentrated juice at 65 °Brix; 1.95 kg of essential oil; and, 100 kg of  
195 waste, which can be used as cattle feed (SARH and BANCOMEXT, 1993).

196  
197 Due to the demand for this product and nature of the process, orange processing generates  
198 large amounts of wastewater and solid waste – approximately 8,000,000 to 20,000,000  
199 T/year worldwide (Rezzadori *et al.*, 2012). The food industry in México discharges  
200 93,000,000 m<sup>3</sup> of wastewater per year (SEMARNAT, 2015), to which the citrus industry  
201 contributes 1.3%, which corresponds to 1,200,000 m<sup>3</sup>/year, a volume which represents the  
202 water use needs of 3,300,000 people per day.

#### 203 204 *1.4 Anaerobic digestion in the citrus industry*

205 The huge variations in the flow of citrus effluent, which is characterized by low pH,  
206 nutrient imbalance and high organic loads, have meant that, to date, no adequate solution to  
207 the problem has been found. Most of this waste is dumped into the soil and water, which  
208 can cause physical and chemical changes to ecosystems, problems with odor, pH changes  
209 and groundwater contamination, which impact negatively on the environment. This  
210 situation also negatively affects company finances through the payment of fines due to non-  
211 compliance with environmental regulations.

212  
213 Given the above described conditions, anaerobic digestion is a viable and attractive  
214 alternative for the treatment of this effluent (Kaparaju and Rintala, 2006). It can be used to  
215 eliminate or reduce pollution by agro-industrial effluents containing high levels of  
216 biodegradable organic matter (Chen *et al.*, 2008), and offers an attractive option for the use  
217 of certain categories of biomass to meet the partial energy needs (Mata, 2003; Balat and  
218 Balat, 2009) of a processing plant. Compared to aerobic treatment, it produces low amounts

219 of sludge and requires less energy (Van Haandel and Lettinga, 1994; Aiyuk *et al.*, 2006;  
220 Gomec, 2010). This process offers the possibility of recycling nutrients, reducing  
221 greenhouse gas emissions and odor, and controlling the disposal of waste (Angelidaki *et*  
222 *al.*, 2011), as well as offering positive economic and ecological impacts compared with  
223 other processes (Baldasano and Soriano, 2000; Edelman *et al.*, 2000).

224

225 Anaerobic digestion may be defined as the biological conversion of organic matter  
226 (carbohydrates, lipids and proteins) into a variety of end products, such as biogas consisting  
227 of methane (50-70%), carbon dioxide (20-25%), nitrogen (0-10%), hydrogen (0-1%),  
228 hydrogen sulfide (0-8%) and oxygen (0-2%) (Olthof and Oleszkiewick, 1982; Gujer and  
229 Zehnder, 1983; Speece, 1983; Nutiu, 2014). The organic material must pass through three  
230 stages – hydrolysis, acetogenesis and methanogenesis – in order to produce biogas  
231 (Gerardi, 2003). In general, anaerobic digestion has a dual purpose, the treatment of  
232 wastewater and the production of bioenergy.

233

234 While, theoretically, the methane yield is 0.35 LCH<sub>4</sub>/gCOD<sub>rem</sub> (Jenett and Dennis, 1975),  
235 this depends on the type of reactor operating conditions and substrate used. Some  
236 performance values for the use of methane as a substrate wastewater generated from the  
237 processing of orange and its treatment in conventional reactors are reported in the literature,  
238 where it is compared to the use of high load reactors with different substrates, as shown in  
239 Table 3:

240

241 Table 3. Methane yield and efficiencies using different operating conditions in anaerobic  
242 reactors.

243

244 Methane yields of from 0.3 to 0.34 LCH<sub>4</sub>/gCOD<sub>rem</sub> were obtained using a non-citric  
245 substrate fed into high load reactors, while conventional reactors obtained lower methane  
246 yields using citrus wastewater as a substrate, operating under different conditions from the  
247 high load reactors.

248

### 249 *1.5 Biogas as an alternative energy source*

250 The development and implementation of renewable energy systems as part of the global  
251 solution to increased energy consumption has been considered as an emerging area for the  
252 exploration of alternatives to traditional energy systems that are based on limited fossil fuel  
253 resources and cause problems such as environmental change (Balaman and Selim, 2014).  
254 While the production of biofuels, such as biodiesel (Chen, 2015) and bioethanol (Hamelin  
255 *et al.*, 2014) from organic waste presents a viable alternative, much of this waste could also  
256 be treated with anaerobic digestion in order to achieve the double effect of biogas  
257 production and wastewater treatment.

258

259 Biogas is a type of renewable energy with great potential for various applications, such as  
260 heating, combined heat and electricity, the improvement of transport fuel quality, or the  
261 replacement of natural gas for various uses. Although, in developing countries, biogas is  
262 mainly obtained from digesters at a household level, the end use of biogas is mainly  
263 confined to the kitchen and for lighting (Surendra *et al.*, 2014).

264

265 Pure methane has a calorific value of 1,000 Btu/ft<sup>3</sup> (10.34 kWh/m<sup>3</sup>), while the calorific  
266 value of biogas is approximately 500-600 Btu/ft<sup>3</sup> (5.17 - 6.20 kWh/m<sup>3</sup>), which is much  
267 lower than that of methane due to the dilution of methane with other products obtained  
268 from anaerobic digestion.

269

270 This study has explored various options for obtaining biogas rich in methane from the  
271 anaerobic digestion of various wastes, such as whey with cow dung (Rico *et al.*, 2015) and  
272 apple waste with pig manure (Kafle and Kim, 2013). This research revealed a significant  
273 increase in methane concentration. Given the importance of obtaining this bioenergy, this  
274 study sought to maximize its production by coupling anaerobic digester devices, thereby  
275 increasing the methane content by/to 71.6, 90 and 94% (Luo *et al.*, 2014).

276

## 277 **2. Methodology**

### 278 *2.1 Estimated power generation through the anaerobic digestion of citrus* 279 *effluent*

#### 280 *2.1.1 Case Study*

281

282 A typical citrus processing plant has the capacity to process 229,400 T/year of oranges,  
283 which amounts to approximately 1,850 T/day, as it is a seasonal product, thus generating  
284 26.8 L/s (2,315.5 m<sup>3</sup>/d) of wastewater from pressure washing, filters, centrifugal extractors,  
285 evaporators, tanks, chutes, mills, dryers, pelletizers, washing equipment and spills. This  
286 process can be seen in Fig. 8, which indicates points of sewage discharge with dashed  
287 blocks. Together, they comprise the overall effluent to be purified in the wastewater  
288 treatment plant. Additional data reveals that between 0.79 and 1.25 m<sup>3</sup> of wastewater is  
289 generated for every ton of orange processed. The foregoing is a conservative estimate, with  
290 some reports ranging from volumes of 1.58 m<sup>3</sup> (Koppar and Pullamimanappallil, 2013) up to 3  
291 m<sup>3</sup> of wastewater per ton of processed fruit (Antonio-Quaia, 2011), depending on the type  
292 of processor.

293

294 As processing plant production levels depend on market demand for products, wastewater  
295 generation is proportional to output, giving three potential flow levels: normal flow (12.8  
296 L/s = 1,105.92 m<sup>3</sup>/d); mean flow (26.8 L/s = 2,315.52 m<sup>3</sup>/d); and, peak flow (40 L/s =  
297 3,456.00 m<sup>3</sup>/d). The effluent produced can be treated continuously via anaerobic digestion  
298 to obtain methane-rich biogas, with a hydraulic residence time of less than 1 day and using  
299 a high load anaerobic biofilm reactor.

300

## 301 **3. Results**

302 Below, the affluent is characterized according to the laboratory data:

303

304 Table 4. Characterization of citric affluent.  
305 (APHA, 1995)

306

307 High TS content causes operational disruptions and deficiencies in biofilm systems.  
308 Therefore, it is necessary to implement TS removal at an earlier stage, while regulating

309 such control parameters as temperature, pH, alkalinity, nutrients and ORL (Gerardi, 2003)  
310 to ensure the removal of high levels of polluting matter and thus generate large amounts of  
311 biogas.

312

313 Eq. (1) can be used to estimate the volume of methane generated by the anaerobic digestion  
314 of citrus effluent and as a basis for calculating the COD input presented in Table 4, which  
315 details a COD removal efficiency of 80%. High load reactors can be used to treat effluent,  
316 obtaining high efficiency levels and a performance of 0.2 LCH<sub>4</sub>/gCOD<sub>rem</sub>. It should be  
317 noted that the research cited in Table 3 obtained higher values due to the operating mode  
318 and the use of a hydraulic retention time that was greater than 1 day.

319

320 Methane generated by AD =

$$321 (Feed\ flow)(COD_{input})(COD\ removal\ efficiency)(0.9)(Y_{methane})(8.64^{-4}) \quad Eq. (1)$$

322

323 Where feed flow is L/s, COD<sub>input</sub> is mg/L, COD removal efficiency is %, 0.9 represents the  
324 theoretical fraction of COD removed for the conversion to methane, Y<sub>methane</sub> in  
325 LCH<sub>4</sub>/gCOD<sub>removed</sub>, 8.64<sup>-4</sup> is a conversion factor, and the methane generated by AD is given  
326 in m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/d.

327

328 The three possible flows can obtain 6,175.81, 12,930.60 and 19,299.41 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/d  
329 respectively, from which 63,857.89, 133,702.45 and 199,555.90 kWh/d respectively can be  
330 produced. This calculation is performed using Eq. (2).

331

332 *Energy produced* =

$$333 (Methane\ generated\ by\ AD)(Calorific\ value\ of\ methane) \quad Eq. (2)$$

334

335 Where Methane generated by AD is m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/d, the calorific value of methane is 10.34  
336 kWh/m<sup>3</sup>, and the energy produced is kWh/d.

337

338 The citrus industry consumes large volumes of natural gas and fuel oil to meet the energy  
339 needs of citrus processing, as well as directly consuming power supplied by the power  
340 company. The cost per kWh of energy generated using the three energy sources in México  
341 is 0.0149 USD/kWh for natural gas (CRE, 2015), 0.0298 USD/kWh for fuel oil (PEMEX,  
342 2015), and 0.0585 USD/kWh for electricity (CFE, 2015).

343

$$344 Cost = (Energy\ produced)(Energy\ cost) \quad Eq. (3)$$

345

346 Where energy produced is kWh/d, energy cost is USD/kWh, and cost is USD/d.

347

348 A comparative analysis was undertaken of the energy that can be obtained from the use of  
349 anaerobic digestion at different flows against the cost of energy generated by the  
350 consumption of natural gas, fuel oil and electricity. It was observed that, for a flow of  
351 nearly 63,000 kWh/d, normal expenditure on natural gas would be 995.70 USD/d, followed  
352 by 1,908.93 USD/d for fuel oil and 3,739.94 USD/d for electricity. Fig. 9 shows the trend  
353 for obtaining energy from anaerobic digestion and the respective costs for regular, medium  
354 and high flows.

355

356 While this analysis was undertaken based on 100% energy levels, real systems using these  
357 energy sources achieve conversion efficiency levels of approximately 35% (McCabe,  
358 2014), from which 22,350.26, 46,795.86 and 69,844.57 kWh/d net energy is obtained for  
359 use.

360 Fig. 9. Cost of energy generated using natural gas, fuel oil and electricity.

361

362 The processing plant featured in this study requires 67,200 kWh/d (8,332,800 kWh/year) of  
363 electricity in order to operate, as well as 265,268.88 kWh/d (32,893,341.12 kWh/year) of  
364 fossil fuels, such as fuel oil. The total consumption is 332,468.88 kWh/d (41,226,141.12  
365 kWh/year), which implies an annual cost of 487,468.80 USD for electricity and 980,221.57  
366 USD for fuel oil, which, taken together, represent a cost of close to half a million dollars.

367

368 Anaerobic digestion used with three streams of operation generates 7,918,378.36;  
369 16,579,103.80 and 24,744,931.60 kWh/year of energy respectively, and is thus able to  
370 replace the use of fuel oil by 24.07, 50.40 and 75.23%. Taking advantage of renewable  
371 energy, such as the biogas produced in this study, would represent significant savings for  
372 the processing plant, compared to using a non-renewable source of energy, with annual  
373 savings of 235,939.33, 494,031.67 and 737,420.69 USD, depending on the flow of  
374 wastewater fed into the anaerobic system.

375

## 376 **4. Conclusions**

### 377 *4.1 Energy Outreach to México*

378

379 In 2012, of the total energy generated in México from different sources, just 0.02% was  
380 biogas, which is the equivalent to 1.82 Petajoules (505.55 GWh) (SENER, 2015). From  
381 2010 to 2013, an average of 1,027,215 T of oranges were processed in México, generating  
382 approximately 1,047,759.3 m<sup>3</sup> of wastewater. If this effluent could be treated using  
383 anaerobic digestion, around 5.85 GWh/year of energy would be generated, considering that  
384 the treatment of 1 m<sup>3</sup> of this effluent produces 5.58 kWh. This would comprise 1.15% of  
385 the annual energy produced from biogas in the country. Therefore, Veracruz, the leading  
386 citrus producing state, could become the leading state in biogas production, generating 2.61  
387 GWh/year. These values may even increase substantially due to the significant predicted  
388 increase in demand for citrus products in the coming years.

389 The fact that the wastewater produced from the processing of different citrus types (orange,  
390 lemon, pineapple, grapefruit and tangerine) has similar characteristics might suggest that,  
391 with the use of anaerobic digestion on wastewater from all types of citrus processing,  
392 México could become a leader in the generation and use of biogas as a renewable energy  
393 source.

394

395

396

397

398

399

400

401 **Nomenclatura**

402

Calorific value of methane	10.34 kWh m <sup>-3</sup>
COD <sub>input</sub>	Chemical Oxygen Demand input, mg L <sup>-1</sup>
COD removal efficiency	%
Cost	USD d <sup>-1</sup>
Energy cost	USD kWh <sup>-1</sup>
Energy produced	kWh d <sup>-1</sup>
Feed flow	L s <sup>-1</sup>
Methane generated	m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup>
Y <sub>methane</sub>	LCH <sub>4</sub> gCOD <sub>removed</sub> <sup>-1</sup>

403

404 **References:**

405

406 Aiyuk, S., Forrez, I., Lieven, K., Van Haandel, A. and Verstraete W. (2006). Anaerobic and  
407 complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates – A  
408 review. *Biores. Technol*, 97, 2225.

409 Alvarado-Lassman, A., Rustrian, E., García-Alvarado, M., Rodríguez-Jiménez, G. and  
410 Houbron, E. (2008). Brewery wastewater treatment using anaerobic inverse fluidized  
411 bed reactors. *Bioresource Technol*, (9).3009–3015.

412 Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D., Plugge, C. and Stams J. (2011).  
413 Biomethanation and Its Potential. *Methods Enzymol*, 494: 327-51.

414 Antonio-Quaia, E. (2011). Reducción de la carga orgánica de las aguas de lavado de  
415 cáscara del limón por fermentación con levaduras y obtención de alcohol etílico.  
416 Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Tecnológica Nacional,  
417 Facultad Regional Tucumán, Argentina.

418 APHA. (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 19th ed.  
419 (American Public Health Association, American Water Works Association, Water  
420 Pollution Control Federation). Washington D.C.

421 Balaman, Ş. and Selim, H. (2014). A network design model for biomass to energy supply  
422 chains with anaerobic digestion systems. *Appl Energ*, (130) 289–304.

423 Balat, M. and Balat, H. (2009). Biogas as a renewable energy source – A review. *Energ*  
424 *source*, 31(14): 1280–1293.

425 Baldasano, J. and Soriano, C. (2000). Emission of greenhouse gases from anaerobic  
426 digestion processes: comparison with other municipal solid waste treatments. *Water*  
427 *Sci Technol*, 41 (3), 275-282.

428 CFE (Comisión Federal de Electricidad). (2015). Tarifas generales en media tensión.  
429 Disponible en:  
430 [http://app.cfe.gob.mx/Aplicaciones/CCFE/Tarifas/Tarifas/Tarifas\\_industria.asp?Tarifa](http://app.cfe.gob.mx/Aplicaciones/CCFE/Tarifas/Tarifas/Tarifas_industria.asp?Tarifa=CMAMT&Anio=2015)  
431 [a=CMAMT&Anio=2015](http://app.cfe.gob.mx/Aplicaciones/CCFE/Tarifas/Tarifas/Tarifas_industria.asp?Tarifa=CMAMT&Anio=2015). Accesado: 26 mayo 2015.

432 Chen, G., Zhao, L. and Qi, Y. (2015). Enhancing the productivity of microalgae cultivated  
433 in wastewater toward biofuel production: A critical review. *Appl Energ*, (137) 282–  
434 291.

435 Chen, Y., Cheng, J. and Creamer, S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a  
436 review. *Bioresource Technol*, 99:4044–4064.

437 Citrofruta. (2015). Productos cítricos. Disponible en:  
438 <http://www.citrofrut.com.mx/producto1.html>. Accesado: 16 febrero 2015.

- 439 Citrofrut. (2015). Colaterales. Disponible en:  
440 <http://www.citrofrut.com.mx/producto2.html>. Accesado: 16 febrero 2015.
- 441 CRE (Comisión Reguladora de Energía). (2015). Gas natural. Disponible en:  
442 <http://www.cre.gob.mx/articulo.aspx?id=169>. Accesado: 26 mayo 2015.
- 443 Edelman, W., Engeli, H. and Gradenecker, M. (2000). Co-digestion of organic solid waste  
444 and sludge from sewage treatment. *Water Sci Technol*, 41, 213-221.
- 445 Gerardi, M. (2003). *The microbiology of anaerobic digesters*. John Wiley &, pp. 51.
- 446 Gomec, Y. (2010). High-rate anaerobic treatment of domestic wastewater at ambient  
447 operating temperatures: A review on benefits and drawbacks. *J. Environment. Sci.*  
448 *Health, Part A*. 45, 1169-1184.
- 449 Gómez, M. A. and Schwentesius R. (1997). *La agroindustria de naranja en México*. 1st ed.  
450 CIESTAAM, México.
- 451 Gujer, W. and Zehnder, A. (1983). Conversion process in anaerobic digestion, *Water Sci,*  
452 *Technol*, 15:123–167.
- 453 Hamelin, L., Naroznova, I. and Wenzel, H. (2014). Environmental consequences of  
454 different carbon alternatives for increased manure-based biogas. *Appl Energ*, (114)  
455 774–782.
- 456 INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2015). Cuantificando la clase  
457 media en México: un ejercicio exploratorio. México. Disponible en:  
458 [http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/investigacion/Experimentales/Clase\\_media](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/investigacion/Experimentales/Clase_media/doc/clase_media_resumen.pdf)  
459 [/doc/clase\\_media\\_resumen.pdf](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/investigacion/Experimentales/Clase_media/doc/clase_media_resumen.pdf). Accesado: 3 febrero 2015.
- 460 IQCitrus (Internacional Química de Cobre, división Cítricos). (2015). Proceso de  
461 extracción. Disponible en:  
462 [http://www.iqcitrus.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=72&Item](http://www.iqcitrus.com/index.php?option=com_content&view=article&id=72&Itemid=82/)  
463 [id=82/](http://www.iqcitrus.com/index.php?option=com_content&view=article&id=72&Itemid=82/). Accesado: 16 febrero 2015.
- 464 Jennett, J. and Dennis, N. (1975). Anaerobic filter treatment of pharmaceutical waste. *J Wat*  
465 *Pollut Cont Fed*, 45:104-21.
- 466 Juguera Allende. (2015). Procesos. Disponible en: <http://www.jugueraallende.com/>.  
467 Accesado: 16 febrero 2015.
- 468 Kafle, G. and Kim, S. (2013). Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for  
469 biogas production: Batch and continuous operation. *Appl Energ*, (103) 61–72.
- 470 Kaparaju, N. and Rintala, A. (2006). Thermophilic anaerobic digestion of industrial orange  
471 waste. *Environ Technol*, 27:623-33.
- 472 Koppar, A. and Pullammanappallil, P. (2013). Anaerobic digestion of peel waste and  
473 wastewater for onsite energy generation in a citrus processing facility. *Energy*, (60)  
474 62-68.
- 475 Luo, G., Wang, W. and Angelidaki, I. (2014). A new degassing membrane coupled up flow  
476 anaerobic sludge blanket (UASB) reactor to achieve in-situ biogas upgrading and  
477 recovery of dissolved CH<sub>4</sub> from the anaerobic effluent. *Appl Energ*, (132) 536–542.
- 478 Martín, M., Siles, J., Chica, A. and Martín, A. (2010). Modelling the anaerobic digestion of  
479 wastewater derived from the pressing of orange peel produced in orange juice  
480 manufacturing. *Bioresource Technol*, 101, 3909–3916.
- 481 Mata, J. (2003). *Biomethanisation of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. IWA  
482 Publishing, London.
- 483 McCabe, B., Hamawand, I., Harris, P., Baillie, C. and Yusaf, T. (2014). A case study for  
484 biogas generation from covered anaerobic ponds treating abattoir wastewater:

485 Investigation of pond performance and potential biogas production. *Appl Energ*,  
486 (114) 798–808.

487 Nutiu, E. (2014). Anaerobic purification installation with production of biogas and liquid  
488 fertilizers, *Procedia Technology*, 12:632-636

489 Olthof, M. and Oleszkiewick, J. (1982). Anaerobic treatment of industrial wastewater,  
490 *Chem. Eng*, 15:1321–1326.

491 PEMEX (Petróleos Mexicanos). (2015). Indicadores petroleros. Disponible en:  
492 [http://ri.pemex.com/files/dcpe/petro/epublico\\_esp.pdf](http://ri.pemex.com/files/dcpe/petro/epublico_esp.pdf). Accesado: 26 mayo 2015.

493 Rezzadori, K., Benedetti, S. and Amante, E. (2012). Proposals for the residues recovery:  
494 Orange waste as raw material for new products. *Food Bioprod Process*, 90:106.

495 Rico, C., Muñoz, N., Fernández, J. and Rico, J. (2015). High-load anaerobic co-digestion of  
496 cheese whey and liquid fraction of dairy manure in a one-stage UASB process: Limits  
497 in co-substrates ratio and organic loading rate. *Chem Eng J*, (262) 794–802.

498 SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y  
499 Alimentación). (2015). Estudio de Mercado para identificación de necesidades de  
500 infraestructura logística para la comercialización de jugo de cítricos en Veracruz.  
501 Disponible en:  
502 [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercado/SISTPR](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/SISTPR)  
503 [OD\\_CITRICOS.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/SISTPR). Accesado: 16 febrero 2015.

504 SARH and BANCOMEXT. (1993). La industria de la naranja en México, México.  
505 Secretaría de Economía. (2002). Estudio para dar valor agregado en cítricos. Universidad  
506 Autónoma Chapingo, México.

507 SEMARNAT (Secretaría de Marina y Recursos Naturales). (2015). Volumen de descarga  
508 de aguas residuales industriales y municipales. Disponible en:  
509 [http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi\\_apps/WFServlet?IBIF\\_ex=D3\\_AGUA07\\_1](http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_AGUA07_1)  
510 [0&IBIC\\_user=dgeia\\_mce&IBIC\\_pass=dgeia\\_mce](http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_AGUA07_1). Accesado: 16 marzo 2015.

511 SENER (Secretaría de Energía). (2015). Balance Nacional de Energía 2012. Disponible en:  
512 [http://sener.gob.mx/res/PE\\_y\\_DT/pub/2012/Balance%20Nacional%20de%20Energia](http://sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/2012/Balance%20Nacional%20de%20Energia)  
513 [%202012%20\(Vf\).pdf](http://sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/2012/Balance%20Nacional%20de%20Energia). Accesado: 18 junio 2015.

514 SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2015). Cierre de la  
515 producción agrícola por cultivo. México. Disponible en:  
516 <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Accesado: 9  
517 febrero 2015.

518 Speece, R. E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment,  
519 *Environ Sci Technol*, 17:416–427.

520 Surendra, K., Takara, D., Hashimoto, A. and Khanal, S. (2014). Biogas as a sustainable  
521 energy source for developing countries: Opportunities and challenges. *Renewable and*  
522 *Sustainable Energy Reviews*, (31) 846–859.

523 USDA. FASa (United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service).  
524 (2015). Oranges, Fresh: Production, Supply and Distribution in Selected Countries.  
525 Disponible en:  
526 <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Orange>  
527 [s%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Orange)  
528 [&hidReportRetrievalID=2366&hidReportRetrievalTemplateID=8](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Orange). Accesado: 9  
529 febrero 2015.

530 USDA. FASb (United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service).  
531 (2015). Oranges, Fresh: Production, Supply and Distribution in Selected Countries



- 532 (Continued). Disponible en:  
 533 [http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Orange](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Oranges%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries+(Continued)&hidReportRetrievalID=2367&hidReportRetrievalTemplateID=8)  
 534 [s%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Oranges%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries+(Continued)&hidReportRetrievalID=2367&hidReportRetrievalTemplateID=8)  
 535 [+\(Continued\)&hidReportRetrievalID=2367&hidReportRetrievalTemplateID=8](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Oranges%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries+(Continued)&hidReportRetrievalID=2367&hidReportRetrievalTemplateID=8).  
 536 Accesado: 9 febrero 2015.
- 537 USDA. FASc (United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service).  
 538 (2015). Lemons and Limes, Fresh: Production, Supply and Distribution in Selected  
 539 Countries. Disponible en:  
 540 [http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Lemons](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Lemons+and+Limes%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2184&hidReportRetrievalTemplateID=8)  
 541 [+and+Limes%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Lemons+and+Limes%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2184&hidReportRetrievalTemplateID=8)  
 542 [+Countries&hidReportRetrievalID=2184&hidReportRetrievalTemplateID=8](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Lemons+and+Limes%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2184&hidReportRetrievalTemplateID=8).  
 543 Accesado: 9 febrero 2015.
- 544 USDA. FASd (United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service).  
 545 (2015). Grapefruit, Fresh: Production, Supply and Distribution in Selected Countries.  
 546 Disponible en:  
 547 [http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Grapefr](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Grapefruit%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2183&hidReportRetrievalTemplateID=8)  
 548 [uit%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countrye](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Grapefruit%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2183&hidReportRetrievalTemplateID=8)  
 549 [s&hidReportRetrievalID=2183&hidReportRetrievalTemplateID=8](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Grapefruit%2c+Fresh%3a+Production%2c+Supply+and+Distribution+in+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2183&hidReportRetrievalTemplateID=8). Accesado: 9  
 550 febrero 2015.
- 551 Valdés, P., Guerrero, B., Nieves, G. and De la Torre, V. (1994). Tratamiento de aguas  
 552 residuales cítricas por vía anaerobia. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 10 (2), 69-75.
- 553 Van Haandel, C. and Lettinga G. (1994). *Anaerobic Sewage Treatment: A Practical Guide*  
 554 *for Region with a Hot Climate*. John Wiley & Sons, New York.
- 555 Wilkins, M., Suryawat, L., Maness, O. and Chrz, D. (2006). Ethanol production by  
 556 *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-  
 557 peel oil. *Microbiol. Biotechnol.* 23:8–1161.

558  
 559  
 560

## Tables

- Table 1 Citrus production in México from 2009 to 2013.  
 Table 2 Citrus grinding capacity, México 2009.  
 Table 3 Table 3. Methane yield and efficiencies using different operating conditions in anaerobic reactors.  
 Table 4 Characterization of citric affluent.

561  
 562  
 563  
 564

## Figures

- Fig. 1 The main citrus producing states in México.  
 Fig. 2 % of citrus production in México from 2009 to 2013.  
 Fig. 3 Production of citrus in Veracruz from 2009 to 2013.  
 Fig. 4 % of citrus production in Veracruz from 2009 to 2013 compared to domestic production.  
 Fig. 5 Production of citrus products in México from 2010 to 2013.  
 Fig. 6 Distribution of citrus in México from 2010 to 2013 in terms of export, processing and consumption.  
 Fig. 7 % of oranges used for processing from 2000 to 2013.

Fig. 8 Process diagram for orange.

Fig. 9 Cost of energy generated using natural gas, fuel oil and electricity.

565

# Tables

## Tables

Table 1 Citrus production in México from 2009 to 2013.

Table 2 Citrus grinding capacity, México 2009.

Table 3 Table 3. Methane yield and efficiencies using different operating conditions in anaerobic reactors.

Table 4 Characterization of citric affluent.

Table 1. Citrus production in México from 2009 to 2013.

Year	Orange (T)	Lemon (T)	Pineapple (T)	Grapefruit (T)	Tangerine (T)	Total (T)
2009	4,193,484.44	1,966,344.75	749,395.58	431,670.85	218,365.00	7,559,260.62
2010	4,051,631.61	1,891,403.15	701,740.48	400,933.86	195,934.84	7,241,643.94
2011	4,079,677.74	2,132,921.78	742,926.34	397,266.70	175,229.80	7,528,022.36
2012	3,666,789.65	2,055,208.89	759,976.18	415,470.85	177,710.21	7,075,155.78
2013	4,409,967.62	2,120,612.50	771,941.85	425,432.97	170,025.81	7,897,980.75
Average	4,080,310.21	2,033,298.21	745,196.09	414,155.05	187,453.13	7,460,412.69

Table 2. Citrus grinding capacity, México 2009.

State	Plant	T/year	Subtotal (T/year)	Total (T/year)
Veracruz	Citrex, Martínez de la Torre	200,000	800,000	1,353,500
	Citrofrut, San Rafael	199,000		
	IQC, Álamo	147,000		
	Procitrus, Álamo	70,000		
	Procitrus, Papantla	70,000		
	Citromax, Álamo	60,000		
	Citrofrut, Álamo	54,000		
Tamaulipas	Procimart, Ciudad Victoria	165,000	245,000	1,353,500
	Citrotam, Ciudad Victoria	80,000		
Nuevo León	Citromax, Montemorelos	90,000	144,000	1,353,500
	Juguera Allende, Allende	54,000		
San Luis Potosí	Citrofrut, Huixihuallán	68,000	68,000	1,353,500
Tabasco	Citrus Tabasco, Huimanguillo	55,000	55,000	1,353,500
Yucatán	Unión de Ejidos, Akil	41,500	41,500	1,353,500

Table 3. Methane yield and efficiencies using different operating conditions in anaerobic reactors.

	Conventional reactors			High load reactors	
Author/Year	Valdés <i>et al.</i> , 1993	Martín <i>et al.</i> , 2010	Koppar and Pullamimanappallil, 2013	Alvarado-Lassman <i>et al.</i> , 2008	Rico <i>et al.</i> , 2015
Reactor type	Fixed bed upflow	Completely stirred tank	Down flow stationary fixed film	Inverse fluidized bed	UASB
Support material	Raschig rings	----	----	Extendo- sphere / Polyethylene	----
Operation mode	Semi-continuous	Batch	Continuous	Continuous	Continuous
Scale	Laboratory	Laboratory	Laboratory	Laboratory	Laboratory
Affluent (substrate)	Diluted orange juice	From the pressing of orange peel	From the pressing of orange peel	From brewery	Cheese whey and cow manure liquid fraction
Pre-treatment of the affluent	No	Aluminium sulphate	----	No	FeCl <sub>3</sub> y cationic polyacrylamide
Nutrient requirements	Yes	Yes	----	Yes	Yes
OLR (gCOD/L*d)	0.312 – 4.175	1.5 – 5 gDQO	0.51	>70	28.7
T (°C)	----	37	55	35	35
HRT (days)	1 – 4	2 – 3	16	<1	1.3
Substrate/biomass (gCOD/gVS)	----	1.70 – 1.75	----	----	~1.25
COD removal (%)	77.5 – 97.2	84	----	>90	95.1
Y (LCH <sub>4</sub> / g COD <sub>rem</sub> )	0.3 – 0.381	0.297	0.238	~0.3	0.34

Table 4. Characterization of citric affluent.

Parameter	
COD total (mg/L)	38,780.00
COD soluble (mg/L)	35,420.00
TS (mg/L)	21,662.00
VS (mg/L)	18,084.00
pH	3.76

# Figures

## Figures

- Fig. 1 The main citrus producing states in México.
- Fig. 2 % of citrus production in México from 2009 to 2013.
- Fig. 3 Production of citrus in Veracruz from 2009 to 2013.
- Fig. 4 % of citrus production in Veracruz from 2009 to 2013 compared to domestic production.
- Fig. 5 Production of citrus products in México from 2010 to 2013.
- Fig. 6 Distribution of citrus in México from 2010 to 2013 in terms of export, processing and consumption.
- Fig. 7 % of oranges used for processing from 2000 to 2013.
- Fig. 8 Process diagram for orange.
- Fig. 9 Cost of energy generated using natural gas, fuel oil and electricity.



Fig. 1. The main citrus producing states in México.

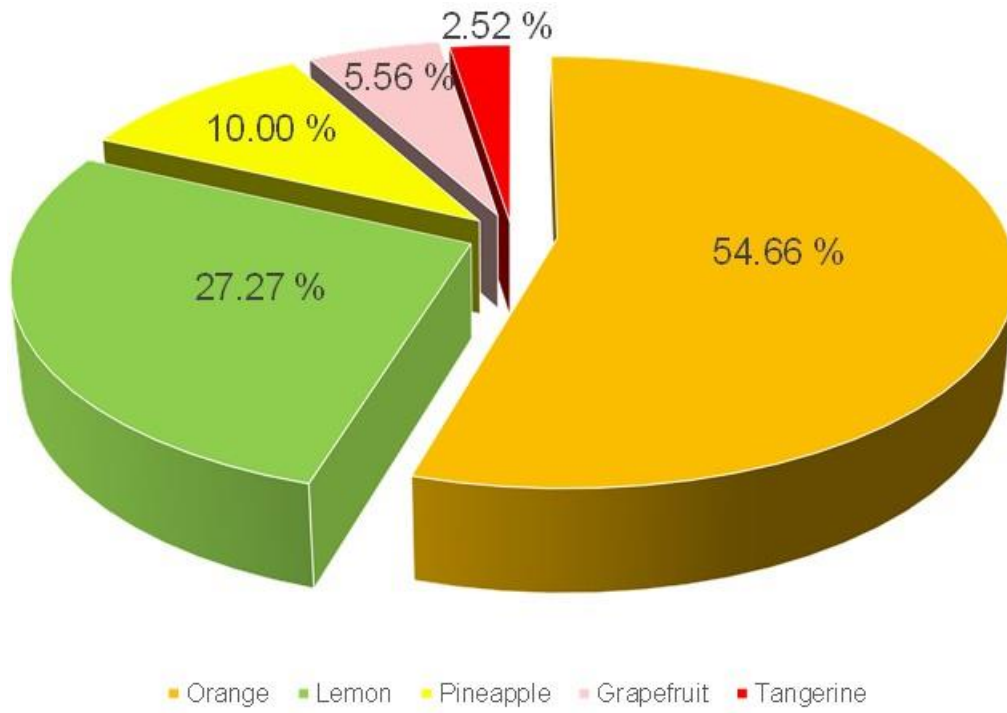


Fig. 2. % of citrus production in México from 2009 to 2013.

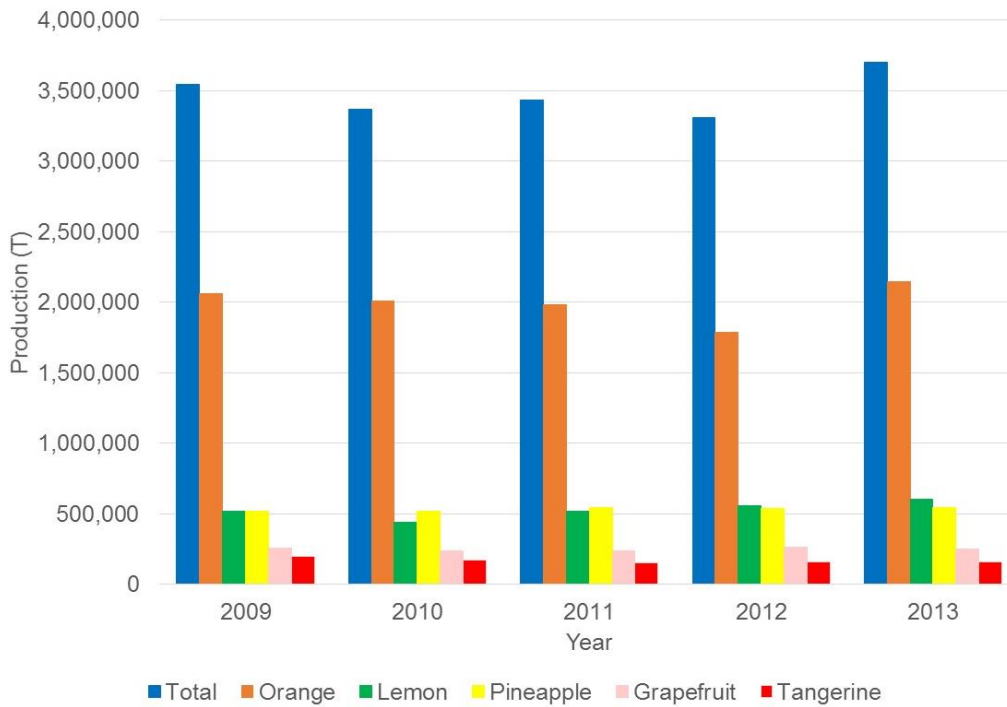


Fig. 3. Production of citrus in Veracruz from 2009 to 2013.

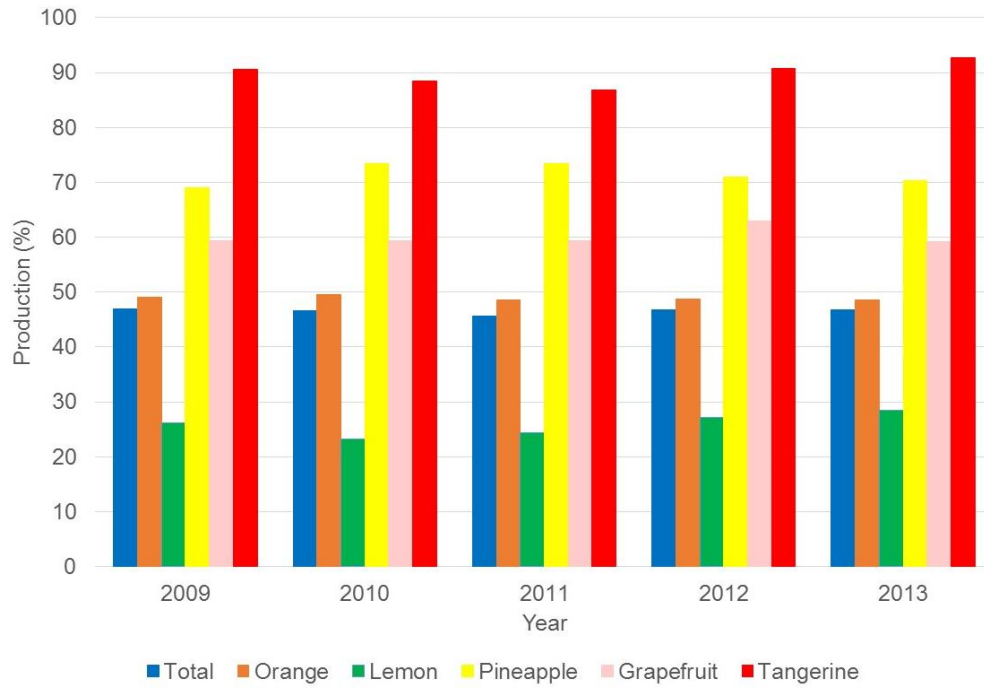


Fig. 4. % of citrus production in Veracruz from 2009 to 2013 compared to domestic production.

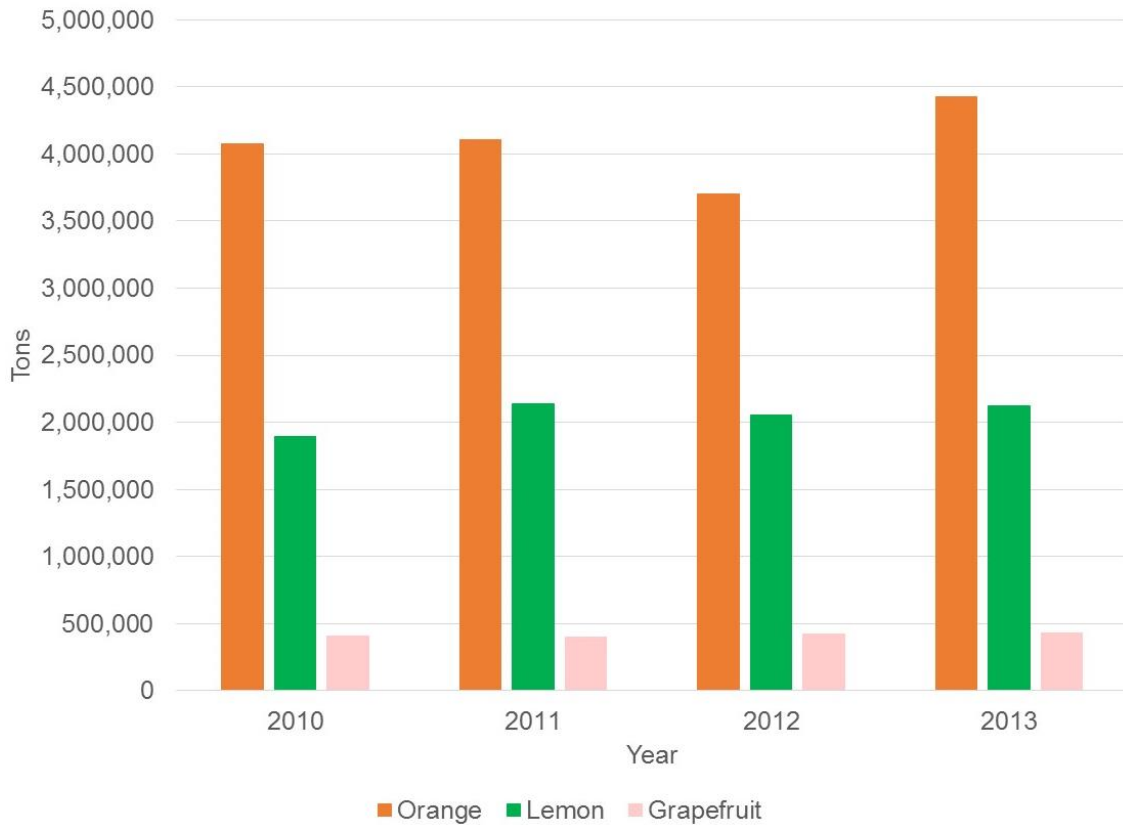


Fig. 5. Production of citrus products in México from 2010 to 2013.

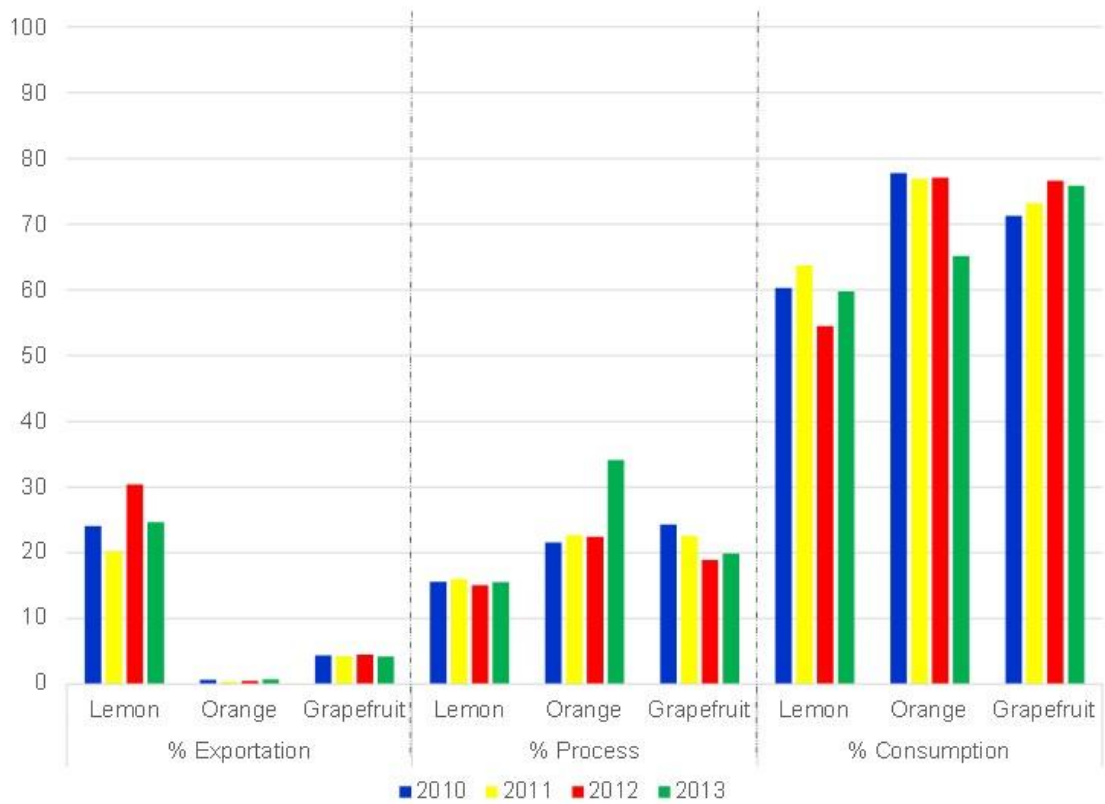


Fig. 6. Distribution of citrus in México from 2010 to 2013 in terms of export, processing and consumption.

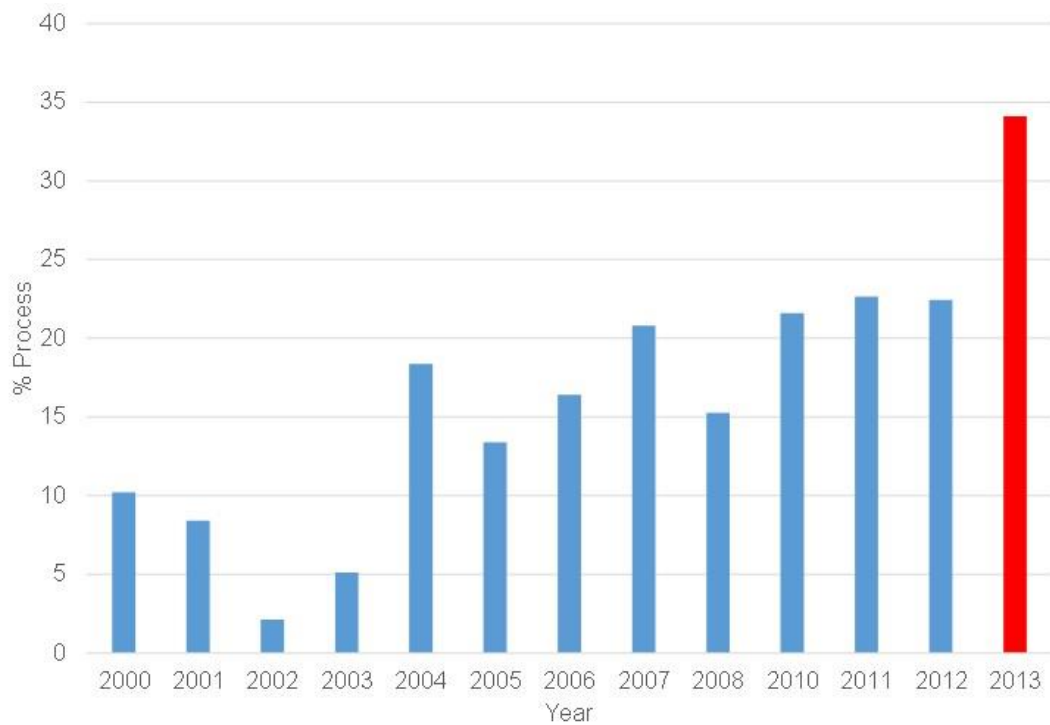


Fig. 7. % of oranges used for processing from 2000 to 2013.



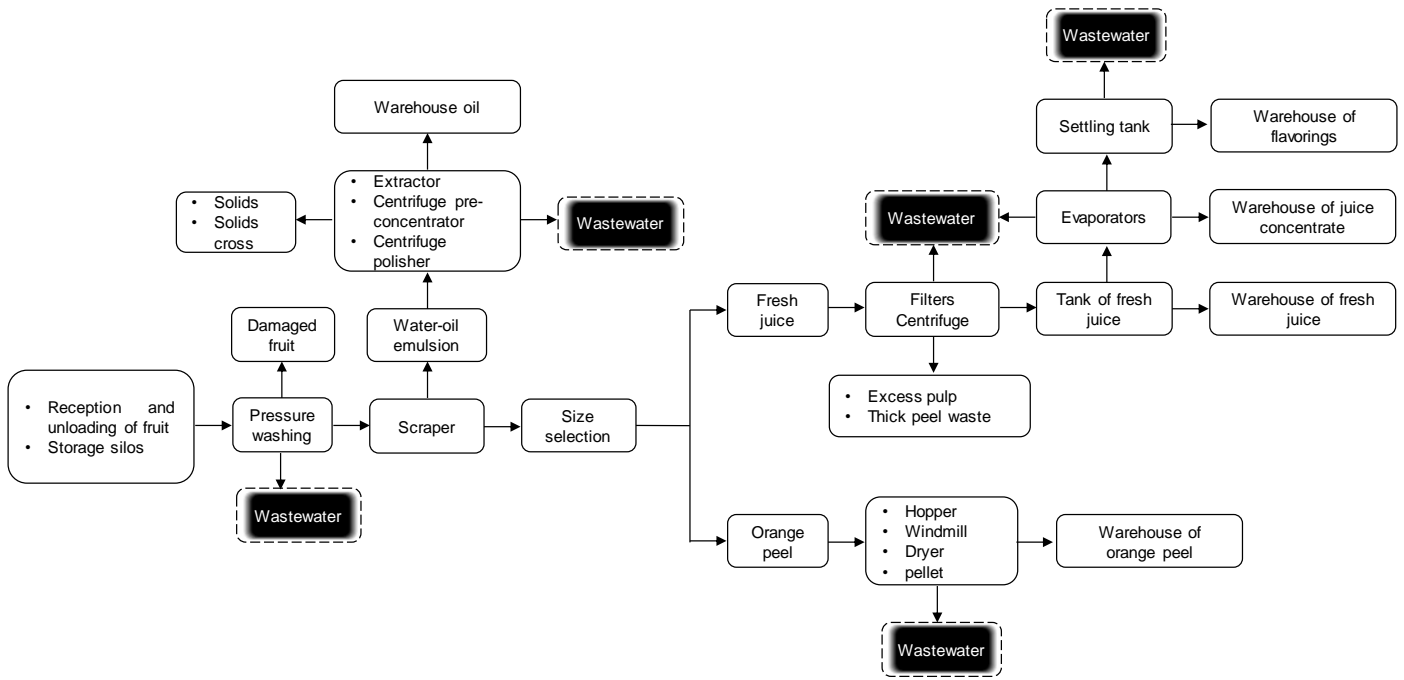


Fig. 8. Process diagram for orange.

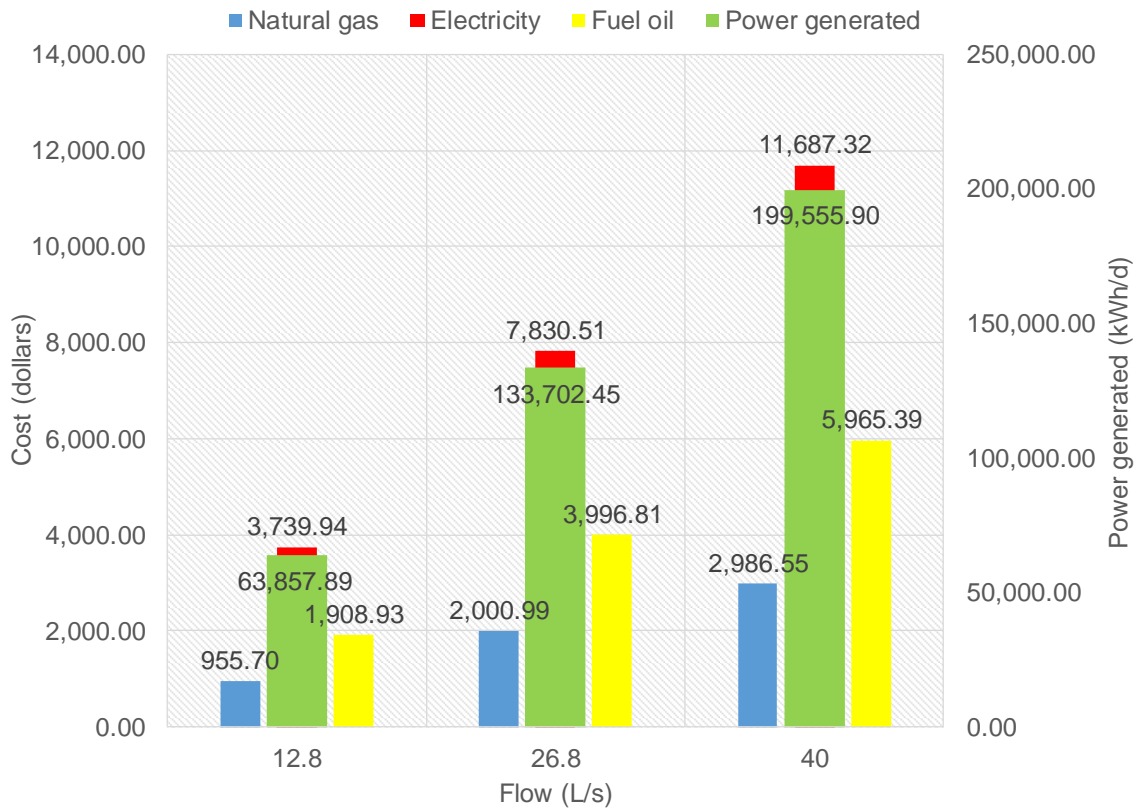


Fig. 9. Cost of energy generated using natural gas, fuel oil and electricity.

Manuscript Number:

Title: ANAEROBIC CO-DIGESTION OF CITRUS WASTE WITH CATTLE MANURE FOR BIOGAS PRODUCTION

Article Type: SI:Biological WTE

Keywords: Anaerobic co-digestion

Solid Citrus Waste

Cattle manure

Biogas

Semi-continuous

Corresponding Author: Dr. Alejandro Alvarado-Lassman, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Instituto Tecnológico de Orizaba

First Author: Alejandro Alvarado-Lassman, Ph.D.

Order of Authors: Alejandro Alvarado-Lassman, Ph.D.; Erik S Rosas-Mendoza, M.Sc.; Norma A Vallejo-Cantú, M.Sc.; Juan M Méndez-Contreras, PhD; Alma L Luis-Garcez, M.Sc.

Abstract: In 2013, Mexico processed 1.5 million tons of oranges. Currently, the processing of citrus fruits generates 0.7 million tons per years of solid waste. Co-digestion with cattle manure (CM) is one viable option for maximizing the utility of the solid waste produced by the citrus industry (Solid Citrus Waste, henceforth SCW). The objective of this study is to demonstrate and compare the results of the treatment of this waste with anaerobic co-digestion in a reactor operating in both batch and semi-continuous mode. The anaerobic reactor had a total volume of 250 L, occupying 220 L for the co-digestion of 3 CM/SCW batches in proportions of 90/10, 80/20 and 70/30. The reactor was then fed in semi-continuous mode at a ORL of 8 gCODT/L\*d. The CM was obtained from a cattle farm in the city of Orizaba, Veracruz, while the SCW was obtained from a citrus company located in the northern region of the State of Veracruz. The reactor operating in batch mode was able to remove a CODT of 58, 50 and 62% and VS of 49, 44 and 60%, while maximum methane yields of 0.095, 0.337 and 0.331 LCH<sub>4</sub> at STP/gCODTrem, respectively, were also achieved. Furthermore, operating in semi-continuous mode was able to remove 24% of CODT over a period of 10 days. The generation of biogas per day was 24.4 L. The characteristics of SCW make it suitable for use in the generation of bioenergy using co-digestion with CM in shorter residence times.

Suggested Reviewers: EVANGELOS A VOUDRIAS Ph.D.

Professor, Environmental Engineering, Democritus University of Thrace  
voudrias@env.duth.gr

Expert in solid waste management

Raffaello Cossu Ph.D.

Professor, Environmental and Land Planning Engineering, University of Padova

raffaello.cossu@unipd.it  
Expert in solid waste treatment

Giorgia De Gioannis Ph.D.  
Professore Associato, Civil, Environment and Architecture, Università di  
Cagliari  
degioan@unica.it  
Expert in waste management

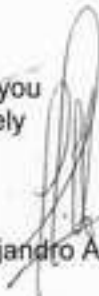
**Dear Editor of Waste Management Journal.**

By this letter, we want to initiate the publication process for our paper entitled "ANAEROBIC CO-DIGESTION OF CITRUS WASTE WITH CATTLE MANURE FOR BIOGAS PRODUCTION" in the Waste Management.

We are sending this contribution in response to the invitation for entering the peer review process in view of potential publication referent to the special thematic issue on "Biological Waste to Energy", based on selected papers from the Venice 2016 Symposium.

Thank you  
Sincerely

Dr. Alejandro Alvarado Lassman

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alejandro Alvarado Lassman', is written over the printed name.

# ANAEROBIC CO-DIGESTION OF CITRUS WASTE WITH CATTLE MANURE FOR BIOGAS PRODUCTION

*Erik Samuel Rosas-Mendoza<sup>a</sup>, Alma Lucero Luis-Garcez<sup>a</sup>, Norma Alejandra Vallejo-Cantú<sup>a</sup>, Juan Manuel Méndez Contreras<sup>a</sup>, Alejandro Alvarado-Lassman<sup>a</sup>*

*<sup>a</sup>División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Orizaba, Av. Oriente 9, 852. Col. Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, México*

## ABSTRACT:

In 2013, México processed 1.5 million tons of oranges. Currently, the processing of citrus fruits generates 0.7 million tons per years of solid waste. Co-digestion with cattle manure (CM) is one viable option for maximizing the utility of the solid waste produced by the citrus industry (Solid Citrus Waste, henceforth SCW). The objective of this study is to demonstrate and compare the results of the treatment of this waste with anaerobic co-digestion in a reactor operating in both batch and semi-continuous mode. The anaerobic reactor had a total volume of 250 L, occupying 220 L for the co-digestion of 3 CM/SCW batches in proportions of 90/10, 80/20 and 70/30. The reactor was then fed in semi-continuous mode at a ORL of 8 gCOD<sub>T</sub>/L\*d. The CM was obtained from a cattle farm in the city of Orizaba, Veracruz, while the SCW was obtained from a citrus company located in the northern region of the State of Veracruz. The reactor operating in batch mode was able to remove a COD<sub>T</sub> of 58, 50 and 62% and VS of 49, 44 and 60%, while maximum methane yields of 0.095, 0.337 and 0.331 LCH<sub>4</sub> at STP/gCOD<sub>Trem</sub>, respectively, were also achieved. Furthermore, operating in semi-continuous mode was able to remove 24% of

26 COD<sub>T</sub> over a period of 10 days. The generation of biogas per day was 24.4 L. The  
27 characteristics of SCW make it suitable for use in the generation of bioenergy using co-  
28 digestion with CM in shorter residence times.

29

30 *KEYWORDS: Anaerobic co-digestion, Citrus waste, Cattle manure, Biogas*

31

## 32 **1. INTRODUCTION**

33

34 Globally, the two greatest citrus producers are Brazil and the United States, contributing  
35 21.4% and 12.5% respectively, followed by China, Mexico, Spain and India. (FAO, 2015).

36 The production of orange juice on an industrial level generates 8 to 20 million tons per  
37 year of solid and liquid waste (Rezzadori et al. 2012). From 2009 to 2013, an average of  
38 7.4 million tons of citrus was produced in Mexico, of which 4.08 million tons were oranges  
39 (SIAP, 2015). In 2013, Mexico processed 1.5 million tons of oranges, from which products  
40 such as fresh and concentrated juice, scents, oils and dry peel are obtained. Currently,  
41 orange processing generates 0.7 million tons per year of Solid Citrus Waste (SCW), and  
42 its incorrect final disposal generates serious pollution problems due to its acidic pH and  
43 high concentration of organic matter. The principal components of per 100 g of this type of  
44 residue are as follows: pectin, 25 g; insoluble sugars, 22.9 g; cellulose, 22 g;  
45 hemicellulose, 11.09 g; and, d-limonene, 3.78 g (Pourbafrani et al., 2010).

46 Beef production is of great socioeconomic importance in Mexico, where it has  
47 buttressed the development of national industry (Ruiz et al., 2009). The final disposal of  
48 waste from the livestock industry, and especially cattle manure (CM), comprises air drying  
49 without any type of additional treatment to mitigate the concomitant environmental

50 problems, such as the generation of disagreeable odors and the development of vector-  
51 borne infectious diseases. The generation of CM is different in all systems of production,  
52 both national and international. According to calculations based on the work of Krich  
53 (2005), dairy cows generate an average of 2.120 tons of dry excreta per animal per year.  
54 Taking an average 15% waste content would provide an approximate production of 14.133  
55 tons per animal per year, or 38.7 kg of excreta per animal per day. This value is similar to  
56 the 40 L of excreta per animal per day reported by Brown et al. (2007), while Row and  
57 Neabel (2005) reported 1.2 tons of dry dung per animal per year in the case of cattle  
58 farmed for beef production with respect to CM characterization. Nasir et al. (2013)  
59 recorded the following readings for CM: pH = 7.25; TS = 189.8 mg/L; and, VS = 34 mg/L;  
60 COD = 24.85 mg/L. Furthermore, Lobato-Fuentes (2012) observed the following CM  
61 readings: pH = 8.43; TS = 233.7 g/L; VS = 174.5 g/L; and, COD = 133.5 g/L.

62 One solution for the problem of the generation of SCW and CM is anaerobic co-  
63 digestion, these type of wastes are suitable for this treatment due to its high organic  
64 material content. The term co-digestion refers to anaerobic digestion applied with two  
65 more substrates of different origin. Anaerobic digestion is a simple and clean technology  
66 and less costly compared with other renewable technologies for the generation of energy  
67 (Surendra et al., 2014). The technique of anaerobic co-digestion enables the efficient  
68 development of the process, due to the synergic behavior of the substrates used, which  
69 compensate for the differences that each present when used to undertake the process  
70 separately (Nielfa et al., 2015). The principal advantages of anaerobic digestion include: i)  
71 organic waste with a low nutritional content can be degraded via co-digestion with different  
72 substrates in anaerobic reactors; and, ii) simultaneously, the process also brings with it  
73 the low cost production of biogas, which can be vital for the maintenance of energy needs  
74 in the future (Khalid et al., 2011). While the decomposition of organic material in the

75 presence of bacteria during anaerobic co-digestion also generates biogas, which has a  
76 variable composition depending on the substrate digested and the type of technology  
77 used, it can contain the following: 50-70% methane; 30-40% carbon dioxide; and,  $\leq 5\%$   
78 hydrogen, hydrogen sulfide and other gasses. A biogas with a 60% methane content has a  
79 calorific power of approximately  $6.4 \text{ kWh/m}^3$  at STP (CIEMAT, 2007). Co-digestion can be  
80 limited by the inhibiting effects of D-limonene on anaerobic biomass (Calabrò et al., 2016).

81 Various studies have reported the use of excreta in anaerobic co-digestion processes  
82 with different substrates. Brinkman (2008) utilized biodegradable agricultural and livestock  
83 farming waste in co-digestion at mesophilic and thermophilic temperatures, while Álvarez  
84 and Liden (2009) observed that the co-digestion of different types of organic waste can  
85 increase the production of biogas and reduce the effect of toxic compounds and inhibitors  
86 on the process. Cabbai et al. (2013) used the co-digestion of solid organic municipal waste  
87 with sewage, obtaining a maximum methane yield of  $675 \text{ NmLCH}_4/\text{gVS}$  for restaurant  
88 waste, and of between 571 and  $645 \text{ NmLCH}_4/\text{gVS}$  for organic waste from organic waste  
89 containers. Cabbai et al. (2016) studied the co-digestion of solid organic municipal waste  
90 with sewage at a pilot plant level, reporting a gas production rate of  $0.95 \text{ Nm}^3/\text{m}^3\text{d}$  and a  
91 specific production of  $0.49 \text{ Nm}^3/\text{kgVS}$  with a 67.3% reduction of VS.

92 This study aims to demonstrate and compare the results of the treatment of waste with  
93 anaerobic co-digestion in a reactor operated in both batch and semi-continuous mode.  
94 Furthermore, it seeks to propose co-digestion in semi-continuous mode as a viable  
95 alternative for the treatment of large volumes of SCW per day in high concentrations, and,  
96 thus, mitigate the effects of the final disposal of this waste.

97

98



## 99 **2. MATERIAL AND METHODS**

### 100 **2.1 Characteristics of the anaerobic reactor**

101 The anaerobic reactor was constructed in fiberglass with a wall thickness of ¼" (0.635 cm),  
102 height of 1.042 m and a total volume of 250 L. The valves and tubes used were of PVC  
103 schedule 80 and 2 in diameter. Inside the reactor, a volume of 220 L was used as the  
104 working volume and the rest for the biogas chamber. Fiberglass is known for being a  
105 thermal insulator, inert to diverse substances, with resistance to deformation after  
106 manufacture, and allowing to work at relatively high temperatures. The feeding of the  
107 reactor was carry out manually using the inlet port located in the upper left section of the  
108 reactor, opening the ball valve (accessory No. 2, as shown in Figure 1). The mesophilic  
109 temperature inside the reactor was kept using a 25 L capacity heating jacket, with an  
110 automatic thermostat and a 600 L/h capacity recirculation submersible pump inside the  
111 water reservoir. At the bottom of the reactor was installed a recirculation system composed  
112 of a storage tank and a variable speed peristaltic pump (MasterFlex) that circulates the  
113 mixture of bacteria and the substrate by the inlet ports placed in the upper part of the  
114 reactor. The other upper port was used for the biogas output that subsequently was  
115 collected in an inverted water displacement system, with the liquid in this system  
116 maintained at a pH of 5.5 using HCl in order to avoid the dissolution of CO<sub>2</sub> into the water.

117

118 Figure 1. Anaerobic reactor for the co-digestion of SCW with CM.

119

### 120 **2.2 Inoculum**

121 As a source of bacteria and for the inoculation of the anaerobic reactor, this study used

122 fresh CM obtained from the inlet tank of a geomembrane reactor diluted at a ratio of 1:3.  
123 The geomembrane reactor is located in a cattle farm in the city of Orizaba, Veracruz,  
124 Mexico. The CM were transferred to Instituto Tecnológico de Orizaba for characterization,  
125 after which the anaerobic reactor was inoculated. The results of the characterization of the  
126 CM are shown in Table 1.

### 127 **2.3 Substrate**

128 SCW from a citrus processing plant in the municipality of Martínez de la Torre, Veracruz,  
129 Mexico was used as substrate. This waste originates from various points in the process of  
130 obtaining products such as oils, fresh and concentrated juice, scents and dry peel. The  
131 substrate is generated from different points of the fresh and concentrated juice, essential  
132 oil and dry peel production processes. After the samples were obtained, they were  
133 transferred in refrigerated containers to the Environmental Engineering Laboratory at the  
134 Instituto Tecnológico de Orizaba for physicochemical characterization, the parameters for  
135 which are shown in Table 1.

136

137 Table 1. Characterization of CM and SCW.

138

139

140 Finally, the SCW samples were stored at 4 °C, in accordance with NMX-AA-052-1985,  
141 to be subsequently fed into the anaerobic reactor.

### 142 **2.4 Methodology of the experiment**

143 This experiment was developed in 3 stages, as shown in Figure 2 and described below:

144

145 Figure 2. Experimental methodology

146

147 *2.4.1 Inoculation, start-up and stabilization of the anaerobic reactor in batch mode*

148 The anaerobic reactor was inoculated with 160 L of fresh CM and remained operating in  
149 batch mode for 7 days. It was not necessary to regulate the pH, because the CM  
150 presented an almost neutral pH, as shown in Table 1. The rate at which this source of  
151 bacteria was recirculated was kept constant, with the mesophilic conditions kept under  
152 monitoring. Then 140 L of CM was extracted, with 20 L kept along with a 200 L supply of  
153 fresh excreta, thus ensuring a useable CM volume of 220 L. The start-up phase lasted for  
154 30 days. Finally, 200 L was removed from the 220 L CM from the start-up phase and 200 L  
155 of fresh excreta was fed, again, into the reactor. This process was carried out in 2 batches,  
156 each of which was maintained in operation for 30 days under the same conditions as the  
157 inoculation and start-up phases. In total, the stabilization phase lasted 60 days. The  
158 inoculation, start-up and stabilization stage had a total duration of 97 days.

159 *2.4.2 Co-digestion stage in batch mode*

160 After the inoculation, start-up and stabilization stage with CM, the anaerobic reactor was  
161 fed with SCW, thus starting the anaerobic co-digestion process. Due to the low pH value  
162 and the fact that the bacteria inside the reactor were not adapted to digest this type of  
163 substrate, the SCW was fed in different proportions and in three consecutive batches, as  
164 shown in Table 2. Because of the high moisture content of the residue, only was necessary  
165 to add 3 L of water for homogenization and trituration of the SCW (to prepare 22 L), before  
166 is fed into the reactor in semisolid form.

167

168 Table 2. Anaerobic co-digestion of CM/SCW.

169

170

171 Each batch was fed with 220 L of the CM/SCW mixture in the proportions described in  
172 Table 2, with the pH of each batch adjusted to 7.5, utilizing an NaOH solution. Thus, the  
173 same operating conditions as those in the inoculation, start-up and stabilization stages  
174 were achieved.

### 175 *2.4.3 Co-digestion stage in semi-continuous mode*

176 After evaluating the co-digestion of CM/SCW in batch mode, the adaptation of the bacteria  
177 to the mixture was proven. The mixture of batch 3 was kept in recirculation for 15 more  
178 days and then the reactor was fed with an 80/20 ratio, with the withdrawal of 44 L of the  
179 mixture inside the reactor and the feed of 44 L of fresh SCW. The remaining 176 L  
180 comprised the mixture (digested CM/SCW) that had already been adapted during the co-  
181 digestion process in batch mode. This process was carried out in 4 batches, the first for 5  
182 days, and then for 10 days for the rest of them, making this a co-digestion process carried  
183 out over short time periods.

184 After the reactor performance evaluation of the previous short time batch periods, it was  
185 decided to reduce the SCW by 10 %, with a feed ratio modified to 90/10. Then two new  
186 periods were evaluated, the first for adaptation and the second for stabilization in  
187 semicontinuous mode, every 10 days, using a ORL of 8 gCOD<sub>T</sub>/L\*d.

## 188 **2.5 Analytical determinations**

189 The determination of the pH was undertaken with an Orion Model 250A potentiometer.  
190 The total COD (DQO<sub>T</sub>) and soluble COD (COD<sub>S</sub>) was monitored every 24 hours in both  
191 operational modes by means of the colorimetric method (APHA, 1995). Due to its nature,  
192 SCW cannot be analyzed directly (Buffiere et al., 2008), for that reason the particle size  
193 was reduced (< 1 mm) in a conventional blender with the aim of homogenizing the

194 samples in order to avoid the obstruction of the measuring instruments. In order to carry  
195 out the COD<sub>S</sub>, 12 mL of the sample was centrifuged in a HERMLE Z 383 centrifuge at  
196 3500 rpm for 10 minutes, with the supernatant taken to be analyzed. The digested samples  
197 COD was measured with a HACH spectrophotometer at 620 nm. The total solids (TS) and  
198 volatile solids (VS) were determined by means of the gravimetric method (APHA, 1995).

199 The biogas composition was determined in a Buck 310 gas chromatograph equipped with  
200 an AllTech CRT I capillary column, 6" length and ¼" diameter, which detects CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>  
201 and N<sub>2</sub>. The direct injection dosis was 2 mL and the operating conditions comprised the  
202 use of helium at 70 psi as a carrier gas, with a column temperature of 36 °C and a detector  
203 temperature of 121 °C.

### 204 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### 205 **3.1 Inoculation, start-up and stabilization stage of the anaerobic reactor in batch** 206 **mode**

207 Throughout the inoculation phase, the pH value remained stable between 7.81 and 6.95,  
208 while the COD<sub>T</sub> decreased from 7.5 to 3.6 g/L, and the COD<sub>S</sub> decreased from 4.7 to 2.5  
209 g/L. Initial TS values of 5.14 decreased to a final level of 3.7 g/L. The VS were 3.7 and 1.6  
210 g/L for the beginning and after the batch. During start-up phase, the inlet pH value was  
211 7.69 and 6.71 at output. The values at the start and finish of the COD<sub>T</sub> were 6.5 and 1.45  
212 g/L, respectively. There was a decrease in COD<sub>S</sub> from 2.97 to 0.84 g/L. TS and VS values  
213 vary from 4.36 to 2.76 g/L and from 2.74 to 1.11 g/L, respectively. Finally, in the  
214 stabilization phase, the pH was equal to the previous phases, maintaining values very  
215 close to 7. The CM used to feed the reactor maintained an average COD<sub>T</sub> of 7.35 g/L and

216 an average COD<sub>S</sub> of 3.8 g/L. Each batch presented 79 and 88 % of COD<sub>T</sub> removal, with a  
217 similar tendency for COD<sub>S</sub>, TS and VS removal.

218 The biogas accumulated was 72.6, 659, 647 and 741 L in the inoculation, start-up and  
219 stabilization phases (2 batches), respectively.

220

### 221 **3.2 Co-digestion stage in batch mode**

222 After the anaerobic reactor had been operating for approximately 100 days in the  
223 inoculation, start-up and stabilization stage, the feeding of batches 1, 2 and 3 began in  
224 accordance with the compositions outlined in Table 2. The pH of the feed for the 3 batches  
225 was approximately 7.5, which can be seen in Figure 3, with similar behavior between  
226 batches 1 and 2 despite the different proportions of SCW fed into the reactor. However,  
227 during the first 6 days, batch 3 presented acidification because the bacterial medium was  
228 affected by the increased SCW feed. In order to avoid greater levels of acidification, an  
229 extra addition of NaOH solution was required. It is evident this was able to successfully  
230 stabilize the pH, following a similar tendency to the previous batches but presenting a  
231 greater oscillation over the 24 remaining days of operation. Despite having suffered a  
232 significant change in pH at the beginning of the experiment, the bacteria were able to re-  
233 establish activity and did not inhibit the anaerobic digestion process. Generally, the pH  
234 oscillated among values close to 7. Ward et al. (2008) found that the ideal pH range for  
235 anaerobic digestion is 6.8-7.2. Lee et al. (2009) reported that methanogenesis occurs  
236 efficiently in an anaerobic reactor at a pH of between 6.5 and 8.2.

237

238

239 Figure 3. Behavior of pH during the co-digestion of SCW with CM.

240

241 The COD measured in its total and soluble forms varied considerably because, in each  
242 batch, the amount of SCW to digest was increased. In this way, 19.78, 25.18 and 37.34  
243 g/L of SCW were fed with CM at the beginning of the preparation of batches 1, 2 and 3  
244 respectively. By the end of the 30 operational days for each batch, 58, 50 and 62% of the  
245  $COD_T$ , respectively, was removed. Similarly, 60, 57 and 35% of the  $COD_S$  was removed  
246 from batches 1, 2 and 3. Figure 4 shows a wider relative difference between the behavior  
247 of the  $COD_S$  compared to the  $COD_T$ , as the SCW ratio increases compared to the CM  
248 (CM/RSC = 90/10, 80/20 and 70/30).

249

250

251

252

253

254

255

256

257 Figure 4. Behavior of the  $COD_T$  and  $COD_S$ .

258

259 On the other hand, the addition of SCW to each batch also provokes increases in TS  
260 and VS concentrations; For TS, values of 15.17, 19.66 and 27.75 g/L of TS at the  
261 beginning of each batch, reaching removal levels of 53, 49 and 58%, respectively, after 30  
262 days of operation, as shown in Figure 5. As expected, VS levels followed a similar trend to  
263 the TS levels, with removal percentages of 49, 44 and 60%, respectively. Turning to other  
264 types of substrates, Li et al. (2011) report that the initial concentration of substrate  
265 influences the mesophilic anaerobic digestion of solid organic municipal waste, as was the  
266 case for batches 1, 2, and 3 in terms of both COD and solids.

267

268

269

270 Figure 5. Degradation profiles for TS and VS during co-digestion in batch mode

271

272 While the bacteria were adapting to the SCW added, batch 1 showed low biogas  
273 production levels during the initial days of the experiment, and then an increase was  
274 observed from day 8, reaching a maximum of 29 L by day 18. Batch 2 showed a similar  
275 behavior as batch 1, but with higher biogas production during the first operation days  
276 compared to the previous batch, which can be attributed to the increase of SCW. The  
277 highest production was reached on day 13 with 28 L. On the other hand, batch 3 was  
278 affected in the first 13 days by the new increase in SCW load; however, from day 14  
279 onwards this batch showed a very clear recovery, as seen in Figure 6, reaching a highest  
280 point of 28 L on day 20. The amount of biogas accumulated in each batch was 549.8,  
281 601.1 and 466.7 L, respectively.

282 The highest quantity of biogas was accumulated in batch 2, followed by batches 1 and  
283 3. While the maximum methane yield for each batch was 0.095, 0.337 and 0.331 LCH<sub>4</sub> at  
284 STP/gCOD<sub>Trem</sub>, respectively, batches 2 and 3 presented an average of 0.623 and 0.316  
285 LCH<sub>4</sub> at STP/gVS<sub>rem</sub>. Despite the elevated concentrations of organic material, the bacterial  
286 medium is capable of adapting and degrading this type of waste, generating high methane  
287 yields. Calabrò et al., (2016) report a methane yield of  $0.3956 \pm 1.6e^{-3}$  LCH<sub>4</sub> at STP/gSV<sub>rem</sub>  
288 in 30 days, utilizing a co-digestion process on orange peel waste (50%) with biowaste  
289 (50%) but extracting a large amount of the d-limonene present in the fresh residue. This  
290 yield was higher than that obtained from batch 3, but lower than that obtained from batch  
291 2, with these differences due to the proportions of stored SCW and the fact that this study  
292 did not eliminate the remaining d-limonene present in the SCW.



293

294

295 Figure 6. Biogas production in co-digestion stage in batch mode

### 296 **3.3 Co-digestion stage in semi-continuous mode**

297 On completion of the co-digestion in batches over 30 days, it was necessary to verify the  
298 performance of the bacteria and evaluate the co-digestion of the waste in a shorter  
299 operating time period. The reactor was operated with an 80/20 ratio, but, on this occasion  
300 with shorter time periods. Table 3 shows the conditions established and the results  
301 obtained.

302

303

304

305 Table 3. Evaluation of co-digestion over short time periods.

306

307 It should be noted that the percentage of  $COD_T$  and VS removed from batch 1 was low,  
308 owing to the short time the bacteria had to degrade the organic material. For this reason, it  
309 was necessary to increase the degradation time for the subsequent batches, in which  
310 there was a significant increase in the removal percentages, with similar behavior  
311 observed for the degradation of  $COD_T$  and VS in batches 2 and 3. However, the removal  
312 rates for batch 4 drastically decreased, which is probably due to the fact that the time  
313 period in which to digest a CM/SCW ratio of 80/20 was short.

314 The maximum methane yields for each batch were 0.103, 0.164, 0.117 and 0.134  $LCH_4$   
315 at  $STP/gCOD_{Trem}$  respectively. On the other hand, the average methane yields for each  
316 batch, according to the VS readings, were 0.052, 0.104, 0.074 and 0.297  $LCH_4$  at  
317  $STP/gVS_{rem}$ , in which it was observed that the methane yields for the last batch were high

318 compared to the low percentages for the removal of COD<sub>T</sub> and SV.

319 Once the evaluation of the batches in short times periods had been concluded, the  
320 operation of the reactor in semi-continuous feeding mode began with a daily 22 L dose of  
321 fresh SCW. While an average COD<sub>T</sub> of 8.03 g/L was used to maintain a ORL of 8  
322 gCOD<sub>T</sub>/L\*d during the adaptation phase in order to thus maintain the same ORL, an  
323 average COD<sub>T</sub> feed of 8.35 g/L of fresh SCW was required in the stabilization phase.

324

325

326 Figure 7. SCW feeding in semi-continuous mode in the adaptation and stabilization phases: % of COD<sub>T</sub> and  
327 VS removed.

328 Figure 7 shows a similar behavior in the removal of COD<sub>T</sub> and VS in the adaptation and  
329 stabilization phases, presenting average removals of COD<sub>T</sub> of 29% in the adaptation  
330 phase and 24% in the stabilization phase. For the removal of VS, the adaptation phase  
331 presented 25%, while the stabilization phase presented 35%.

332 The generation of biogas for the adaptation and stabilization phases were, on average,  
333 21.6 L and 24.4 L/d respectively.

334 Operating in semi-continuous mode obtained a HRT of 1 day, with the values obtained  
335 congruent with those described by Martín et al. (2010), who found an 84-90% level for the  
336 COD removal at a ORL of 1.20-3.67 gCOD/L\*d. When they increased the load to 4  
337 gCOD/L\*d, they observed a strong inhibition of COD. Meanwhile, the methane yield was  
338 0.27-0.29 LCH<sub>4</sub> at STP/gCOD<sub>adi</sub>. In contrast with this study, Martín et al. (2010) undertook  
339 research with a HRT of 25 days under thermophilic conditions.

340 While the removal of COD<sub>T</sub> and VS, as well as the methane yield, are lower in the co-  
341 digestion in semi-continuous mode stage compared to the co-digestion in batch mode  
342 stage. The reactor can treat up to 220 L of SCW in 10 days, compared to the batch mode  
343 stage, in which 22 L was fed into the reactor in 30 days. This finding highlights the

344 adaptation of a specialized inoculum for the treatment of greater volumes of SCW in  
345 shorter time periods.

#### 346 **4. CONCLUSIONS**

347 The co-digestion of CM/SCW in batch mode yielded a  $COD_T$  removal of 58, 50 and 62%  
348 for the 90/10, 80/20 and 70/30 mixtures, respectively, while, for the  $COD_S$ , removals of 60,  
349 57 and 35% for each respective batch were achieved. In terms of TS, 53, 49 and 58%  
350 were removed, while, for VS, 49, 44 and 60% were removed for each batch. The  
351 maximum methane yield for each batch was 0.095, 0.337 and 0.331  $LCH_4$  at  
352  $STP/gCOD_{Trem}$ , obtaining accumulated volumes of biogas of 549.8, 601.1 and 466.7 L  
353 respectively.

354 Co-digestion in semi-continuous mode was able to remove between 24-29% of  $COD_T$   
355 and 25-35% of VS, generating 21.6-24.4 L/d of biogas with low residence times compared  
356 with traditional treatments.

357 Solid citrus waste presents characteristics that make it suitable for use in the generation  
358 of bioenergy. The elevated organic load of waste from the citrus industry could be removed  
359 through the use of anaerobic co-digestion with cattle manure, provided that care is taken  
360 with the parameters, such as the pH and concentration of the inoculum. This study was  
361 also able to enhance the synergic effect presented by cattle manure with solid citrus waste  
362 in the removal of organic material and the generation of biogas without observing any type  
363 of inhibition by d-limonene remnants, in that no pre-treatment was carried out to eliminate  
364 the oil from the SCW nor was necessary the addition of nutrients.

#### 365 **AKNOWLEDGEMENTS**

366 The authors are grateful for the support received by CONACyT and Tecnológico Nacional  
367 de México.

368

369

370

## 371 **REFERENCES**

372 Álvarez, R., Lidén, G. (2009). Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama,  
373 cow and sheep manure for improved methane production. *Biomass Bioenerg*, vol. 33, n.3,  
374 527-533.

375

376 APHA. (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 19<sup>th</sup> ed.  
377 (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution  
378 Control Federation). Washington D.C.

379

380 Brinkman J. (2008). Anaerobic digestion of mixed waste slurries from kitchens,  
381 slaughterhouses and meat processing industries. In *Proceedings of the II International*  
382 *symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste*. Barcelona (190-191).

383

384 Brown B.B., Yiridoe E.K., and Gordon R. (2007). Impact of single versus multiple policy  
385 options on the economic feasibility of biogas energy production: Swine and dairy  
386 operations in Nova Scotia. *Energ. Policy*, vol. 35, n. 9, 4597-4610.

387

388 Buffiere P., Frederic S., Marty B. and Delgenes, J. (2008). A comprehensive method for  
389 organic matter characterization in solid wastes in view of assessing their anaerobic

390 biodegradability. *Water Sci. Technol.*, vol. 58, n. 9, 1783-1788.

391

392 Cabbai V., Ballico M., Aneggi E. and Goi D. (2013). BMP tests of source selected OFMSW  
393 to evaluate anaerobic codigestion with sewage sludge. *Waste Manage.*, vol. 33, n. 7,  
394 1626–1632.

395

396 Cabbai V., De Bortoli N. and Goi D. (2016). Pilot plant experience on anaerobic  
397 codigestion of source selected OFMSW and sewage sludge. *Waste Manage.*, vol. 49, 47–  
398 54.

399

400 Calabrò P.S., Pontoni L., Porqueddu I., Greco R., Pirozzi F. and Malpei F. (2016). Effect of  
401 the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: Preliminary batch  
402 results. *Waste Manage.*, vol. 48, 440–447.

403

404 CIEMAT. (2007). Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y  
405 Tecnológicas. Energía de la Biomasa: Digestores Anaerobios. Instituto para la  
406 Diversificación y Ahorro de la Energía (IDEA). Madrid, España.

407

408 FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations). (2015). Production  
409 quantities by country. México. <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>

410

411 Khalid A., Arshad M., Anjum M., Mahmood T. and Dawson L. (2011). The anaerobic  
412 digestion of solid organic waste. *Waste Manage.*, vol. 31, 1737–1744.

413

414 Krich K., Augenstein D., Batmale J.P., Benemann J., Rutledge B. and Salour, D. (2005).

415 Biomethane from dairy waste: a sourcebook for the production and use of renewable  
416 natural gas in California. USDA Rural Development.

417

418 Lee D.H., Behera S.K., Kim J. and Park H.S. (2009). Methane production potential of  
419 leachate generated from Korean food waste recycling facilities: a lab scale study. *Waste*  
420 *Manage.*, vol. 29, 876–882.

421

422 Li Y., Park S.Y. and Zhu J. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production  
423 from organic waste. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, vol. 15, 821–826.

424

425 Lobato-Fuertes A. (2012). Estudio de la codigestión anaerobia de residuos ganaderos con  
426 otros substratos agroindustriales. Tesis de Doctorado. Universidad de León, México.

427

428 Martín M.A., Siles J.A., Chica A.F. and Martín A. (2010). Biomethanization of orange peel  
429 waste. *Bioresource Technol.*, vol.101, 8993–8999.

430

431 Nasir I.M., Ghazi T.I.M., Omar R. and Idris A. (2013). Batch and semi-continuous biogas  
432 production from cattle manure. *International Journal of Engineering and Technology*, vol.  
433 10, n. 1, 16-21.

434

435 Nielfa A., Cano R., and Fdz-Polanco M. (2015). Theoretical methane production generated  
436 by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge.  
437 *Biotechnology Reports.*, vol. 5. 14–21.

438

439 Pourbafrani M., Forgács G., Horváth I.S., Niklasson C. and Taherzadeh, M.J. (2010).

440 Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource technol.*, vol.  
441 101, n. 11, 4246-4250.

442

443 Rezzadori K, Benedetti S and Amante E. (2012). Proposals for the residues recovery:  
444 Orange waste as raw material for new products. *Food and Bioprod. Process.*, vol. 90, n.  
445 106, 606-614.

446

447 Row J. and Neabel D. (2005). *Integrated Manure Utilization System Life-cycle Value*  
448 *Assessment*. Pembina Institute.

449

450 Ruiz F.A., Sagarnaga V.M.L., Salas G.J.M., Mariscal A.V., Estrella Q.H., González A.M.  
451 and Juárez Z.A. (2009). *Impacto del TLCAN en la cadena de valor de bovinos para*  
452 *carne*. Universidad Autónoma Chapingo, Enero, México.

453

454 SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2015). *Cierre de la*  
455 *producción agrícola por cultivo*. México. <[http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-](http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/)  
456 [agricola-por-cultivo/](http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/)>.

457

458 Surendra K.C., Takara D., Hashimoto A.G. and Khanal S.K. (2014). Biogas as a  
459 sustainable energy source for developing countries: Opportunities and challenges. *Renew.*  
460 *Sust. Energ. Rev.*, vol. 31, 846–859.

461

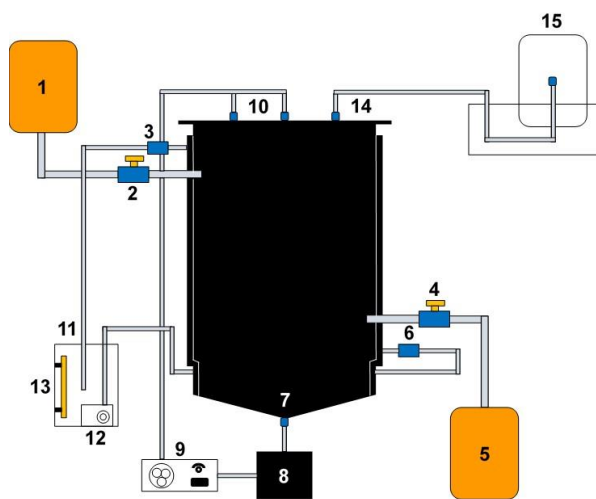
462 Ward A.J., Hobbs P.J., Holliman P.J. and Jones D.L. (2008). Optimization of the anaerobic  
463 digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.*, vol. 99, 7928–7940.

## Highlights

- Synergistic effect on co-digestion of cattle manure and solid citrus waste was verified
- D-limonene present in solid citrus waste has no inhibition effect on AD
- Semi-continuous operation for co-digestion process was carried out over short time periods



# Figure



1. Feed reservoir
2. Feed valve
3. Heating jacket valve (output)
4. Output valve
5. Biosolids collector
6. Heating jacket inlet valve
7. Recirculation output valve
8. Substrate collector for recirculation
9. Recirculation pump
10. Inlet ports and valves for recirculation
11. Heated water collector
12. Submersible pump for the recirculation of heated water
13. Automatic thermostat
14. Biogas output port and valve
15. Biogas collector

Figure 1. Anaerobic reactor for the co-digestion of SCW with CM.

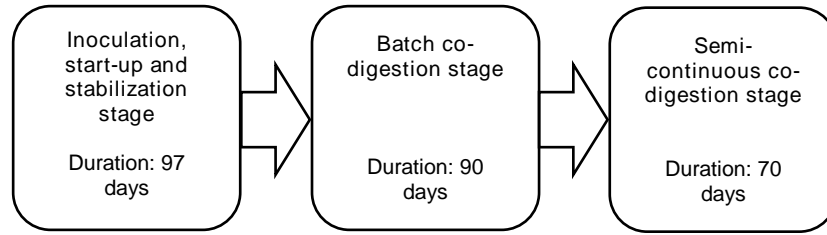


Figure 2. Experimental methodology.

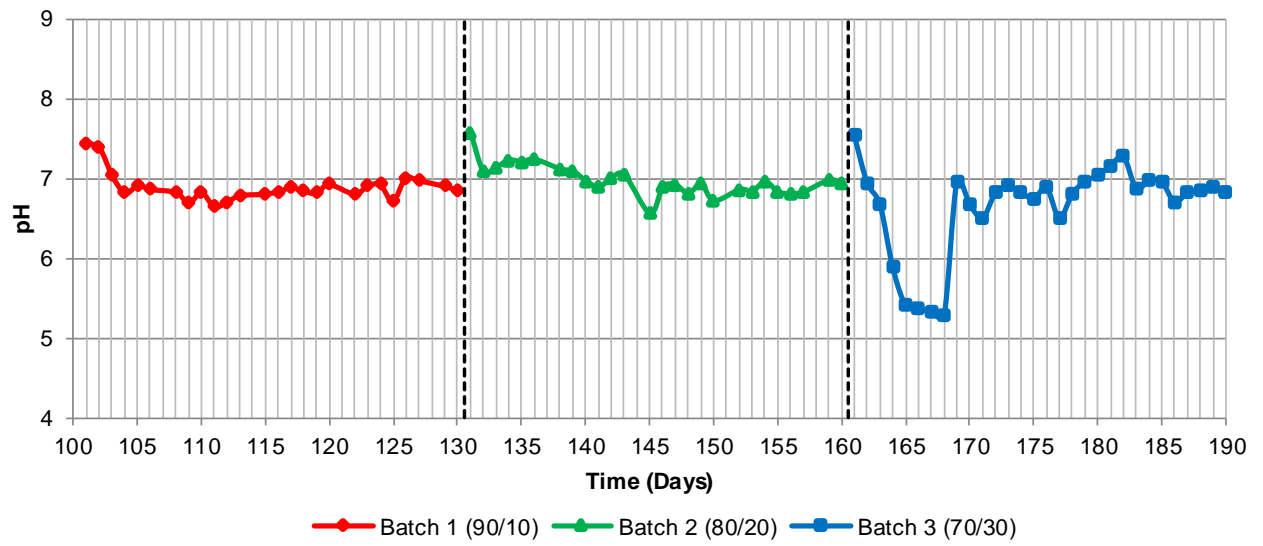


Figure 3. Behavior of pH during the co-digestion of SCW with CM.

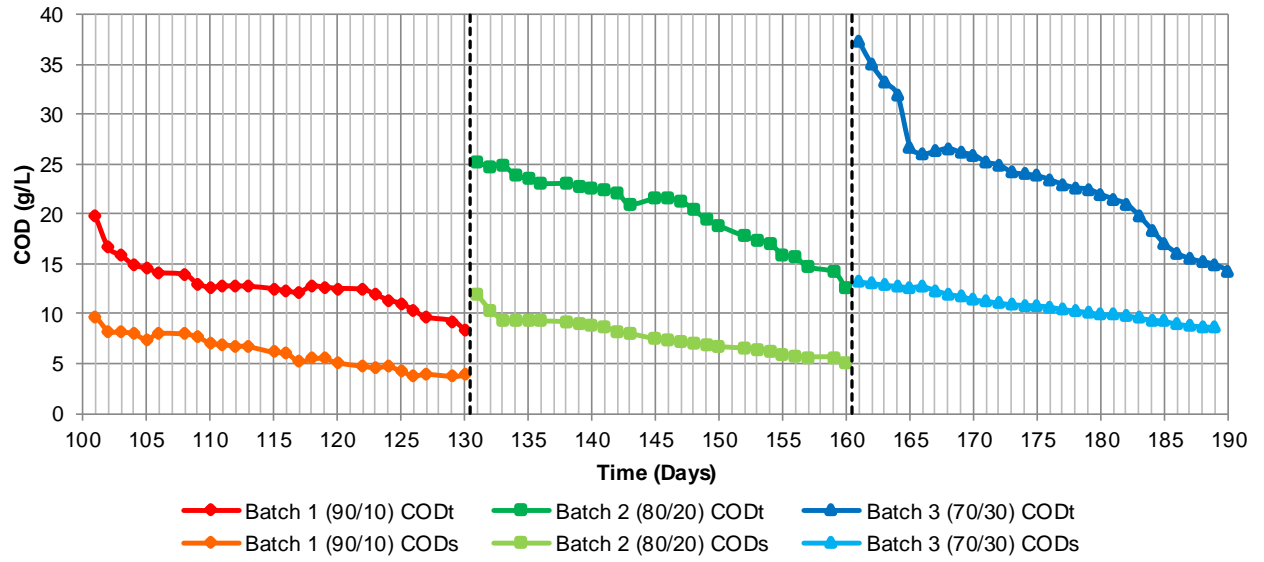


Figure 4. Behavior of the COD<sub>T</sub> and COD<sub>S</sub>.

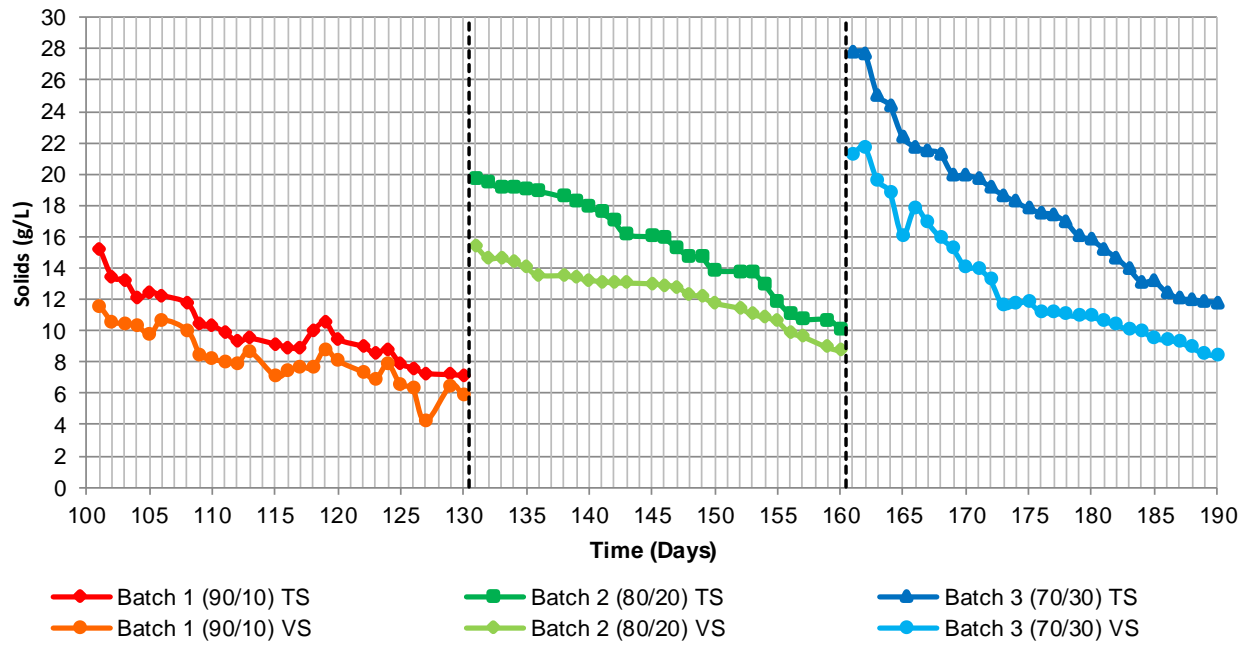


Figure 5. Degradation profiles for TS and VS during co-digestion in batch mode

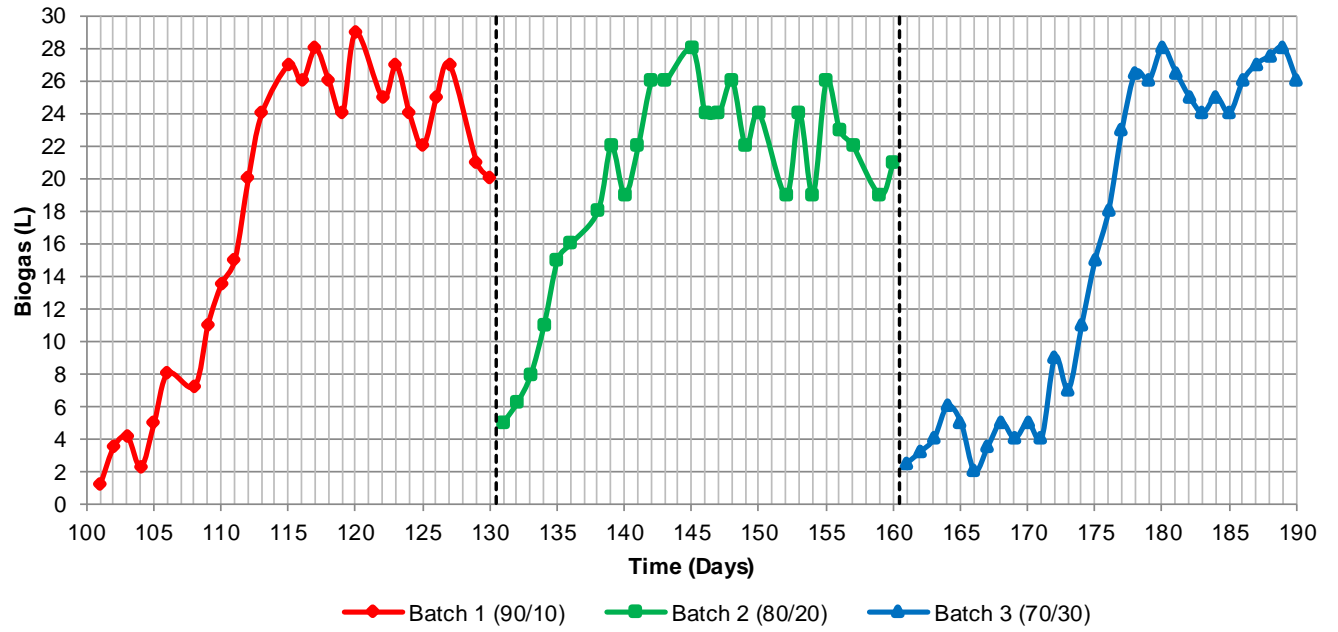


Figure 6. Biogas production in co-digestion stage in batch mode

# Figure

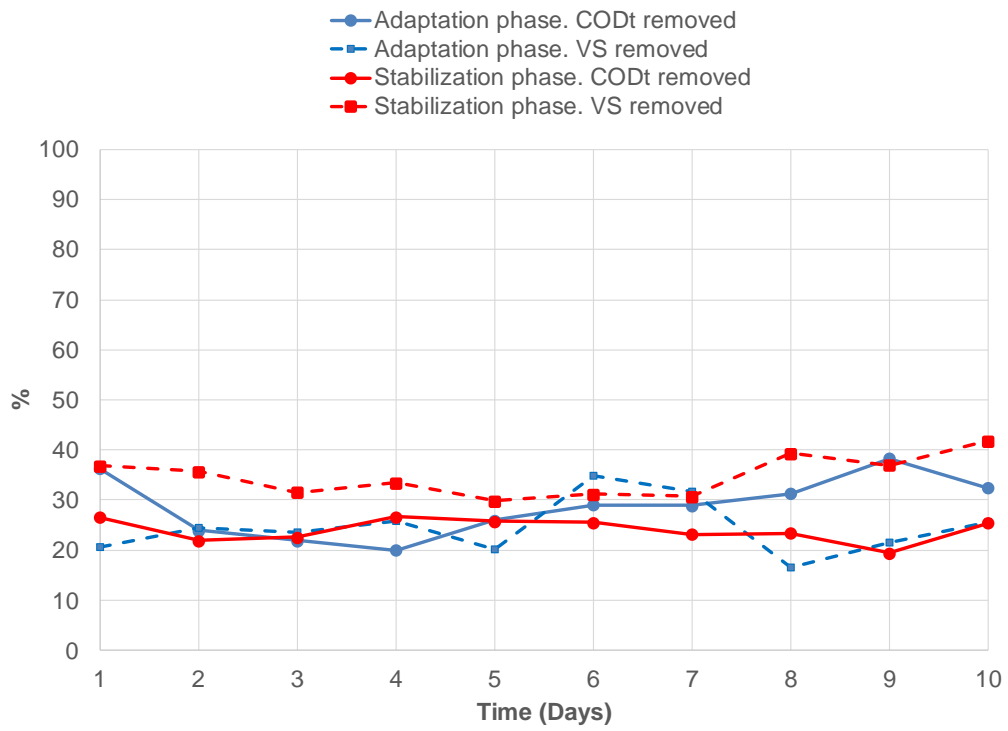


Figure 7. SCW feeding in semi-continuous mode in the adaptation and stabilization phases: % of COD<sub>T</sub> and VS removed.

Table 1. Characterization of CM and SCW.

Parameter	CM	SCW
Total COD (g/L)	7. 83	54. 11
Soluble COD (g/L)	4.22	32. 96
TS (g/L)	4.32	61. 22
VS (g/L)	3. 59	57.85
pH	7. 45	4. 46



Table 2. Anaerobic co-digestion of CM/SCW.

Batch	CM / SCW (%V / V)	CM remaining in the reactor (L)	Fresh SCW (L)	Batch duration (d)
1	90 / 10	198	22	30
2	80 / 20	176	44	30
3	70 / 30	154	66	30

Table 3. Evaluation of co-digestion over short time periods.

<b>Batch</b>	<b>Operation (Days)</b>	<b>SCW fed (L)</b>	<b>Initial COD<sub>T</sub> (g/L)</b>	<b>Final COD<sub>T</sub> (g/L)</b>	<b>Removed COD<sub>T</sub> (%)</b>	<b>Initial VS (g/L)</b>	<b>Final VS (g/L)</b>	<b>Removed SV (%)</b>
<b>1</b>	5	44	13.58	9.57	29.51	11.98	6.23	48.01
<b>2</b>	10	44	12.17	6.39	47.49	10.46	3.50	66.59
<b>3</b>	10	44	14.25	8.53	40.07	12.96	4.34	66.54
<b>4</b>	10	44	17.86	15.78	11.64	10.01	8.45	15.52

# *Anaerobic digestion of citrus industry effluents using an Anaerobic Hybrid Reactor*

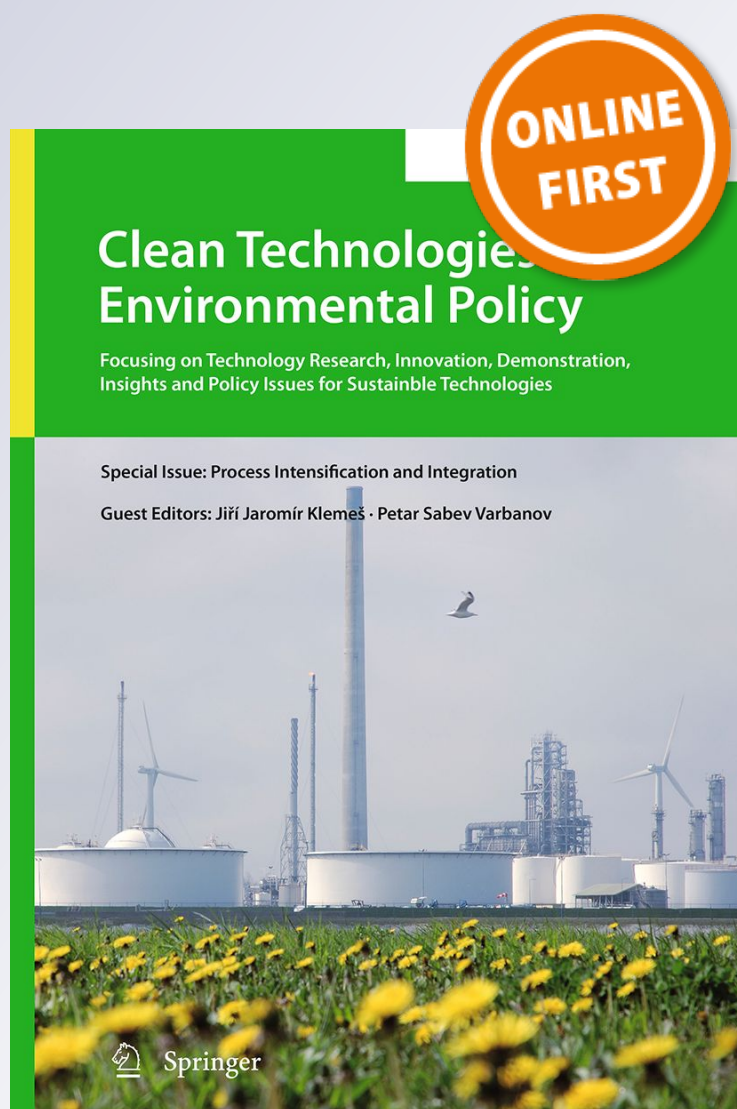
**E. S. Rosas-Mendoza, J. M. Méndez-Contreras, A. Martínez-Sibaja, N. A. Vallejo-Cantú & A. Lassman-Alvarado**

**Clean Technologies and Environmental Policy**

Focusing on Technology Research, Innovation, Demonstration, Insights and Policy Issues for Sustainable Technologies

ISSN 1618-954X

Clean Techn Environ Policy  
DOI 10.1007/s10098-017-1483-1



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# Anaerobic digestion of citrus industry effluents using an Anaerobic Hybrid Reactor

E. S. Rosas-Mendoza<sup>1</sup> · J. M. Méndez-Contreras<sup>1</sup> · A. Martínez-Sibaja<sup>1</sup> · N. A. Vallejo-Cantú<sup>1</sup> · A. Lassman-Alvarado<sup>1</sup>

Received: 9 May 2017 / Accepted: 26 December 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

## Abstract

Mexico is one of the main citrus producers, ranking fourth in the world with approximately 7.4 million tons per year, with oranges contributing 4.08 million tons to that total. The effluents from the citrus industry have high loadings of organic matter and low pH levels. These effluents also are suitable for treatment by anaerobic digestion to reduce the organic matter and to obtain a value-added product, such as biogas. The aim of this work was to perform the anaerobic digestion of effluents from the citrus industry by using a high-rate reactor, evaluating the biogas production and use as an alternative energy source. An Anaerobic Hybrid Reactor (AHR) was used to treat the effluent from a citrus processing plant in Martínez de la Torre, Veracruz, Mexico. The AHR was operated at an organic loading rate (OLR) of 8 gCOD<sub>T</sub>/Ld at steady state, obtaining a total and soluble COD removal of approximately 85%, with methane yields around 0.15 LCH<sub>4</sub> to STP/gCOD<sub>rem</sub>. An inhibitory effect was observed by the presence of D-limonene in the citrus effluent, although no pretreatment was used for elimination of this essential oil, a decrease in the COD removal and methane yields was observed due to the higher OLR. An energy estimate was obtained with the biogas, and it was found that up to 2.2% of the electricity required for the operation of a citrus processing plant can be generated using anaerobic treatment.

**Keywords** Anaerobic Hybrid Reactor · Anaerobic digestion · High-rate reactor · Citrus industry · Biogas

## Introduction

Citrus crops are among the most abundant crops in the world (Torquato et al. 2017). Citrus cultivation, primarily oranges, is a major industry and a significant economic sector in the USA, Brazil, China, Mexico, India, Iran, as well as in most Mediterranean countries, including Spain and Greece (Martín et al. 2010a; Viuda-Martos et al. 2011). México is one of the main citrus producers, ranking fourth in the world with approximately 7.4 million tons per year of which oranges account for 4.08 million tons (SIAP 2015). For México, citrus cultivation is an important activity within the national fruit-growing sector. The planted area is over 563,000 hectares, the productive geography is well defined, and 91% of total citrus production is concentrated in only ten states (SIAP 2015). The State of Veracruz is the main producer of

citrus fruit, accounting for 47% of the total Mexican production of citrus crops and 49% of the national orange production (SIAP 2015). Due to the processing of these products, large volumes of peel waste and effluents are discarded, and their inadequate treatment and final disposal cause physicochemical changes in the soil and in bodies of water. The characterization of these wastes has been reported, and it was indicated that orange peel waste consists of peels, seeds, and membrane residues (Wilkins et al. 2007). These waste materials contain water (75–85% w/w on average), monosaccharides and disaccharides (glucose, fructose, and sucrose; 6–8% w/w on average), polysaccharides (pectin, cellulose, and hemicellulose; 1.5–3% w/w on average). These materials are characterized by very low pH values (3–5) and a significant presence of essential oil that is composed mainly of D-limonene (83–97% w/w) (Bicas et al. 2008). Thus, in the processing of oranges, highly polluted effluents are produced in two different processes, i.e.:

1. The pressing of the peels, which produces highly contaminated wastewater due to the high concentration of organic matter and high alkalinity (due to the use

✉ A. Lassman-Alvarado  
lassman@prodigy.net.mx

<sup>1</sup> División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Orizaba, Av. Oriente 9, 852. Col. Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, Mexico

of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  as a binder in the pressing process. Thus, the waste products from pressing the peels have the following characteristics, i.e.,  $\text{pH} = 11.21$ , alkalinity =  $8360 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ ,  $\text{COD}_T = 147,680 \text{ mg/L}$ ,  $\text{COD}_S = 140,300 \text{ mg/L}$ ,  $\text{TOC} = 52,970 \text{ mg/L}$ ,  $\text{TS} = 151,900 \text{ mg/L}$ ,  $\text{VS} = 137,740 \text{ mg/L}$  (Martín et al. 2010b).

2. The reuse of a by-product of the citrus fruit processing generates additional orange juice wastewater that has the following characteristics, i.e.,  $\text{pH} = 4.56 \pm 0.02$ ,  $^\circ\text{Brix} = 7.16 \pm 0.02$ , glucose =  $198 \text{ g/L}$ , fructose =  $130 \text{ g/L}$ , sucrose =  $10 \text{ g/L}$ , succinic acid =  $2.4 \text{ g/L}$ , and citric acid =  $1.7 \text{ g/L}$  (Viuda-Martos et al. 2011).

The residues mentioned above must be processed properly to prevent problems related to the disposal of these products and to alleviate environmental concerns. Until relatively recently, there has been no satisfactory means of disposal other than dumping the waste on land adjacent to the production sites (Martín et al. 2010a; Calabrò et al. 2016).

The impacts of the pollution resulting from solid and liquid citrus waste can be compared to the impacts caused using agrochemicals. The increased use of pesticides and synthetic fertilizers in intensive agriculture has adversely affected the safety of food and the environment (Arellano-Aguilar et al. 2017), and the agricultural use of fertilizer is expected to increase even further in the future (Kidd et al. 2017). According to the Global Environment Facility, the greatest threat to aquatic systems is chemical contamination. The intensive use of agrochemicals has polluted water bodies and sediments. Agrochemical pollution could significantly affect other economic activities, such as fisheries, and it could have serious consequences for humans and the environment (Arellano-Aguilar et al. 2017). Rivers that are adjacent to land that is used for agriculture are subject to water pollution, and some of the physicochemical parameters of such rivers based on the extent of nearby agricultural activities are as follows, i.e., temperatures of the water ranged from  $31$  to  $34 \text{ }^\circ\text{C}$ , the dissolved oxygen levels were in the range of  $4$ – $5 \text{ mg/L}$ , and the  $\text{pH}$  was between  $6.6$  and  $7.2$  (Arellano-Aguilar et al. 2017). For the soils used for agriculture, the inputs of farmyard manure increased the organic carbon content, the yields of hay, and the availability of nutrients. The manure also acted as a buffer against soil acidification ( $> \text{pH} 5$ ). In contrast, N-containing inorganic fertilizers strongly acidified the soil ( $< \text{pH} 4.5$ ) and increased the organic carbon in the surface soil by increasing the carbon stored in the coarse and fine fractions. Application of nitrogen fertilizers also reduced the numbers of different plant species and increased the abundance of forbs and legumes (Kidd et al. 2017).

According to the data obtained, a citrus processing plant located in the northern part of the State of Veracruz discards between  $0.79$  and  $1.25 \text{ m}^3$  of industrial effluents for each ton of oranges processed (personal communication). Other researchers have reported values of  $1.58$ – $3 \text{ m}^3$  of wastewater generated for each ton of fruit processed (Koppar and Pullamannappallil 2013; Antonio-Quaia 2011). These volumes depend on the operating conditions of each plant. Since water is absolutely necessary for life, its availability has been vitally important in the development of all civilizations (Yannopoulos et al. 2015). Considering the limited supply of renewable water resources, the role of macroeconomic policies in changes in land use and irrigation is vital and undeniable (Valipour 2016). The only way to maintain sustainable development is to use past experiences in establishing land use policies and managing the use of water for agricultural purposes (Valipour 2015). The citrus industry presents serious social problems due to the generation of bad odors and the attraction of animal vectors associated with the large volumes of wastewater that are generated. Consequently, this industry has incurred economic problems, including government penalties, because of its negative impacts on the soil and on bodies of water.

There are several current trends in the treatment of waste materials that are rich in lignocellulosic compounds. For example, some of the well-known treatment methods are (1) the use of pyrolysis to convert fermentation residues into biochar, which can be used in the production of crops, (2) water treatment, and (3) many others; however, manufacturing costs prevent the expansion of these processes to the commercial scale (Maroušek 2014b) or their use in the production of solid biofuels (carbon powder). This is unfortunate in that the new products that are obtained outperform many of the conventional solid biofuels in both their technological and environmental indicators as well as from an economic perspective (Maroušek et al. 2015). However, due to their physicochemical characteristics, these effluents can be treated by anaerobic digestion to reduce their organic loads in addition to obtaining a product with added value, such as biogas. Anaerobic digestion can be defined as the biological conversion of organic matter into a variety of products, including biogas (Nutiu 2014). The composition of the biogas varies depending on the substrate that is being degraded. In general, biogas contains  $50$ – $75\%$   $\text{CH}_4$  and  $25$ – $50\%$   $\text{CO}_2$  along with other components, such as water vapor ( $\text{H}_2\text{O}$ ), hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ), and ammonia ( $\text{NH}_3$ ). Methane is the only compound in biogas that contributes usable energy (Surendra et al. 2014). In order to properly conduct the anaerobic digestion process, various parameters must be carefully controlled, such as temperature,  $\text{pH}$ , the concentration of the substrate, the concentration of nutrients, and the concentration of toxic compounds, such as D-limonene (García-Gonzalo et al. 2013).

Some researchers have used anaerobic reactors to manage high loadings of organic materials. Alvarado-Lassman et al. (2008) used an inverse biofilm fluidized bed reactor to degrade wastewater from a brewery that had organic loading rates (OLRs) greater than 70 gCOD/Ld, and they obtained COD removals greater than 90% with methane yields of 0.3 LCH<sub>4</sub> at STP/gCOD<sub>rem</sub>. Rico et al. (2015) treated whey and the liquid fraction of cow manure in an upflow reactor at an OLR of 28.7 gCOD/Ld, achieving 95.1% removals of COD and methane yields of 0.34 LCH<sub>4</sub> at STP/gCOD<sub>rem</sub>. In addition, some other researchers have reported the anaerobic treatment of both liquid and solid citrus waste, for example, Siles et al. (2007), who performed the anaerobic digestion of wastewater from the pressing of orange peels, producing a methane yield of 295 mLCH<sub>4</sub> at STP/gCOD was produced, and pretreatment was used to remove D-limonene from the wastewater. Martín et al. (2010a) performed biomethanization using orange peels by eliminating D-limonene by pretreatment, and they obtained 0.27–0.29 LCH<sub>4</sub> at STP/gCOD. Calabrò et al. (2016) obtained 370 LCH<sub>4</sub> at STP/kgSV under mesophilic conditions in the biomethanization of orange peels using different concentrations of D-limonene. Citrus essential oil can inhibit anaerobic digestion, as observed in several studies of the inhibitory effect of D-limonene (the major component of citrus essential oil) on the anaerobic digestion of citrus waste (Ruiz and Flotats 2016). The content of essential oils in oranges (with reference to the whole fresh fruit) is in the range 0.3–0.8% w/w (Martín et al. 2010a; Kesterson and Braddock 1975) leading to a potential content in orange peel waste up to about 1.5% w/w. The anti-microbial mechanism (inhibition) associated with citrus essential oil is based on cell malfunction and lysis. Once citrus essential oil is dissolved in an aqueous medium, it accumulates in the membranes of the microorganisms and its structure changes. The fluidity of the membrane changes, becoming more and more permeable until leakage of the cells contents occurs (Bakkali et al. 2008). D-limonene is strongly toxic to fermentative bacteria, even at very low concentrations. D-limonene was found to be toxic to *Saccharomyces cerevisiae* at concentrations as low as about 0.025% (Boluda-Aguilar and López-Gómez 2013).

Some disadvantages of the former investigations of the anaerobic digestion of citrus effluents are (1) the use of energy to generate steam for use in the pretreatment of the wastewater to remove D-limonene, (2) having to work with organic loads less than 5 gCOD/Ld, (3) having to operate anaerobic reactors in semi-continuous and batch modes, which implies retention times greater than 24 h, and (4) having to use conventional anaerobic systems based on the use of suspended biomass. For these reasons, in this research our aim was to conduct the anaerobic digestion of effluents from the citrus industry by using a high-load reactor for the production and use of biogas as an alternative energy

source. The contribution of this work consists of a novel device that we called an Anaerobic Hybrid Reactor, which is a biofilm system that consists of a fixed bed and a fluidized bed. The configuration of the reactor allows handling high organic loads, and, due to the presence of the biofilm, the inhibitory effect of D-limonene can be minimized to avoid pretreating the effluent before disposal. These results of this work provided a viable alternative for the minimization of the ecological, economic, and social impacts caused by effluents from the citrus industry.

## Materials and methods

### Experimental device

The reactor we used was an Anaerobic Hybrid Reactor (AHR) that consisted of two sections. Figure 1 shows that the upper part was a Fixed Bed (FB) reactor and that the lower part was an Inverse Fluidized Bed (IFB). This is a new configuration that allows the treatment of effluents with high organic loads. The FB was used to achieve a better distribution of the wastewater flow, to retain suspended solids, and to assist in the degradation of organic matter in the biofilm formed in the support material. The FB consisted of an acrylic tube with a length of 23 cm and a nominal diameter of 7.62 cm (3 inches) with a total volume of 1.05 L (working volume = 0.26 L). The FB contained 330 polymer tubes as the support medium with an average length of 2.76 cm, and they were covered by acrylic enamel to improve the adhesion of bacteria. The IFB was an acrylic tube that was 80 cm long and had a nominal diameter of 8.89 cm (3.5 inches) with a total volume of 4.96 L, which consisted of the working volume (2.53 L), the volume of the biogas chamber (0.93 L), and the volume of the support media (1.5 L). The support media were called Extendsphere™ (manufactured by Potters Hollow Spheres), and they had an average diameter of 170 μm, a surface specific area of 20,000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>, and density of 0.69 kg/m<sup>3</sup>. The total working volume of the AHR was 2.76 L. The inverse fluidized bed section, unlike the operation of traditional fluidized systems, had an influent pump located at the top of the reactor that fed the wastewater to the reactor, and the support media, which had a density lower than that of the wastewater, floated in the wastewater. A recirculation pump was used to fluidize the particles, thereby promoting greater contact between the bacterial biofilm and the organic matter present in the wastewater. The separation of the streams into the recirculation valve and the output valve was achieved by the suction of the recirculation pump and by gravity in the effluent. The influent and recirculation flows that fed the AHR were joined by a T connection, through discharge pressure of the two pumps. Other researchers have used physical and chemical methods

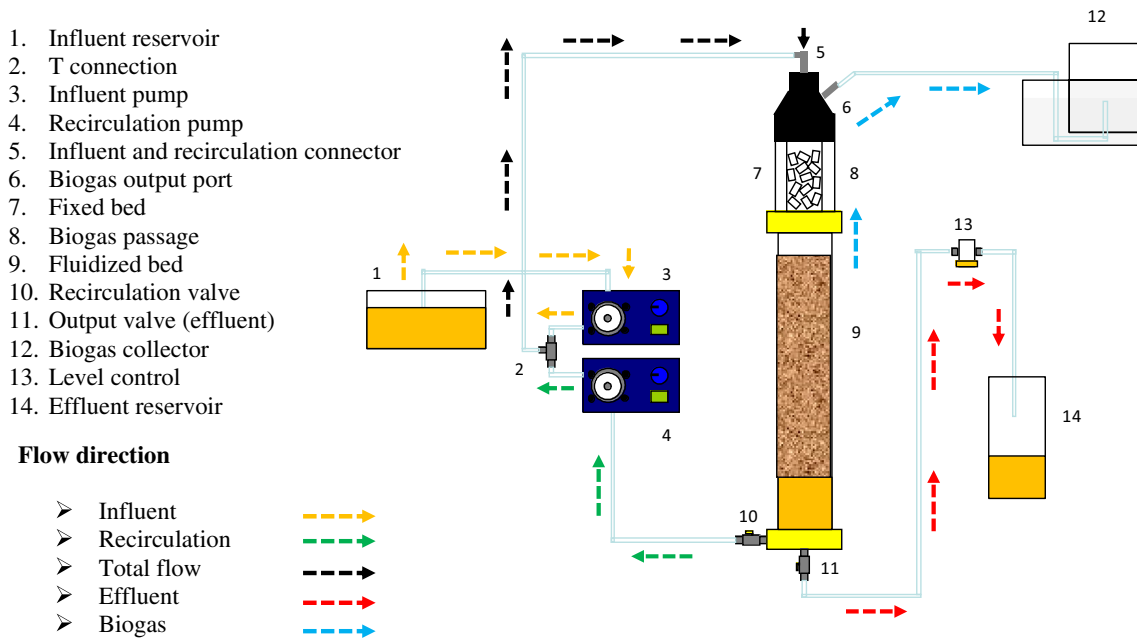


Fig. 1 Components of the Anaerobic Hybrid Reactor

to perform phase separation and improve the anaerobic fermentation process, such as the removal of hardly fermentable ballast from the maize silage to accelerate biogas production. This technology consisted of maceration under hot water followed by decantation and the double-screw press to separate the most labile pools of carbon from the ballast organic matter (Maroušek 2013b). The two-fraction anaerobic fermentation of grass waste, a new method consisting of hot maceration, an upflow anaerobic sludge blanket reactor, steam explosion, horizontally stirred batch anaerobic fermenters, and a charcoal kiln, all of which operate on the waste heat from a co-generation unit, was investigated on a commercial scale (Maroušek 2013c). The new method had a biotechnological partition of the grass silage to streamline its complex energy utilization, and it was confirmed that the separation of the accessible organic matter from the ballast enabled the minimization of the dimensions of the anaerobic fermenter from thousands to tens of cubic meters, and it reduced the retention time from months to hours (Maroušek 2014a).

The biogas produced in the IFB was conducted upward until it passed through the external part of the concentric acrylic tube of the FB and finally entered the biogas container.

The AHR was kept at  $35 \pm 2$  °C (mesophilic temperature) in a temperature-controlled room during the operational period. A level control system was installed to stabilize the level of the IFB because of its tendency to move up and down, depending on the pressure generated inside the reactor. Two Masterflex Cole-Parmer peristaltic pumps were

used for feeding and recirculating the wastewater (influent pump, serial number: D99005549; recirculation pump, serial number: D99005552).

### Substrate

Two types of substrate were characterized as shown in Table 1. The hydrolyzed effluents of the fruits and vegetables, i.e., the organic solid wastes, were obtained from three markets in Orizaba, Veracruz, Mexico. The waste materials were reduced in size and crushed to form a semisolid paste, and the liquid portion was separated and subsequently filtered to obtain the raw liquid fraction. This fraction was fed to a pilot-scale hydrolysis reactor, located at the Instituto Tecnológico de Orizaba, to obtain the hydrolyzed effluent from the fruits and vegetables. The citrus effluent was a

Table 1 Characterization of the two types of effluents used as the substrate

Parameter	Units	Fruits and vegetables hydrolyzed effluent		Citrus effluent	
		Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation
Total COD	mg/L	14,799	2032	38,780	2502
Soluble COD	mg/L	12,506	1798	35,420	1299
TS	mg/L	6390	885	21,662	114
VS	mg/L	4103	840	19,233	363
pH		6.78	0.21	3.88	0.10



**Table 2** Operating stages of the AHR

Stage	Operational days	OLR (gCOD/Ld)	Substrate
1	1–78	5	Fruits and vegetables hydrolyzed effluent
2	79–88	10	Fruits and vegetables hydrolyzed effluent
3	89–108	10	Citrus effluent
4	109–158	8	Citrus effluent

combined substrate of wastewater derived from the pressing of orange peels and wastewater from the processing of oranges to make juice. The citrus processing plant was located in the municipality of Martínez de la Torre, Veracruz, México.

For the start-up and conditioning stage, we used the hydrolyzed effluent from the fruits and vegetables. The citrus effluent from a citrus processing plant was used for the steady-state stage, as shown in Table 2.

Once per week, we collected 18–20 L each of two types of effluents, i.e., the effluent from a pilot-scale hydrolysis reactor and the effluent from the citrus industry were preserved at 4 °C. The effluents were used as input to the AHR every day, and 30 mL of sample were collected before and after the effluents were treated in the AHR. The samples were analyzed every day.

### Continuous mode operation

The AHR was operated in four stages until stable conditions were reached, as indicated in Table 2.

**Stage 1. Inoculation, start-up, and conditioning** The inoculum we used consisted of 300 mL of colonized Extensosphere™ support, which was extracted from an IFB that was treating diluted apple juice. The total attached biomass was 13.98 gVS/L, and it was used to inoculate the 1200 mL of uncolonized Extensosphere™ that were placed inside the IFB. At the same time, the bacteria present in the recirculating wastewater progressively colonized the support media of the FB reactor, because the biomass was conditioned to degrade diluted apple juice, a similar substrate based on fruits and vegetables. This effluent was used to feed the AHR from day 1 to day 78, and the inlet pH was controlled between 6.6 and 7.7 with a solution of 3 M NaOH. No nutrients were added because the liquid fraction that was extracted from the fruits and vegetables was an excellent source of carbon that was enriched with macronutrients and micronutrients. An OLR of 5 gCOD/Ld was maintained.

**Stage 2. Increasing the Organic Loading Rate** The operating conditions were maintained as in the previous stage, but the OLR was increased from 5 to 10 gCOD/Ld from day 79 to day 88 of operation.

**Stage 3. Stabilization:** The hydrolyzed effluent from the fruits and vegetables was replaced by the citrus effluent, which was supplemented with macronutrients and micronutrients with the ratio COD/N/P of 350/7/1 (Gerardi 2003). This substrate is more difficult to treat by anaerobic digestion, and Table 3 provides nutrients composition. The pH of the influent was regulated between 6.8 and 7.2 with sodium bicarbonate, and the OLR remained constant at 10 gCOD/Ld from day 89 through day 108.

**Stage 4. Adjustment of the OLR** The OLR was adjusted from 10 to 8 gCOD/Ld, due to an initial stabilization period in which the COD removal and methane yields decreased.

### Analytical methods

In this research, pH was monitored in the influent and in the effluent, as were total COD (COD<sub>T</sub>), soluble COD (COD<sub>S</sub>), Total Solids (TS), and Volatile Solids (VS) to evaluate the removal percentages of these parameters.

The pH was measured with an Orion Model 250A potentiometer. COD<sub>T</sub> and COD<sub>S</sub> were determined by the colorimetric method (APHA 1995). Samples were analyzed on a HACH spectrophotometer at 620 nm. TS and VS were determined by the gravimetric method (APHA 1995) using a Riossa oven and a Barnstead/Themolyne muffle. Similarly, the amounts of biomass present in the FB and in the IFB were determined as VS, according to common laboratory practices.

The composition of the biogas was measured on a Buck 310 gas chromatograph equipped with an All Tech CRT I packed column that was 6 in long and had a diameter of 0.25 in, and it detected CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, and N<sub>2</sub>. A 2-mL sample was injected directly into the packed column. The operating conditions were as follows: Helium at 70 psi was used as the carrier gas, the temperature of the column was 36 °C, and the temperature of the detector was 121 °C.

**Table 3** Compositions of the macronutrients and micronutrients

Mineral salts (macronutrients)	NH <sub>4</sub> Cl	12,607 mg/L
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1500 mg/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	900 mg/L
Oligoelements (micronutrients)	FeCl <sub>2</sub>	0.5 mg/L
	CaCl <sub>2</sub>	0.5 mg/L
	KCl	0.5 mg/L
	CoCl <sub>2</sub>	0.1 mg/L

## Energy analysis

In addition to offering an alternative for the treatment of effluents from the citrus industry, we studied the possibility of using the biogas generated during the anaerobic digestion process that was used in the citrus plant. The energy content of the biogas was converted into electricity to establish a case study. To calculate the volume of methane generated at standard temperature and pressure, the following reasoning was used:

1. The processing plant discards a total volume per day based on 12.8 L/s.
2. COD<sub>T</sub>, percentages of COD<sub>T</sub> removal, and methane yields were obtained experimentally by operating the AHR for 70 days.
3. Of the total COD<sub>T</sub> removed, 90% is converted into biogas.

Subsequently, the electricity that can be obtained from methane was calculated using the heating power of 9.94 kWh/m<sup>3</sup> of methane at standard temperature and pressure (Muylaert et al. 2000). In addition, the conversion efficiency of 30% for a commercial biogas electric generator was used. The electricity produced represents a savings of \$0.08/kWh (CFE 2017) based on the cost of electricity provided by the Federal Electricity Commission.

## Evaluation of Net Present Value (NPV)

To estimate the NPV (Eq. 1), the total initial investment ( $C_o$ ) was \$683,805, which includes the purchase of the main

equipment and the auxiliary equipment of the AHR, and the net cash inflow was used as the basis for calculating the maximum available electricity, which was 3181 kWh (in the energy analysis), which corresponded to \$258. Based on these data, if the system were to operate for 1 year, \$94,272 would be made available based on an inflation rate in Mexico of 6.31% from June 2016 to June 2017 (INEGI 2017) and a period ( $t$ ) of 10 years.

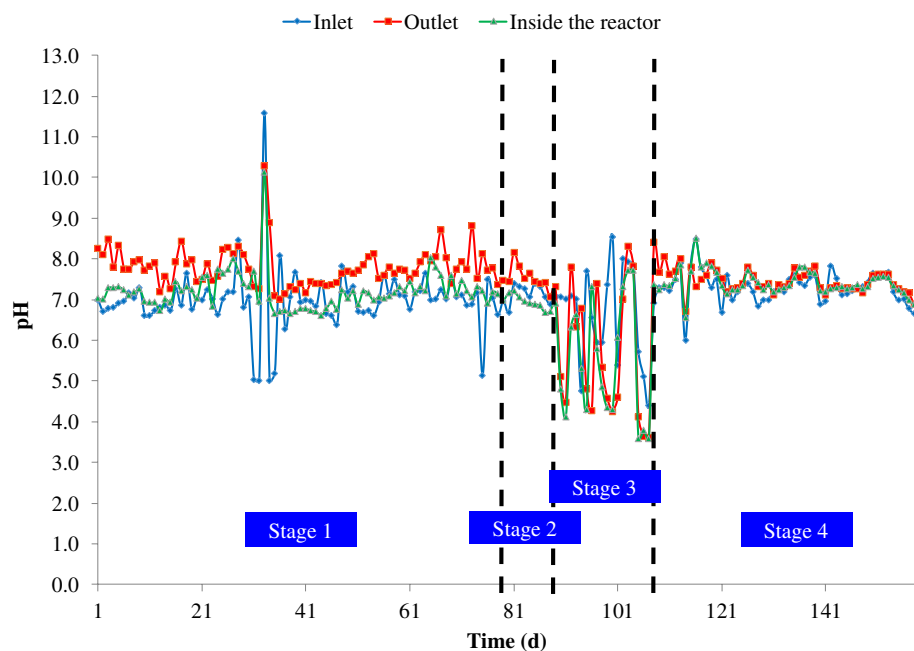
$$NPV = -C_o + \sum_{t=1}^{10} \frac{C_t}{(1+i)^t} \quad (1)$$

## Results and discussion

### Continuous mode operation

During the operation of the AHR, two different types of substrates were treated, i.e., the hydrolyzed effluent from fruits and vegetables and the citrus effluent. The medium was not acidified in either case, with the exception of the third stage, where the average outlet pH was  $5.80 \pm 1.62$  on average, as shown in Fig. 2, which coincided with the change of the substrate. However, in stage 4, we noticed that, when the organic loading rate decreased from 10 to 8 gCOD/Ld, stability was recovered, and the outlet pH values essentially neutral ( $7.45 \pm 0.27$ ). Hussain and Kant (2017) found that the biochemical potential for methane generation was higher at pH values between 7 and 7.8, and they noted that some inhibition of methanogenic activity occurred in the pH range of 6.0–6.5. Lee et al. (2009) reported that methanogenesis occurs efficiently at pH values between 6.5 and 8.2.

**Fig. 2** pH trends during the operation of the AHR



It was observed that the use of sodium bicarbonate helps to maintain homogeneous pH values during the anaerobic digestion process with citrus effluents, since, when sodium hydroxide was used, the effluent tended to change color, the components tended to agglomerate, and the medium was acidic causing the increased use of this chemical.

An average total quantity of 7800 mg/L of COD was fed to the AHR, with approximately 5200 mg/L of that total in soluble form. The  $COD_T$  and  $COD_S$  removals varied between 20 and 30% during the first 19 days, due to the inoculation being 25% v/v of colonized support and 75% v/v of uncolonized support. For stage 2, the COD removal efficiency increased to approximately 95%. After the operation of the AHR was stabilized, the substrate was changed from the hydrolyzed effluent of fruits and vegetables to the citrus effluent. The average  $COD_T$  and  $COD_S$  concentrations in the feed were about 12,400 and 9300, mg/L, respectively. Figure 3 shows that the COD removal decreased from 95 to 70%. Thus, the OLR was reduced from 10 to 8 gCOD/Ld, feeding on average  $COD_T$  concentration of about 9700 mg/L and an average  $COD_S$  concentration of about 8200 mg/L. It was observed that the bacterial flora were affected by the concentration of the substrate during the first 20 days of stage 4, but there was a recovery in the removal of COD, and the removal efficiency reached values between 75 and 85%.

Siles et al. (2007) reported an 88.2% removal efficiency of total organic carbon in batch tests between 48 and 72 h, but the reported inhibitory effects were due to the concentration of the substrate, not to the presence of D-limonene because they had used pretreatment to eliminate this essential oil to avoid its toxic effects. The results reported in this research were similar to those reported by Siles et al. (2007) since, when we treated the citrus effluents, the COD removal percentages were high due to the absence of the

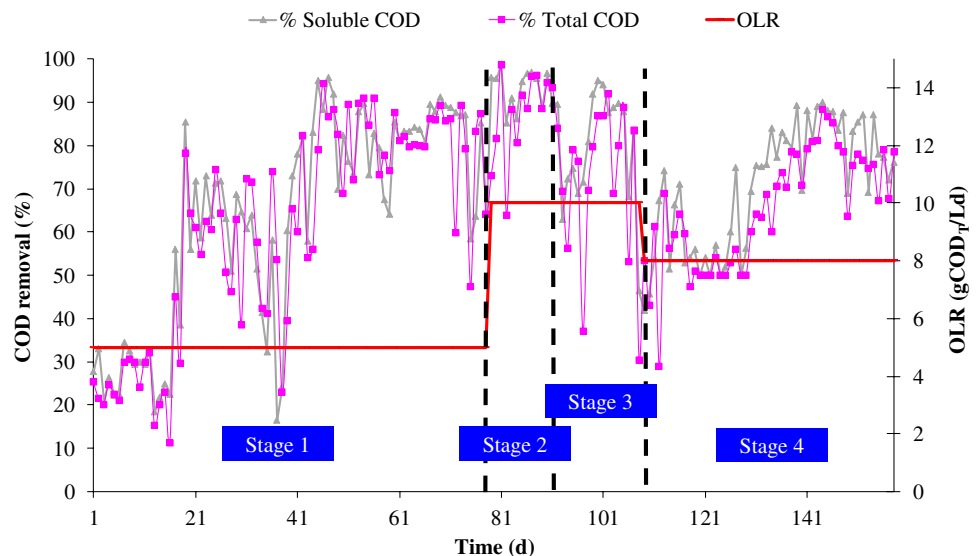
remaining D-limonene in the effluent and due to the fact that we operated the AHR in the continuous mode. In this work, the nutrient supply was provided with COD/N/P ratios of = 350/7/1, because our aim was to provide the nutrients necessary to support the metabolism of the microorganisms involved in the process. However, using other residues, Maroušek et al. (2014) found that neither of the conventional methods of nutrient management, i.e., TOC/TN and TC/TN, was sufficient for use with the advanced methods of processing phytomass residues. The explanation for this is that the advanced methods of phytomass utilization disintegrate lignocellulose to a high degree, thereby altering the availability of key nutrients.

The contents of TS and VS in the effluent were about 8700 and 6900 mg/L, respectively, in stage 3, but in stage 4, they were about 6200 and 4100 mg/L, respectively. This indicates that about 49% of TS and 68% of VS were removed in step 3, while in stage 4, 42 and 53% were removed, respectively.

Some residues from agrochemicals, such as fertilizers, contain nutrients, such as N, P, and K, and the N is in the form of ammonium sulfate ( $(NH_4)_2SO_4$ ) (Kidd et al. 2017). Ammonium ions ( $NH_4^+$ ) and free ammonia ( $NH_3$ ) are the two principal forms of inorganic nitrogen. Both forms can directly and indirectly cause inhibition in an anaerobic digestion system (Yenigün and Demirel 2013).

A behavior similar to that of COD occurred for methane yields in the first days of stage 1, when the methane yields were nearly zero, because the COD removed was used for the generation of new cells. Michaud et al. (2002) obtained a methane yield equal to zero during the first 7 days of experimentation. From day 21 through day 41, methane yields ranging from 0.15 to 0.3  $LCH_4$  to  $STP/gCOD_{rem}$  were achieved. In stage 3, the methane yields decreased from 0.3

**Fig. 3** Removal efficiencies of total and soluble COD



to 0.05 LCH<sub>4</sub> to STP/gCOD<sub>rem</sub>, and this indicated that the presence of D-limonene in the citrus effluent could have had an inhibitory effect. In stage 4, when OLR was adjusted, the methane yields recovered somewhat, with values close to 0.15 LCH<sub>4</sub> to STP/gCOD<sub>rem</sub>, as shown in Fig. 4.

These results were in agreement with the results of other researchers, since they report similar values, but their results were based on a higher hydraulic retention time and a lower OLR. Calabrò et al. (2016) reported a decrease in the generation of biogas (measured as methane yield) similar to that of our stage 3, except that the substrate we used was orange peels degraded in batch mode under mesophilic conditions with exposures to different doses of D-limonene. It was evident that the use of an orange-based substrate caused a decrease in methane yields.

Pretreatment also can be a useful way to improve the treatment of other residues that are rich in compounds that contain cellulose, hemicellulose, and lignocellulose. In fact, some pretreatment methods for enhancing the production of biogas from oat straw have been studied, such as hot maceration, steam explosion, and pressure shockwaves. The results of these studies showed that for cellulose, hemicellulose, and lignocellulose, the micropore areas were 9, 55, and 64 m<sup>2</sup>/g, respectively, the inhibitor formations were 0, 15, and 0 mL/L, respectively, and the overall methane yields were 67, 179, and 255 CH<sub>4</sub> VS/t, respectively. The pressure shockwaves are capable of high increases of the micropore area, and they can produce high methane yields without the formation of inhibitors (Maroušek 2013a). In the steam explosion of hay, the operational data indicated that one ton of dry matter of steam-exploded (pretreated) hay is equivalent to two tons of maize silage, which is used frequently (Maroušek 2012) and that enzymatic hydrolysis enhanced by pressure shockwaves opens new possibilities for the processing of *Jatropha Curcas* L. processing, because

more extensive hydrolysis of the lignocellulose increases the proportion of easily fermentable organic matter in the seed cakes, thereby increasing the methane yields. More extensive degradation of the labile organic matter during anaerobic fermentation results in greater recalcitrance of organic substances, such as crystalline cellulose and lignin, which increases the energy value of the charcoaled fermentation residue (Maroušek et al. 2013).

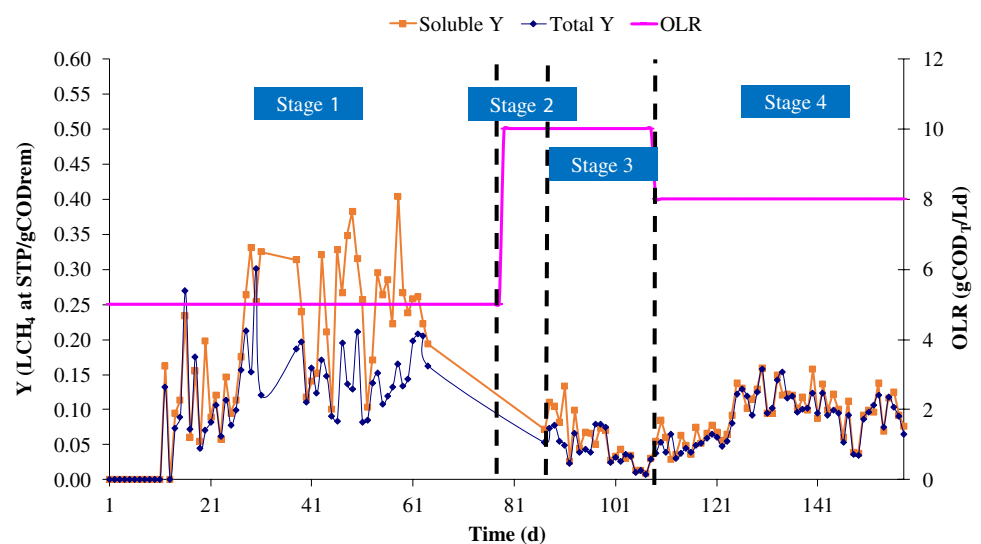
## Energy analysis

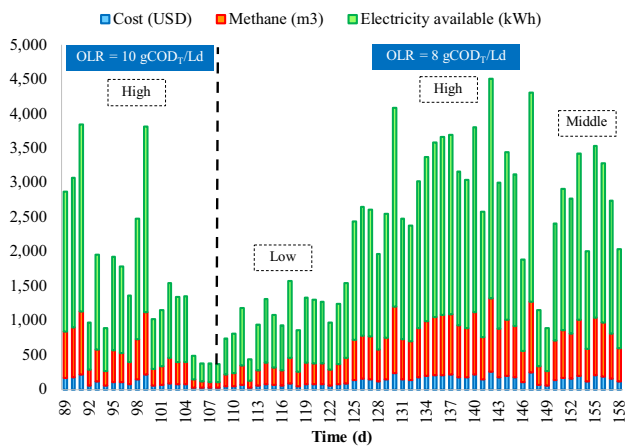
Fossil fuels, such as coal, oil, and natural gas, currently are the primary energy sources in the world (Yatim et al. 2016); however, the demand for alternative sources of energy, such as biogas, has been increasing in recent years (Nguyen et al. 2014).

The volumes of methane generated from the citrus effluent vary, and they depend on the stability of the system. Figure 5 shows that greater stability was achieved when the OLR was 8 gCOD<sub>T</sub>/Ld. Three trends (low, high, medium) indicated different volumes of methane produced, i.e., 322, 907, and 736 m<sup>3</sup>, but the average for 50 operational days was 549 m<sup>3</sup> of methane at STP per day. When the OLR was maintained at 10 gCOD<sub>T</sub>/Ld, 760 m<sup>3</sup> was generated at their highest point, and an average of 390 m<sup>3</sup>/day at STP was calculated.

The theoretical conversion of the volume of methane generated to electricity was estimated. For the OLR of 10 gCOD<sub>T</sub>/Ld, the trend at its highest point was 7558 kWh, and the average was 3879 kWh. For the OLR of 8 gCOD<sub>T</sub>/Ld, there were three trends, i.e., 3205, 9015, and 7316 kWh, respectively, with an average of 5458 kWh. The amount of electricity available depends on the efficiency of the generator, and a commercial electric generator has a conversion efficiency of approximately 30% (personal communication).

Fig. 4 Methane yields





**Fig. 5** Energy and economic trends in the generation of biogas

With the previous data for the OLR of 10 gCOD<sub>T</sub>/Ld, 2267 kWh/day can be obtained at the highest trend, and the average would be 1164 kWh/day. However, for the OLR of 8 gCOD<sub>T</sub>/Ld, 961, 2705, and 2195 kWh/day can be available at the low, high, and medium generation points, respectively, reaching an average of 1637 kWh/day. Figure 5 shows these results.

The variations of the energy and economic trends resulted from the varying performance of the AHR when the system was operated in continuous mode at mesophilic conditions (35 °C) and with high loadings of organics (OLR = 8 and 10 gCOD<sub>T</sub>/Ld). These high loadings of organics allowed the treatment of large volumes of wastewater with biogas generation, offering an attractive alternative to industrial applications. This could be compared with the research of Koppar and Pullammanappallil (2013), in which a similar energy analysis was performed. However, they used a point methane yield of 0.283 m<sup>3</sup> at STP/kgCOD, a retention time of 16 days under thermophilic conditions (55 °C), and a very dilute loading of organics (OLR = 0.51 gCOD/Ld).

The citrus processing plant required 67,000 kWh per day to operate, with the available electricity averaging 1.7 and 2.4% when the system operated at OLR of 10 and 8 gCOD<sub>T</sub>/Ld, respectively. Yatim et al. (2016) reported 1.47% of biogas utilization as a source of renewable energy for different applications.

Overall, within 70 days of operation, up to 350,461 kWh could be obtained, leaving 105,138 kWh available to contribute to 2.2% of the total electricity consumed by the citrus processing plant. The electrical energy that is available represents a savings and avoids the consumption of electricity from the grid of the Federal Electricity Commission, and this can save about \$8537 in just over 2 months. Figure 5 shows the economic trend per day.

The NPV indicates that the initial investment can be recovered in 10 years. However, if the operation of the AHR

is optimized with the pretreatment techniques discussed previously, the investment could be recovered in a shorter time with an evaluation method like that of Maroušek et al. (2012).

The municipality of Martínez de la Torre has the two largest citrus processing plants in México, and both have similar problems in the management of their industrial effluents from environmental, social, economic, and technical terms. With this study of the generation and use of bioenergetics, an eco-industrial networking can be structured with some of the conditions suggested by Yedla and Park (2017), which would give an ecological orientation to the citrus industry:

- Technological issues, such as ensuring an equitable distribution of costs and benefits and reducing the risk associated with the quality of the materials supplied, must be dealt with effectively through development and innovation to ensure the control of the environmental risks associated with the production.
- Regulatory issues, such as conflicting hazardous waste management standards, must be addressed and properly aligned to complement the creation of eco-industrial networking. The banks and other financial institutions must modify their guidelines to include and facilitate eco-industrial networking activities.
- Social issues, such as the promotion of multiparty coordination, establishment of communication channels, and building trust between the various actors involved, must be addressed.

## Conclusions

The Anaerobic Hybrid Reactor operated in a continuous mode for 70 days at a high organic loading rate between 8 and 10 gCOD<sub>T</sub>/Ld. The citrus effluent had pH values around 7, and the removals of total COD and soluble COD were 75 and 85%, respectively. Also, the TS and VS removals were 42 and 53% respectively, and the methane yields were around 0.15 LCH<sub>4</sub> to STP/gCOD<sub>rem</sub>. An inhibitory effect was observed by the presence of D-limonene in the citrus effluent, since no pretreatment was used for the elimination of this essential oil, and its presence had the effect of decreasing the removal of COD and the yields of methane.

The use of the Anaerobic Hybrid Reactor for the treatment of citrus effluents represents a viable alternative that can be implemented at the industrial level to generate and take advantage of a renewable energy source, such as biogas. In this way, extrapolating the data, up to 2.2% of the electricity required for the operation of a citrus processing plant can be generated. This analysis can serve as a basis for an eco-industrial citrus networking for México with the goal of

minimizing any negative environmental, economic, technological, and social impacts.

## References

- Alvarado-Lassman A, Rustrian E, García-Alvarado M, Rodríguez-Jiménez G, Houbroun E (2008) Brewery wastewater treatment using anaerobic inverse fluidized bed reactors. *Bioresour Technol* 9:3009–3015
- Antonio-Quaia E (2011) Reducción de la carga orgánica de las aguas de lavado de cáscara del limón por fermentación con levaduras y obtención de alcohol etílico. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Tucumán, Tesis de Maestría
- APHA (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th edn. (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation). Washington, DC
- Arellano-Aguilar O, Betancourt-Lozano M, Aguilar-Zárate G, Ponce de Leon-Hill C (2017) Agrochemical loading in drains and rivers and its connection with pollution in coastal lagoons of the Mexican Pacific. *Environ Monit Assess* 189:270
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 46:446–475
- Bicas JL, Fontanille P, Pastore GM, Larroche C (2008) Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *J Appl Microbiol* 105:1991–2001
- Boluda-Aguilar M, López-Gómez A (2013) Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Ind Crops Prod* 41:188–197. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.031>
- Calabrò PS, Pontoni L, Porqueddu I, Greco R, Pirozzi F, Malpei F (2016) Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: preliminary batch results. *Waste Manag* 48:440–447
- CFE (Comisión Federal de Electricidad) Consulta de tarifa [http://app.cfe.gob.mx/Aplicaciones/CCFE/Tarifas/Tarifas/Tarifas\\_industria.asp?Tarifa=OM&Anio=2017&mes=4](http://app.cfe.gob.mx/Aplicaciones/CCFE/Tarifas/Tarifas/Tarifas_industria.asp?Tarifa=OM&Anio=2017&mes=4). Accessed 29 Apr 2017
- García-Gonzalo D, Espina L, Gelaw T, De Lamo-Castellvi S, Pagán R (2013) Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes. *PLoS ONE* 8:1–11
- Gerardi M (2003) The microbiology of anaerobic digesters. Wiley, New York, p 94
- Hussain A, Kant S (2017) Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. *Appl Water Sci* 7:535–542
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). <http://www.inegi.org.mx/sistemas/indiceprecios/CalculadoraInflacion.aspx>. Accessed 31 July 2017
- Kesterson JW, Braddock RJ (1975) Total peel oil content of the major Florida citrus cultivars. *J Food Sci* 40:931–933
- Kidd J, Manning P, Simkin J, Peacock S, Stockdale E (2017) Impacts of 120 years of fertilizer addition on a temperate grassland ecosystem. *PLoS ONE* 12(3):e0174632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174632>
- Koppar A, Pullammanappallil P (2013) Anaerobic digestion of peel waste and wastewater for on site energy generation in a citrus processing facility. *Energy* 60:62–68
- Lee DH, Behera SK, Kim J, Park HS (2009) Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: a lab scale study. *Waste Manag* 29:876–882
- Maroušek J (2012) Finding the optimal parameters for the steam explosion process of hay. *Rev Téc Ing Univ Zulia* 35:1–9
- Maroušek J (2013a) Prospects in straw disintegration for biogas production. *Environ Sci Pollut Res* 20:7268–7274
- Maroušek J (2013b) Removal of hardly fermentable ballast from the maize silage to accelerate biogas production. *Ind Crops Prod* 44:253–257
- Maroušek J (2013c) Two-fraction anaerobic fermentation of grass waste. *J Sci Food Agric* 93:2410–2414
- Maroušek J (2014a) Biotechnological partition of the grass silage to streamline its complex energy utilization. *Int J Green Energy* 11:962–968
- Maroušek J (2014b) Significant breakthrough in biochar cost reduction. *Clean Technol Environ* 8:1821–1825
- Maroušek J, Kawamitsu Y, Ueno M, Kondo Y, Kolář L (2012) Methods for improving methane yield from rye straw. *Appl Eng Agric* 5:747–755
- Maroušek J, Itoh S, Higa O, Kondo Y, Ueno M, Suwa R, Tominaga J, Kawamitsu Y (2013) Enzymatic hydrolysis enhanced by pressure shockwaves opening new possibilities in *Jatropha Curcas* L. processing. *J Chem Technol Biotechnol* 88:1650–1653
- Maroušek J, Hašková S, Zeman R, Váchal J, Vaníčková R (2014) Nutrient management in processing of steam-exploded lignocellulose phytomass. *Chem Eng Technol* 37:1945–1948
- Maroušek J, Haskova S, Zeman R, Váchal J, Vaníčková R (2015) Processing of residues from biogas plants for energy purposes. *Clean Technol Environ* 3:797–801
- Martín MA, Siles JA, Chica AF, Martín A (2010a) Biomethanization of orange peel waste. *Bioresour Technol* 101:8993–8999
- Martín M, Siles J, Chica A, Martín A (2010b) Modelling the anaerobic digestion of wastewater derived from the pressing of orange peel produced in orange juice manufacturing. *Bioresour Technol* 101:3909–3916
- Michaud S, Bernet N, Buffière P, Roustan M, Moletta R (2002) Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. *Water Res* 36:1385–1391
- Muylaert MS, Sala J, de Freitas MAV (2000) Consumo de energia e aquecimento do planeta: Análise do mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL) do Protocolo de Quioto. Case studies. Post-graduate Engineering Programs Coordination (COPPE), Rio de Janeiro
- Nguyen H, Heaven S, Banks C (2014) Energy potential from the anaerobic digestion of food waste in municipal solid waste stream of urban areas in Vietnam. *Int J Energy Environ Eng* 5:365–374
- Nutiu E (2014) Anaerobic purification installation with production of biogas and liquid fertilizers. *Proc Technol* 12:632–636
- Rico C, Muñoz N, Fernández J, Rico J (2015) High-load anaerobic co-digestion of cheese whey and liquid fraction of dairy manure in a one-stage UASB process: limits in co-substrates ratio and organic loading rate. *Chem Eng J* 262:794–802
- Ruiz B, Flotats X (2016) Effect of limonene on batch anaerobic digestion of citrus peel waste. *Biochem Eng J* 109:9–18
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) Cierre de la producción agrícola por cultivo. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Accessed 15 Apr 2015
- Siles JA, Martín MA, Martín A, Raposo F, Borja R (2007) Anaerobic digestion of wastewater derived from the pressing of orange peel generated in orange juice production. *J Agric Food Chem* 55:1905–1914
- Surendra KC, Takara D, Hashimoto AG, Khanal SK (2014) Biogas as a sustainable energy source for developing countries: opportunities and challenges. *Renew Sust Energy Rev* 31:846–859
- Torquato L, Pachiega R, Crespi MS, Nespeca MG, de Oliveira JE, Maintinguer SI (2017) Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. *Waste Manag* 59:181–193

- Valipour M (2015) Land use policy and agricultural water management of the previous half of century in Africa. *Appl Water Sci* 5:367–395
- Valipour M (2016) Variations of land use and irrigation for next decades under different scenarios. *Irriga, Botucatu, Edição Especial, Irrigação* 1:262–288
- Viuda-Martos M, Fernández-López J, Sayas-Barbera E, Sendra E, Pérez-Álvarez JA (2011) Physicochemical characterization of the orange juice waste water of a citrus by-product. *J Food Process Preserv* 35:264–271
- Wilkins MR, Suryawati L, Maness NO, Chrz D (2007) Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *World J Microbiol Biotechnol* 8:1161–1168
- Yannopoulos SI, Lyberatos G, Theodossiou N, Li W, Valipour M, Tamburrino A, Angelakis AN (2015) Evolution of water lifting devices (pumps) over the centuries worldwide. *Water* 7:5031–5060
- Yatim P, Mamat M, Mohamad-Zailani S, Ramlee S (2016) Energy policy shifts towards sustainable energy future for Malaysia. *Clean Technol Envir* 18:1685–1695
- Yedla S, Park H (2017) Eco-industrial networking for sustainable development: review of issues and development strategies. *Clean Technol Envir* 19:391–402
- Yenigün O, Demirel B (2013) Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochem* 48:901–911