

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia

ASIGNATURA TRABAJO FINAL

**TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN SOBRE LAS
BACTERIAS METANOGENICAS**

Trabajo para optar al título
de Licenciado en Química

TOMAS GERMÁN JAVIER
Alumno

Mg. MOLINA CESAR F.
Director

Mg. URQUIZA NORA M.
Co-Directora

2017

Este trabajo fue realizado en:



Estación Experimental Agroindustrial “Obispo Colombres”

Laboratorio de Estudios Ambientales
Sección Ingeniería y Proyectos Agroindustriales

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Tucumán por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios de grado en tan prestigiosa institución.

A la Estación Experimental Agroindustrial “Obispo Colombres” (EEAOC) por otorgarme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis en sus instalaciones.

A mi director, Mag. Cesar Federico Molina y a mi co-directora, la Dra. Nora Urquiza, por sus tiempos, paciencia, colaboración, coordinación en las técnicas y ensayos utilizados en mi tesis de grado.

Al Dr. Walter Daniel Machado, jefe del laboratorio de estudios ambientales, quien me recibió cordialmente en su equipo de trabajo, transmitiéndome sus conocimientos y realizando importantes aportes a mi trabajo.

Al Ing. Eugenio Antonio Quaia por aceptarme en su equipo de trabajo. A mis compañeros del laboratorio de estudios ambientales por hacer amena mi estadía en la EEAOC. A la Dra. Norma Kamiya por su colaboración, predisposición, enseñanzas y gentileza en la puesta a punto de la técnica para el análisis de la composición del aceite esencial de limón durante el tiempo del ensayo.

A mi mamá y mi tía Raquel por todas sus enseñanzas, apoyo, por ser los pilares fundamentales durante mi desarrollo personal y académico, por aguantarme todos los días de mi vida y enseñarme los valores de la misma. Las amo. A mis hermanos Adolfo y Diego por siempre alentarme y darme fuerzas para no claudicar ante las adversidades. Los amo. A mi tía Esther y mi primo José María por ser una parte importante de mi vida. Los quiero mucho.

Al amor de mi vida Danella que nunca olvide y busque durante tanto tiempo, después de 16 años te pude encontrar. Porque nuestro amor permaneció inalterado a través de los días y llegaste al final de mi carrera para darme ese último empujón. Te amo. A su familia: Lore, Raquel, Sofí, Vale y Carlos, por recibirme con los brazos abiertos y adoptarme como uno más de los suyos. Los quiero mucho.

A mis compañeros de la facultad Facundo, Carito y Luz por transitar conmigo distintas etapas de la carrera, haciendo de esta un camino más ameno, lleno de alegría y esperanza. Los quiero mucho. A mis amigos de la vida Jesús y Sebastián por ser mi cable a tierra durante todos estos años. Los quiero mucho.

Finalmente dedico este trabajo a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo incondicional. ¡ ¡ ¡Gracias a todos! ! !

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
Introducción	7
1.1. Industrias cítricas en Tucumán	8
1.1.1. Proceso de industrialización del limón	8
1.1.2. Residuos de la industrialización del limón	11
1.2. Tratamientos biológicos	12
1.2.1. Digestión anaeróbica	12
1.2.2. Etapas de la digestión anaeróbica	13
1.2.3. Tratamientos para la recuperación o eliminación de los AE.....	15
1.2.4. Reactores Anaeróbicos	16
1.3. Aceites esenciales	20
1.3.1. Generalidades.....	20
1.3.2. Aceite esencial de limón	23
1.3.3. Componentes principales de AEL	24
1.3.4. Toxicidad.....	25
1.3.4.1 Actividad antimicrobiana	26
1.3.5. Mecanismo de toxicidad.....	27
1.3.6. Resistencia de los microorganismos a los AE	29
Objetivos	31
2.1. Objetivo general	32
2.2. Objetivos específicos	32
Materiales y métodos	33
3.1. Caracterización del lodo anaeróbico activo.....	36
3.1.1. Muestreo	36
3.1.2. Sólidos suspendidos.....	36
3.1.3. Actividad metanogénica específica	38
3.2. Determinación del efecto inhibitorio del AEL en el lodo anaeróbico	43
3.2.1. Determinación del porcentaje de inhibición en sistemas en lote	43
3.3. Determinación del efecto bactericida o bacteriostático del AEL	45
3.4. Análisis de la composición del AEL	47
3.4.1. Muestreo y almacenamiento del AEL	47
3.4.2. Análisis cualitativos y semi cuantitativos de los componentes presentes en el AEL.....	47
3.4.3. Dinámica de las modificaciones en la composición del AEL en el medio de ensayo a concentraciones de inhibición del 50%.....	47
3.4.4. Dinámica de transformación de los componentes del AEL en el medio de ensayo a concentraciones de inhibición mayores al 90%.....	50

Resultados y discusiones.....	52
4.1. Caracterización de lodo anaeróbico activo	53
4.2. Determinación del efecto inhibitorio del AEL en los lodo anaeróbico	54
4.2.1. Evaluación del efecto inhibitor del AEL sobre las bacterias metanogénicas en sistemas en lote.....	54
4.3. Composición del AEL, pre y post ensayos	56
4.3.1. Caracterización del AEL	56
4.3.2. Cambios en la composición del AEL a través del tiempo.....	61
4.3.2.1. Ensayos con 400 ppm de AEL a distintos tiempos	61
4.3.2.2. Ensayos con 800 ppm de AEL a distintos tiempos	62
4.3.2.3. Ensayos con 400 ppm de AEL sin la presencia de lodo	63
4.4. Determinación del efecto bactericida o bacteriostático del AEL	55
4.4.1. Comportamiento del lodo sometido a concentraciones equivalentes al 50% de inhibición del AME	55
4.4.2. Comportamiento del lodo sometido a concentraciones equivalentes al 90% o más de inhibición del AME.....	56
Conclusiones	66
Bibliografía	69

RESUMEN

El Aceite Esencial de Limón (AEL) proveniente del flavedo de la piel del fruto del cual recibe su nombre, tiene una composición variada, rica en terpenos, aldehídos y diferentes compuestos aromáticos. El AEL resulta tóxico para muchas especies de microorganismos, por lo que si se extrae de manera ineficiente durante la industrialización del limón o se produce una fuga accidental del mismo hacia la línea del efluente, podría suponer un serio compromiso para el funcionamiento normal de los reactores anaeróbicos utilizados como sistemas de tratamientos biológicos para disminuir la elevada carga orgánica que presentan los efluentes de esta naturaleza. Es por esto que resulta de especial interés conocer cuál es la sensibilidad de las bacterias metanogénicas, al ser expuestas a concentraciones crecientes de AEL, ya que las mismas son cruciales para una óptima degradación de la materia orgánica.

El objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar los efectos inhibitorios de diferentes dosis de AEL sobre un lodo bacteriano anaerobio, en sistemas estáticos de laboratorio (viales) por un período de 30 d. El inóculo utilizado para el ensayo fue un lodo activo, extraído de un reactor tipo UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) que opera con efluentes de una industria citrícola. El lodo, de aspecto floculento, presentó una Actividad Metanogénica Específica (AME) de $0,444 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Los viales contenían una concentración conocida de lodo, soluciones de nutrientes, una solución de ácidos grasos volátiles (AGV) como sustrato y concentraciones crecientes de AEL (100, 200, 400, 500 y 800 ppm). Los porcentajes de inhibición del AME respectivos fueron: 5%, 20%, 45%, 51% y 94%. En los sistemas que presentaron mayor inhibición del AME se analizó la composición del AEL antes y después de la fermentación, por la técnica de cromatografía gaseosa, se encontró que el componente mayoritario, D-limoneno, desapareció en el tiempo de ensayo. Además estos sistemas presentaron una recuperación del AME cuando fueron a lavado con agua y sometidos a un segundo ciclo de análisis.

Palabras claves: aceite esencial de limón, inhibición, actividad metanogénica específica, bacterias metanogénicas

Introducción

1.1. Industrias cítricas en Tucumán

Tucumán, concentra, en la actualidad, el 60% del área cítrica del Noroeste Argentino. Su expansión vino de la mano de las sucesivas crisis del sector azucarero, que le fue cediendo terreno. Hasta el año 1985 la superficie cultivada con limón era inferior a las 12000 ha (ATC, 2002), creciendo en forma ininterrumpida hasta alcanzar las 38020 ha actuales (EEAOC, 2015). La excelente calidad de la fruta producida, permitió un desempeño exitoso en el mercado internacional, logrando mayor expansión del cultivo en Tucumán (ATC, 2002).

Con cerca de 1.100.000 Tn cosechadas en el año 2015 (EEAOC, 2015), la provincia de Tucumán es el mayor productor mundial de limón, al menos el 70% de esa producción se destina a la elaboración de jugo concentrado, aceites esenciales y cáscara deshidratada, productos que, prácticamente, se exportan en su totalidad. De la fruta fresca alrededor de un 70%, que constituye la de mejor calidad, se destina a la exportación el resto se consume en el mercado interno (ATC, 2002). En las últimas décadas Tucumán ha sido escenario de la fuerte transformación de la actividad cítrica. En este período el limón ha desplazado fuertemente a los otros citrus, también se ha instalado en antiguas zonas cañeras y constituye hoy el segundo sector agroindustrial de la provincia.

Durante los últimos años cuatro empresas industriales han sido responsables de más del 60% de la molienda de la provincia: S.A. San Miguel, V. Trapani S.A, Citromax S.A.C. y Citrusvil S.A (ATC, 2002). En Tucumán se localizan ocho fábricas de diferente capacidad que procesan alrededor 990.000 tn de limón. Los rendimientos promedios de los principales productos son, alrededor de 1 kg de aceite esencial de limón (AEL) a partir de 200 kg de fruta fresca, 1 kg de jugo concentrado a partir de 17 kg de fruta fresca y 1 kg de cáscara deshidratada a partir de 19 kg de fruta fresca (Storti y Bevilaqua, 2011). El principal destino de todos estos productos es el mercado externo. En la industrialización del limón se aprovecha casi íntegramente la fruta, quedando solamente como residuos sólidos, restos de pulpa y semillas y como líquidos, los efluentes de las operaciones de lavado, que alcanzan los miles de m³ y tienen como principal característica una elevada cantidad de materia orgánica.

1.1.1. Proceso de industrialización del limón

La industrialización del citrus, con el aporte de tecnología, ha permitido que de un limón se obtengan diversos productos y subproductos (Fig. 1). La fruta ingresa directamente de la cosecha realizada en campo o del descarte que se produce en el empaque de fruta fresca. La fruta transportada a granel se descarga en una tolva y desde allí se conduce a través de cintas y elevadores, para entrar directamente al proceso o para almacenamiento en silos. Cumplida la primera etapa, la fruta entra al proceso, previo descarte de frutas defectuosas, hojas, tallos, etc., en donde una máquina lavadora, mediante cepillado y acción del spray (agua e hipoclorito de sodio) elimina la suciedad. Seguidamente, la fruta pasa a través de canales de flotación a una máquina que separa la fruta por tamaño, ingresando al sector de extracción, en donde se produce el “punto de separación” y se inicia el proceso de obtención de los tres productos principales: aceite, jugo y cáscara. Las máquinas se preparan en función del tipo de fruta a moler (según su tamaño) (Sota, 2007). Cada copa ralla y rocía con agua la superficie de la cáscara del limón para obtener emulsión de aceite mezclada con aserrín (polvo de cáscara). A su vez un pistón perforado penetra en la fruta obteniendo jugo con pulpa y hollejo. El hollejo luego cae conjuntamente con la cáscara para su procesamiento.

En la industria tucumana, el proceso fabril concentra su actividad en la obtención de tres productos principales: jugos concentrados, aceites esenciales y cáscara deshidratada. Las características principales de estos productos son:

- JUGO CONCENTRADO: las etapas de su proceso de obtención se detallan a continuación:

- Finisher: en este proceso se separa la pulpa del jugo. Ambos contenidos provienen de las máquinas extractoras en una relación de 1:10 de pulpa (10%), de las cuales se elimina el 50% de esa pulpa, la que pasa a la planta de tratamiento de efluentes.
- Centrifugado: el jugo ingresa a las máquinas centrífugas con una cierta cantidad de pulpa. En estas máquinas se elimina dicha pulpa en función del tipo de jugo que demande el cliente (jugo turbio o jugo clarificado).
- Pasteurización y concentración: la pasteurización se realiza para eliminar las bacterias que pudieran contener los jugos. La concentración se produce por medio del calentamiento del jugo durante cierto lapso. Este proceso se completa con las bombas de vacío que succionan el vapor que se origina por la ebullición del agua.
- Envasado: una vez enfriado el jugo se pasa a los tanques de bacheo para formar los lotes de producto final. Luego se envasa el jugo en tanques de acero inoxidable de 210 litros de capacidad con polietileno en su interior o en bidones (plástico) para su almacenamiento posterior en cámaras de frío a -18°C , para conservar sus características organolépticas y el aporte vitamínico (Sota, 2007).

- ACEITE ESENCIAL: surge de la extracción como una emulsión de agua, aceite y sólidos a través de las siguientes etapas:

- Finisher: la emulsión de aceite conjuntamente con el aserrín ingresa al *finisher* donde se separa la emulsión del aserrín. La emulsión, que contiene 1% de aceite, pasa directamente a las centrifugas.
- Concentrado-Centrifugado: la emulsión ingresa a las máquinas centrifugas y a través de este proceso se eleva la concentración de aceite a un 90%. Por medio del centrifugado se eliminan los sólidos y agua del contenido de aceite (más liviano).
- Pulido y Clarificado: en este proceso se terminan de eliminar las impurezas alcanzando un 100% de aceite. El contenido se vuelca a tambores para su análisis y formación de lotes.
- Filtrado y Descerado: en las cámaras de descerado (-25°C) precipitan las ceras que luego se eliminan a través del filtrado en frío. Este aceite es almacenado en tanques a temperatura ambiente ya que algunos sólidos precipitan a dicha temperatura y se procede a colar nuevamente. El aceite refinado es envasado en tambores de acero inoxidable que oscilan entre 175 y 180 kg y se mantienen en depósitos resguardados de la luz y el calor (Sota, 2007).

- CÁSCARA DESHIDRATADA: constituye la materia prima básica para la obtención de pectina, sustancia química utilizada en la industria alimentaria que se obtiene a partir de los pasos que se describen inmediatamente:

- Recepción y pesaje de carga: la cáscara y el hollejo provenientes de las máquinas extractoras ingresan a los molinos donde a través de cuchillas se los va trozando en pedazos para hacer más fácil luego la tarea del lavado.
- Lavado y escurrido: a través de este proceso la cáscara se mezcla con agua nueva cada vez que la misma se escurre por medio de las prensas. Por cada escurrido se obtiene pulpa fina que se decanta por drenaje de las prensas.
- Presecado y deshidratación: la cáscara ingresa al presecador con 85% a 87% de humedad, egresando de los deshidratadores (hornos rotativos) con un 8% a 10% de humedad.
- Enfriado y envase: el enfriado se lleva a cabo mediante la mezcla con aire a temperatura ambiente. Antes de producirse el envasado, la cáscara se filtra para eliminar el polvillo que pueda contener, luego se envasa y compacta en bolsas de 50 kg cada una (Sota, 2007).

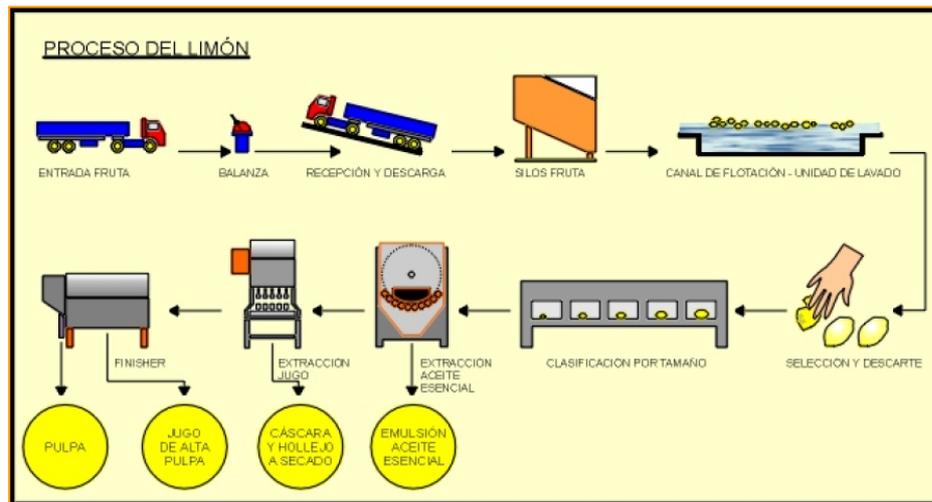


Figura 1. Procesamiento industrial del limón (Sota, 2007).

1.1.2. Residuos de la industrialización del limón

La industrialización del limón, genera residuos de diversa naturaleza, la mayoría de ellos de tipo orgánico. Dentro de éstos, los más voluminosos son aquellos formados por tejidos y constituyentes originales del limón que son arrastrados por las aguas del procesamiento industrial. De esta manera y según el orden de los subprocesos fabriles, se van generando diferentes líneas de residuos con diferentes características. En la línea de extracción de aceite esencial se genera, como desecho, una emulsión con mayor o menor contenido de restos oleosos, dependiendo de la eficiencia de extracción y del tipo de tecnología que se emplee. Luego se continúa con el proceso de obtención de jugo. El jugo obtenido suele contener entre 12 y 14 % de pulpa, el cual por un proceso industrial debe ser reducido al porcentaje que requieran los clientes. Se generan entonces residuos acuosos ricos en sólidos en suspensión (pulpa). Las fábricas que producen cáscara deshidratada tienen un subproceso adicional de lavado de cáscara que genera un efluente con alto contenido de sólidos en suspensión, además de azúcares y otras sustancias disueltas. Por otra parte, éste residuo es el más voluminoso de los producidos en este tipo de industria. Si bien cada subproceso arroja efluentes de características particulares, los mismos tienen en común un elevado contenido de sólidos en suspensión. Estos sólidos conforman un producto de elevada carga orgánica. Las cantidades generadas, que están en el orden del 6 % de la fruta procesada, expresada en base húmeda, da origen a un desecho complicado de manejar y de disponer (Machado et al., 2010).

Entre las posibilidades de valorización de los residuos generados por la industrialización del limón, la generación de metano mediante la digestión anaerobia parece ser la alternativa más viable técnicamente y más amigable con el medio ambiente. Sin embargo, los aceites esenciales de cítricos pueden inhibir este proceso biológico. Varias empresas citrícolas, industrializadoras de limón en Tucumán, adoptaron procesos de biodigestión anaeróbica para el tratamiento de sus efluentes. El mismo se puede llevar a cabo usando diferentes configuraciones y sistemas, incluyendo lagunas y reactores biológicos. La eficiencia de cualquiera de estos sistemas está ligada a que las operaciones de alimentación y mantenimiento sean las adecuadas y que se impida el ingreso de sustancias tóxicas o inhibitorias para las comunidades microbiológicas que dominan el proceso (Machado et al., 2015).

1.2. Tratamientos biológicos

Un tratamiento biológico es cualquier operación o procedimiento que tiene por objetivo tratar una sustancia con la finalidad de disminuir sus parámetros contaminantes a partir del empleo de microorganismos que llevan a cabo dicha operación (Molina, 2013). Los tratamientos biológicos presentan capacidades de remoción satisfactoria y al compararlos a tratamientos químicos o físicos como la Oxidación Química u la Oxidación Térmica presentan ventajas en términos de inversión y costo de operación. Estos tratamientos son conocidos como digestión, y pueden clasificarse en Aeróbicos cuando ocurren en presencia de oxígeno o Anaeróbicos si este no está presente en el sistema a considerar. Cabe aclarar que los microorganismos que participan en uno u otro proceso son diferentes (Chávez, 2005; Mittal, 2011). En el caso de la Digestión Aeróbica las velocidades de reacción son rápidas y hay una elevada producción de masa celular ya que aproximadamente el 50% de la materia orgánica contenida en el efluente se transforma en biomasa (el otro 50 % se disipa como calor). Como ejemplos de la misma podemos mencionar al compostaje o lagunas de sacrificio aeróbicas (Marquetti, 2013).

1.2.1. Digestión anaeróbica

La digestión anaeróbica es un proceso bioquímico en el cual un consorcio de microorganismos, en ausencia de oxígeno molecular, promueve la transformación de compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, lípidos y proteínas) en productos simples (metano, gas carbónico, gas sulfhídrico, amonio, hidrógeno, nitrógeno) (Ostrem, 2004).

Las principales condiciones para que la digestión anaeróbica se lleve a cabo son: contar con una cantidad de nutrientes suficientes y un pH entre 6,5 y 7,6. Deben evitarse los pH menores al límite inferior, ya que por debajo de este valor las bacterias metanogénicas se inactivan y por encima del límite superior disminuyen

su actividad. En cuanto a la temperatura se conocen dos rangos de crecimientos, según las especies que predominan en el consorcio, los que se denominan, intervalo mesofílico (entre 30-38°C) e intervalo termofílico (entre 50-60°C) (Marquetti, 2013). Las condiciones reductoras del medio son un requisito ya que todos los posibles aceptores en la respiración anaeróbica tienen un potencial de reducción menor que el O₂. Es así también, que, partiendo de los mismos sustratos, se genera menos energía en este metabolismo que en la respiración aerobia convencional. Por esta misma causa el ambiente donde se desarrollan las especies metanogénicas debe ser ausente de oxígeno, el que es tóxico para las mismas. La toxicidad de las sustancias que pueden estar en el sistema es un determinante de éxito de funcionamiento de un tratamiento anaerobio (Pasteris, 2014).

1.2.2. Etapas de la digestión anaeróbica

La digestión anaeróbica puede ser representada por una serie de etapas (Hidrólisis, Fermentación, Metanogénesis) que ocurren secuencialmente, en las que en cada una de ellas solo interviene un grupo de microorganismos determinado con sus reacciones específicas (Fig. 2).

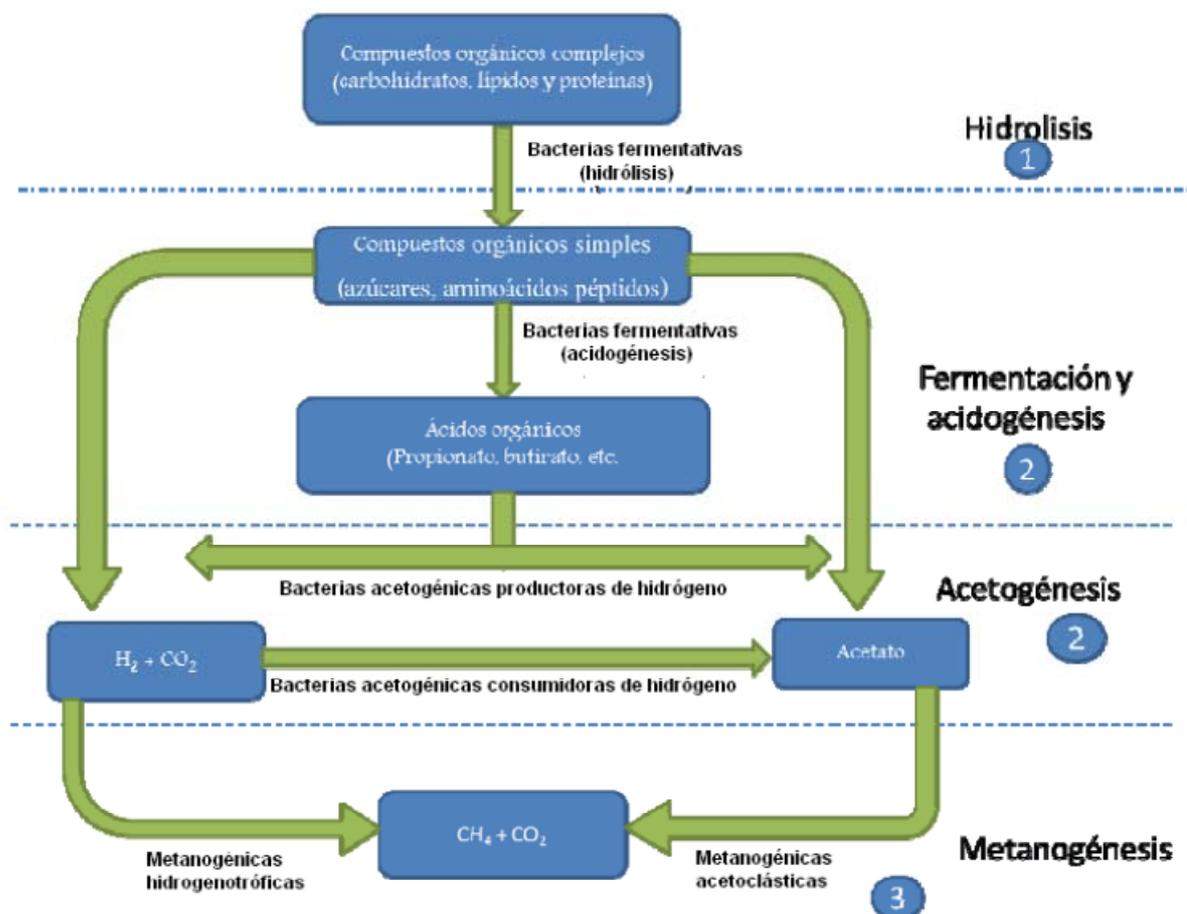
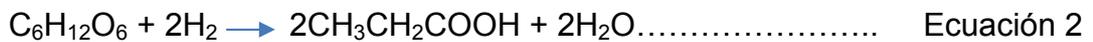


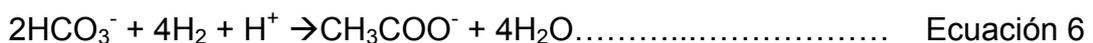
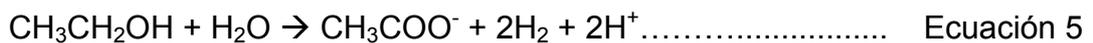
Figura 2. Rutas metabólicas y grupos microbianos involucrados en la digestión anaeróbica (adaptado de Lettinga, 1996).

1. Hidrólisis: en esta etapa se degradan los polímeros en moléculas simples gracias a las enzimas extracelulares excretadas por las bacterias hidrolíticas. Cuanto más complejas sean las macromoléculas la hidrólisis será más lenta, además está afectada por factores como el pH, la temperatura y la concentración de productos intermedios (Mata-Alvarez, 2003).
2. Fermentación y acidogénesis/acetogénesis: una vez formados los monómeros son absorbidos a través de la membrana celular de las bacterias acidogénicas y metabolizados a ácidos grasos volátiles (AGV): butírico, propiónico, valérico (Ostrem, 2004). Las bacterias fermentativas acidogénicas son las más beneficiadas desde el punto de vista energético por lo que presentan tasas de crecimiento superiores al resto, además pueden sobrevivir a bajos pH, altas temperaturas y alta carga orgánica (Ahring y col., 2001).

Las reacciones típicas en las etapas generadoras de ácidos se muestran en las ecuaciones 1 y 2. En la ecuación 1 la glucosa se convierte en etanol, y en la ecuación 2, la glucosa se transforma en ácido propanoico (Rittman y Mc Carty, 2001).



Luego tiene lugar la acetogénesis que consiste en la generación de ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono a partir de los AGV.



Como puede observarse en las ecuaciones la formación de hidrógeno es crucial en esta etapa. Este intermediario inhibe la acetogénesis y las bacterias sintróficas acetogénicas solo pueden oxidar los AGV cuando la presión parcial del mismo es baja (Mata-Alvarez, 2003).

3. **Metanogénesis:** La metanogénesis puede ser considerada una forma de respiración anaeróbica donde el gas carbónico o el carbono del grupo metilo del acetato, es el aceptor de electrones. Es llevada a cabo por los microorganismos metanogénicos (tienen la menor tasa de crecimiento) pertenecientes al dominio Archaea, estos son muy sensibles a los cambios de pH y prefieren ambientes neutros. La metanogénesis se divide en dos vías: una de ellas es la metanogénesis hidrogénica en la cual se forma metano a partir de CO₂ e H₂. La otra es la metanogénesis acetoclástica en la que se genera metano partiendo del ácido acético (Benavides Salazar, 1996; Caicedo Messa, 2006).
4. **Sulfogénesis:** en los ambientes anaeróbicos pueden estar presentes otras bacterias llamadas sulfato reductoras que actúan de acuerdo a la siguiente reacción $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{OH}^-$, es decir, utilizan el sulfato como aceptor final de electrones y al hidrógeno como dador. De esta manera compiten por el sustrato con las metanogénicas y además generan sulfuro de hidrógeno el cual es tóxico (Schnell y Schink, 1992).

1.2.3. Tratamientos para la recuperación o eliminación de los AE

Cuando se aborda el tratamiento biológico de los efluentes líquidos, es aconsejable tener presente la posibilidad del ingreso involuntario, en el reactor, de algún elemento o sustancia que resulte nociva para la actividad biológica. Con las actuales tecnologías de recuperación del aceite esencial de limón se avanzó sustancialmente en la eficiencia de su extracción. Pero, aun así, es poco probable evitar que el efluente de esta línea contenga algún residuo de aceite que, en determinadas situaciones, puede llegar al tratamiento biológico posterior. Por ello, es convenientemente conocer la incidencia que presenta este compuesto sobre la actividad de las bacterias metanogénicas (Ruiz y Flotats, 2014).

Una opción para mejorar la digestión anaerobia de residuos de cítricos es la eliminación previa de los aceites esenciales de los residuos. Dos estrategias se pueden aplicar: (a) la recuperación de los aceites esenciales a fin de obtener componentes valiosos, de acuerdo con el concepto de biorrefinería, o (b) la eliminación de estos únicamente para mejorar la producción de biogás. La elección entre la recuperación y la eliminación depende de la viabilidad económica de todo el proceso; la primera implica un costo mayor, pero se obtiene un producto valioso, mientras que el segundo implica un costo menor con la única ventaja de una producción de biogás más alta, por lo tanto, debe ser lo suficientemente alto como para compensar el costo. La recuperación se lleva a cabo mediante extracciones líquido-líquido con etanol o hexano; la complicación está dada por los residuos que esta técnica deja que terminan siendo tóxicos para la digestión anaeróbica. La eliminación de los aceites esenciales puede llevarse a cabo mediante aireación, lo que facilita la volatilización de los mismos (Ruiz y Flotats, 2014).

1.2.4. Reactores Anaeróbicos

Los reactores biológicos utilizados para el tratamiento de aguas residuales pueden ser divididos en tres grandes grupos de acuerdo con el tiempo de retención de sólidos dentro del reactor:

- Reactores de primera generación: el tiempo de retención celular es igual al tiempo de retención hidráulica (TRH), por lo que se requieren TRH muy altos, ya que existe un contacto inadecuado entre la biomasa y la materia orgánica. Estas condiciones de operación dan lugar a que la remoción de la materia orgánica sea baja y, por consiguiente, haya una reducida producción de biogás (Noyola, 1994). Las variantes de estos tipos de digestores se emplean para el tratamiento de residuos sólidos y estabilización de lodos. Tanque séptico, imhoff, etc. (Fig. 3.a).
- Reactores de segunda generación: se caracterizan por el hecho de tener mecanismos de retención de los lodos, independizando el tiempo de retención celular del TRH. Lettinga y col. (1980) desarrollaron los reactores de flujo ascendente con lodo granular (RAFA o sus siglas en inglés UASB), con características de película fija, pero sin material de soporte. Su funcionamiento se basa en la capacidad de sedimentación de la biomasa generada en el interior del reactor formando una cama de lodo, lo cual contribuye a minimizar el lavado celular a altas velocidades de carga. (Fig. 3.b).
- Existe una tercera configuración de reactores, los denominados de tercera generación (Chammy, 2005), que son aquellos conocidos como reactor de lecho fluidizados o de lecho expandido, (Figura 3.c), donde la biomasa está adherida o fijada a partículas de arena, alúmina o plástico, permaneciendo estos núcleos de biomasa en suspensión, expandidos por todo el interior del reactor optimizando el contacto entre el sustrato y la biomasa (Heijnen et al., 1989).

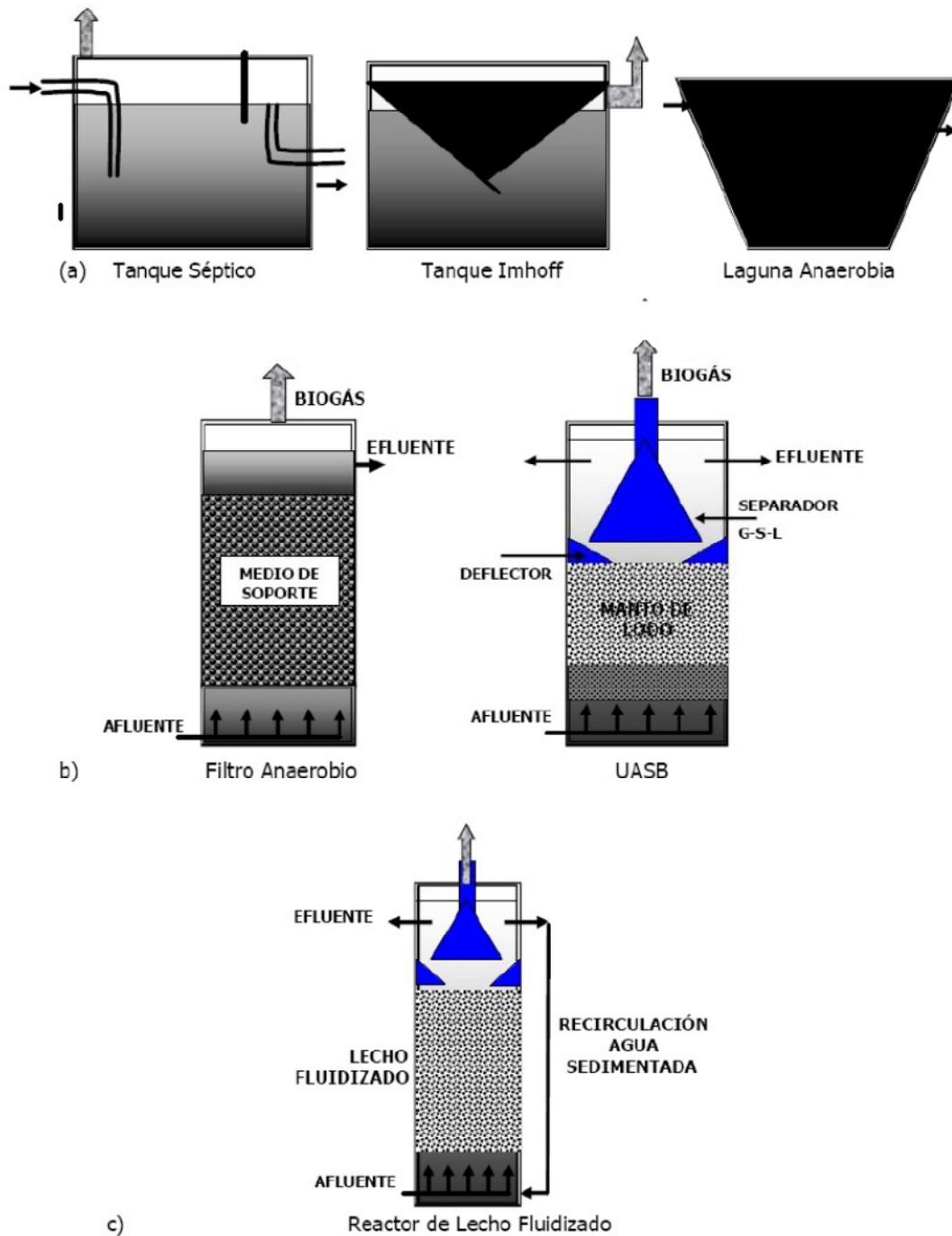


Figura 3. a) Reactores de primera generación. b) Reactores de segunda generación. c) Reactor de tercera generación (Van Haandel, 1994; Díaz-Báez, 2002).

1.2.5. Ventajas y desventajas

A continuación se presentan las ventajas de la digestión anaeróbica frente a la digestión aeróbica:

- Baja producción de lodos (en relación a los tratamientos aerobios). *
- Bajos requerimientos nutricionales. *
- Resiste altas cargas intermitentes. *
- Los lodos se conservan (sin alimentación) por largos períodos de tiempo. *
- Producción de biogás, fuente de energía alternativa (CH₄). *
- Instalaciones compactas que demandan poco espacio. *
- Menores costos de operación ya que no se requiere agitación mecánica y oxígeno. *
- Muy buena retención de biomasa. *

Entre las desventajas que posee frente a la digestión aeróbica podemos citar las siguientes:

- Las bacterias anaeróbicas (principalmente las metanogénicas) se inhiben fácilmente, ya sea por pequeños cambios en los parámetros de funcionamiento, como también por un gran número de compuestos. **
- El arranque del proceso es lento. **
- Su aplicación debe ser monitoreada. **
- Su efluente puede necesitar un tratamiento posterior. **
- Generación de malos olores si no se controla eficazmente. **

*(Pasteris, 2014). ** (Marquetti, 2013).

1.2.6. Reactor UASB

El interés en los sistemas anaeróbicos como el principal proceso biológico fue escaso, sobre todo para efluentes líquidos con alta carga orgánica, debido a los altos tiempos de retención hidráulica en la configuración de los reactores de mezcla completa, que requerían volúmenes muy grandes de reactores. Recién en los años setenta, se desarrollaron los reactores de segunda generación, llamados UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) por sus siglas en inglés, a partir del descubrimiento realizado por el Dr. Gatzke Lettinga (1980), de los lodos granulados. La aplicación de estos reactores, con buenos rendimientos, fueron observados en el tratamiento de aguas residuales industriales que contienen sustratos hidrolizables tales como desechos de las industrias sucroalcoholeras y cerveceras, disminuyendo el impacto ambiental (Guiot et al., 1991; Lettinga y Hulshoff, 1991; Fang et al 1994; Blonskaja et al., 2003).

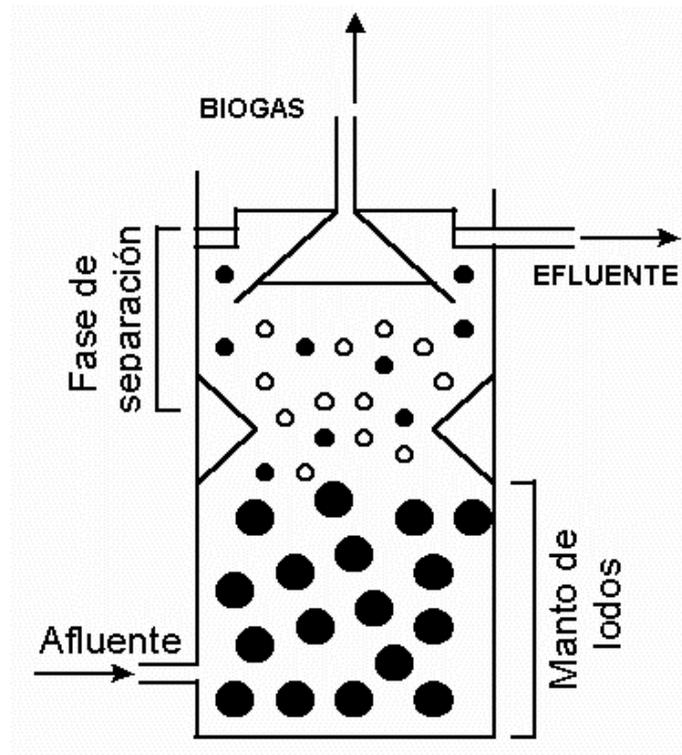


Figura 4. Esquema general de un Reactor UASB.

En el esquema se observa que el afluente es alimentado por la parte inferior del reactor, donde entra en contacto con el lodo granular. La degradación anaeróbica de los sustratos orgánicos ocurre en el lecho del lodo, produciéndose biogás (Kaparaju et al., 2009). El flujo ascendente del afluente puede arrastrar sólidos del barro a la parte superior del reactor, donde un separador de tres fases, impide la salida de los mismos separándolos del gas producido y del efluente líquido. El biogás es captado por una campana y conducido hacia la superficie del reactor. Algunos sólidos son arrastrados con el agua hacia el sedimentador, situado encima de la campana de gas, donde sedimentan y retornan al lecho de lodos. El efluente cae a un canal situado en la parte superior del reactor, desde donde es descargado (Lettinga et al., 1980).

El éxito del concepto de los digestores UASB reside en el establecimiento de un denso manto de lodos en el tercio inferior del reactor, donde ocurre el proceso biológico. La biomasa activa puede estar en forma de gránulos compactos o en forma de lodos floculentos con buena sedimentabilidad, siendo ésta la principal característica para la retención de la biomasa (Ruiz et al., 2001).

La agrupación de la biomasa en forma granular le proporciona una serie de beneficios al proceso, por lo que es muy importante un conocimiento profundo sobre las circunstancias que promueven el desarrollo de estos gránulos. Esto constituye un punto crítico de la tecnología y el gran reto a alcanzar cuando de estos sistemas se trata (Uyanik, 2003).

1.3. Aceites esenciales

1.3.1. Generalidades

Los aceites esenciales se obtienen principalmente de las partes no leñosas de las plantas, en especial las hojas, mediante arrastre por vapor de agua o hidrodestilación (Batish et al., 2008). Son una mezcla compleja, principalmente de terpenos, en particular monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), y una variedad de compuestos aromáticos, óxidos, éteres, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, que determinan el característico aroma y olor de la planta que lo produce (Batish et al., 2008). La presencia de monoterpenos volátiles o de aceites esenciales en las plantas es una importante estrategia de defensa, especialmente contra herbívoros, insectos perjudiciales u hongos patógenos (Langenheim, 1994). Desde la edad media, los aceites esenciales se han utilizado ampliamente como bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitarios, insecticidas, en aplicaciones medicinales y cosméticas, y especialmente hoy en día en las industrias agrícolas, alimentarias, farmacéuticas, sanitarias y cosméticas. Debido a estas propiedades son cada vez más generalizados sus usos como alternativas a los productos químicos sintéticos para proteger el equilibrio ecológico. Además son líquidos, límpidos y rara vez coloreados, solubles en lípidos y en disolventes orgánicos; suelen tener una densidad más baja que la del agua (Bakkali y col., 2008).

La calidad, cantidad y composición de los aceites esenciales dependen de el clima, la composición del suelo, órgano de la planta, la edad y la etapa de ciclo vegetativo. Por lo tanto, con el fin de obtener aceites esenciales de composición constante, tienen que ser extraídos en las mismas condiciones desde el mismo órgano de la planta que ha estado creciendo en el mismo suelo, bajo el mismo clima y que ha sido recogido en la misma temporada. La mayoría de los aceites esenciales son analizados por cromatografía de gases y espectrometría de masas (Davies, 2008).

1.3.2. Aceite esencial de limón (AEL)

El aceite esencial de limón (AEL), también llamado “esencia natural de limón” es uno de los productos de la industrialización del limón. Se trata de una sustancia volátil obtenida del epicarpio fresco del fruto por presión o raspado. Se requieren aproximadamente 200 kg de limón para obtener 1 kg de aceite esencial (Bruzzone, 2010).

Se trata de un líquido de color amarillo pálido a verde amarillento; posee un aroma fresco que recuerda a la cáscara madura del fruto. Su densidad relativa a 20°C es de 0,850 a 0,859 g/ml. Es volátil, soluble en alcohol o éter y poco soluble en agua. El principal constituyente químico es el D-limoneno, que representa algo más del 60% del total. La industria de bebidas sin alcohol es la principal consumidora de este aceite, que lo emplea como saborizante en las bebidas carbonatadas, aguas de soda y jugos. La demanda restante corresponde a las industrias de cosméticos y perfumería que lo usan como aromatizante. También es utilizado en tratamientos de aromaterapia y se le atribuyen diversas propiedades terapéuticas (Bruzzone, 2010).

El aceite de limón (Fig. 5), contiene aproximadamente 2% de sustancias no volátiles, alrededor de 18 alcoholes, 16 aldehídos, 11 ésteres, 3 cetonas, 4 ácidos, y 23 hidrocarburos. Los componentes mayoritarios del aceite esencial obtenido por prensado de la cáscara son: 63 % limoneno (Monoterpeno monocíclico), 12 % beta-pineno (Monoterpeno bicíclico), 9 % gamma-terpineno (Monoterpeno monocíclico). Otros componentes cualitativamente importantes son: 1,5 % geranial (aldehído), 1,0 % neral (aldehído), 0,5 % neril acetato (frutal, floral), 0,4 % geranil acetato (frutal, floral), 0,2 % citronelal (fuerte), 0,2 % linalol, (monoterpeno acíclico) y 0,1 % nonanal (Cerutti y et al., 2004).

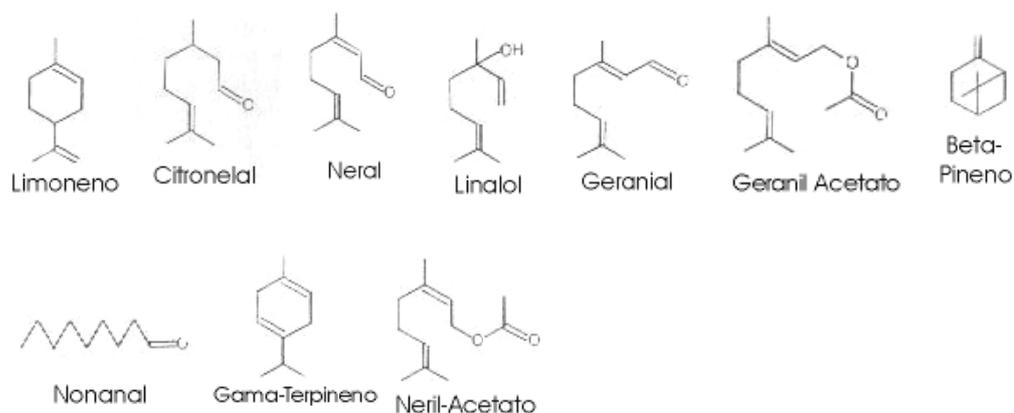


Figura 5. Compuestos característicos mayoritarios del aceite esencial de limón.

1.3.3. Componentes principales del AEL

- *D*-limoneno: es un monoterpeno monocíclico obtenido de naranja, pomelo y limón, cuya fórmula empírica es $C_{10}H_{16}$. Es un líquido incoloro a temperatura ambiente (Payán Saldívar, 2014). Existe como dos isómeros ópticos *D* y *L*-limoneno, y la mezcla racémica llamada dipenteno. Su fragancia difiere dependiendo del isómero. La degradación biológica se ha observado en algunas especies de microorganismos, sin embargo, parte de la desaparición del limoneno puede ser debida a la evaporación, ya que es difícil de evaluar la importancia relativa de esta ruta de eliminación durante las pruebas (Ruiz y Flotats, 2014). La solubilidad de este en agua es muy baja, ya que es una molécula hidrófoba. Otra característica importante del limoneno es su alta volatilidad. Esta es una característica común de los aceites esenciales; por ejemplo, la energía de activación del aceite esencial de limón es relativamente baja por lo que es altamente volátil. El principal uso industrial del limoneno es como precursor de carvona, un terpeno usado como saborizante, y en la fabricación, jabones, perfumes y licores.
- El citral es una mezcla de dos isómeros que tienen la misma fórmula molecular, $C_{10}H_{16}O$, pero diferentes estructuras. Estos isómeros se llaman geranial y neral, son aldehídos monoterpenos α -acíclicos, β -insaturados. Con un fuerte olor a limón, el citral es ampliamente utilizado en industrias de alimentos, cosméticos y detergentes como agente aromatizante. A bajas concentraciones afecta la actividad enzimática asociada generalmente con la producción de energía y a altas concentraciones dirige la desnaturalización de proteínas. También puede afectar la estructura y permeabilidad de la membrana citoplasmática, permitiendo la pérdida de macromoléculas desde dentro de la célula, alterando la función de la membrana citoplasmática e interactuando con las proteínas transmembrana (Payán Saldívar, 2014).

1.3.4. Toxicidad

En cuanto a sus propiedades biológicas, la toxicidad de los aceites esenciales es la más importante. Los mismos son mezclas complejas de numerosas moléculas, la toxicidad podría deberse al accionar de algún compuesto específico o al resultado de una sinergia entre todas ellas. En la mayoría de los casos, sólo se analizaron los principales constituyentes de ciertos aceites esenciales como el terpineol, eugenol, timol, carvacrol, carvona, geraniol, linalol, citronelol, nerol, safrol, eucaliptol, limoneno y cinamaldehído. En general, se puede decir que los componentes principales reflejan bastante bien las características biofísicas y biológicas de los aceites esenciales de la que fueron aislados (Ipek et al., 2005).

Si bien se (Bakkali et al., 2008) encontró que la amplitud de los efectos tóxicos depende de la concentración de los compuestos puros, cuando se ensayaron solos, lo que parece cuestionar las funciones sinérgicas de las diferentes moléculas contenidas en los aceites esenciales; no se descarta que la actividad de los componentes principales este modulada por otras moléculas de menor importancia que podrían desempeñar un papel en la penetración celular, la atracción lipófilo o hidrófilo y la fijación en las paredes celulares y membranas. Esta actividad biológica, por tanto, no se le puede atribuir a un compuesto en particular y puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida (Franzios et al., 1997).

1.3.4.1 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está evidentemente asociada con el carácter lipofílico de sus componentes. Una distinción se puede hacerse entre compuestos fenólicos y no fenólicos. Los primeros tienen un fuerte efecto antimicrobiano, debido principalmente a su grupo hidroxilo, aunque el anillo también juega un papel importante en este efecto. Esto ha sido demostrado al comparar el efecto antimicrobiano del mentol, que tiene un anillo no fenólico y está inactivo, con carvacrol, que tiene un anillo fenólico y exhibe actividad antimicrobiana (Helander et al., 1998). Otros compuestos tales como aldehídos y alcoholes también son de gran importancia en la actividad citotóxica de aceites esenciales.

La acción antimicrobiana de los aceites esenciales también se ve afectada por factores ambientales. Por lo tanto, bajo pH, temperatura, baja actividad de agua, alta presión y un ambiente de bajo oxígeno pueden aumentar la acción antimicrobiana de los aceites esenciales (F. Bakkali et al., 2008). La temperatura parece ser un parámetro muy importante. Por un lado, las células en crecimiento a baja temperatura (8°C) tienen un alto grado de insaturación en sus fosfolípidos de membrana, lo que mantiene la fluidez de membrana. En contraste, las células que crecen a 45°C muestran menos fluidez de membrana, ya que los ácidos grasos de los fosfolípidos tienden a ser más saturados. Esto significaría que las células que crecen a 45°C son más resistentes a los aceites esenciales que las células crecen a 8°C. Por otro lado, la evaporación de los aceites esenciales depende de su concentración y de la temperatura, contenido de agua y presión. La difusión de los componentes de los aceites esenciales a través de las membranas celulares es mayor a alta temperatura. Por lo tanto, no está claro si una temperatura más alta es beneficiosa o no desde el punto de vista del proceso de digestión anaerobia, puesto que los microorganismos termófilos exhiben una fluidez de membrana reducida, pero la difusión de los aceites esenciales es mayor (F. Bakkali et al., 2008). Un efecto paralelo es la evaporación de los componentes de los aceites esenciales, que se produce rápidamente a temperaturas más altas.

Se sabe que los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales disminuyen con el tiempo en un asunto de horas debido a la evaporación. Otro factor ambiental que mejora la toxicidad del aceite esencial es una baja presión parcial de oxígeno que da lugar a una menor oxidación de los aceites esenciales (F. Bakkali et al., 2008).

Debido al gran número de componentes que poseen, los aceites esenciales parecen no tener objetivos celulares específicos (Carson et al., 2002).

- Como lipófilos típicos, que pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, pueden irrumpir la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos volviendo permeables a los microorganismos con la consiguiente fuga de las macromoléculas (Knobloch et al., 1989)
- En las bacterias, la permeabilización de las membranas está asociada con pérdida de iones y la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y el agotamiento de ATP (Di Pasqua et al., 2006).
- Los aceites esenciales alteran el citoplasma (Gustafson et al., 1998) y precipitan las proteínas (Ultee et al., 2002; Burt, 2004).

1.3.5. Mecanismo de toxicidad

Todos los componentes de los aceites esenciales son hidrocarburos, y la mayoría de ellos tienen uno o más ciclos de carbono en su estructura. La mayoría de los hidrocarburos cíclicos son hidrófobos; que es de gran importancia para el modo de acción de estos compuestos sobre los microorganismos. Para llegar a ellos, un compuesto debe pasar por varias fases (Ruiz y Flotats., 2014).

- En primer lugar, tiene que ser disuelto en el medio acuoso. Los compuestos hidrófobos tales como aceites esenciales tienen baja solubilidad en agua, por lo que su biodisponibilidad es baja. Por lo tanto, la velocidad de disolución de un compuesto es una medida crítica de la biodisponibilidad de tal compuesto en todos los entornos. La velocidad de disolución es muy crítica para el crecimiento y la toxicidad, ya que gobierna la transferencia de un compuesto para el microorganismo (Thomas et al., 1986). La tasa de transferencia de un compuesto depende de la diferencia entre la concentración de equilibrio, la concentración real y el área de la superficie entre la fase generada por el compuesto y la fase acuosa (Jan Sikkema., 1995). Un método alternativo para reducir o incluso prevenir esta limitación de transferencia de masa es el uso de un codisolvente o un tensioactivo.

- En segundo lugar, el hidrocarburo tiene que entrar en la envoltura celular. Este paso varía dependiendo del tipo de microorganismo, puesto que la envoltura celular es diferente para cada tipo. La envoltura celular de un microorganismo consiste en una pared celular y una o dos membranas lipídicas (Beveridge and Graham, 1991). Además, algunas eubacterias y arqueas tienen una capa superficial cristalina (capa S) que rodea la membrana. Debido a la estructura de la membrana, las bacterias Gram-negativas pueden tolerar mayores concentraciones de compuestos lipófilos que las bacterias Gram-positivas. Esto se debe a la composición de la membrana externa alrededor de la membrana celular de las bacterias Gram-negativas que al ser hidrófilas repelen compuestos lipófilos. Sin embargo, la pared celular de las bacterias Gram-negativas no es completamente impermeable a compuestos lipófilos, y moléculas pequeñas pueden interactuar con agua mediante la formación de puentes hidrógeno y de esta manera atravesar la pared de la célula por difusión ya sea a través de la capa de LPS o de las proteínas y, finalmente, interactuar con la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática (Fisher and Phillips, 2008 Smith-Palmer et al., 1998).
- En tercer lugar, los hidrocarburos lipofílicos acumulados cambian la estructura de membrana. Se acumulan en la parte central de la bicapa lipídica, en el área entre las monocapas (alineados con las cadenas acilo de los fosfolípidos). La fluidez de la membrana entonces cambia, y esto puede causar inflamación de la bicapa y la alteración de la conformación de las proteínas incorporadas. La estructura de las capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos también cambia, y la membrana se vuelve más permeable. Con el tiempo, se produce la fuga del contenido celular. Aunque la fuga puede ser tolerada sin pérdida de viabilidad por un lapso determinado de tiempo, una pérdida masiva de citoplasma o de ciertas moléculas o iones puede conducir a la muerte celular, incluso antes de la lisis (B. Ruiz, X. Flotats., 2014).
- En cuarto lugar, además del cambio en la estructura de la membrana, existe también un cambio en la función de la membrana como una barrera selectiva, un transductor de energía y una matriz para las enzimas (Griffin et al., 1999).

1.3.6. Resistencia de los microorganismos a los AE

La respuesta adaptativa más común de las células al estrés es mantener la fluidez de la membrana constante, independientemente de las condiciones ambientales (Di Pasqua et al., 2006). Esto se conoce como adaptación homeoviscosa y se puede lograr de varias maneras: (A) cambiando la proporción de ácidos grasos; (B) por isomerización de los ácidos grasos a partir de cis a trans; (C) mediante la alteración de la longitud media de las cadenas de ácidos grasos; (D) cambiando el contenido de proteínas; o (E) mediante la modificación de la composición de ácidos grasos. Por ejemplo, las bacterias que crecen a baja temperatura muestran una mayor insaturación; mientras que en medios ácidos, los microorganismos contienen más ácidos grasos (Suutari et al., 1990). Los ácidos grasos insaturados aumentan la fluidez de la membrana, mientras que los ácidos grasos saturados hacen que las membranas sean más rígidas. Se ha demostrado que, en presencia de limoneno, algunas bacterias cambian su perfil de lípidos. Las cepas estudiadas fueron expuestas a su máxima concentración subletal, y sus perfiles de lípidos se analizaron después de la incubación. *Escherichia coli* (Gram-negativo) disminuye su contenido de ácido palmítico (C16) y aumenta las proporciones de ácido linoleico (C18:2) entre otros (Di Pasqua et al., 2006). Se ha demostrado que *Bacillus cereus* se adapta al carvacrol después de haber sido cultivado en concentraciones no letales. El mecanismo de adaptación en este caso se basa en cambiar el contenido de ácidos grasos y la composición del grupo unido a la cabeza de los fosfolípidos de membrana; reduciendo de este modo la fluidez de membrana y la permeabilidad pasiva (Ultee et al., 2000).

En base a todo lo expuesto anteriormente, en esta investigación se tratará de determinar de manera precisa y concreta cual es la relación que existe entre las concentraciones crecientes de AEL utilizadas en los ensayos y el grado de inhibición del AME que presenta cada uno de estos. Además se analizará: 1) si el AEL actúa como una sustancia bactericida o bacteriostática y 2) si la composición del aceite varía a lo largo del ensayo.

Objetivos

2.1. Objetivo general

La presencia de aceite esencial de limón, en determinadas dosis, produce la inhibición del metabolismo de bacterias claves en el proceso de degradación anaeróbica de la materia orgánica. Por lo tanto se determinarán las dosis de aceite esencial de limón a las cuales se produce está inhibición del lodo activo usado en el tratamiento biológico de efluentes cítricos.

2.2. Objetivos específicos

- 1 Caracterizar un lodo anaeróbico activo para utilizar en ensayos de toxicidad anaeróbica.
- 2 Evaluar el efecto inhibitorio de diferentes dosis de aceite esencial de limón sobre lodos anaeróbicos en sistemas estáticos.
- 3 Determinar si el efecto inhibitorio es bacteriostático o bactericida.
- 4 Analizar qué cambios sufre el aceite esencial de limón durante las condiciones del ensayo en sistemas estáticos.

Materiales y

métodos

Para una mejor descripción de las actividades llevadas a cabo, se dividió el estudio en cuatro etapas, representadas en la Tabla 1, junto con las determinaciones analíticas realizadas en cada una de ellas. La primera etapa consistió en la caracterización del lodo obtenido de un reactor UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) industrial. En la segunda etapa se determinó la toxicidad del AEL para el lodo, mediante la menor o mayor producción de gas metano en diferentes sistemas de fermentación en lote, sometidos a un rango de concentraciones de AEL. La tercera etapa se basó en conocer si efecto del AEL sobre los sistemas seleccionados fue bacteriostático o bactericida, a través de la evaluación del AME al lodo incubado en sistemas con concentraciones inhibitorias del 50 % y mayores del 90%, sometidos a un triple lavado con agua destilada previamente. En la cuarta y última etapa se efectuó la extracción del AEL contenido en el lodo y en el sobrenadante, con solventes orgánicos y posteriormente se determinó su composición por cromatografía gaseosa una vez finalizado el ensayo.

Tabla 1. Esquema de organización de las etapas del estudio.

ETAPAS	ENSAYOS
I. Caracterización del lodo anaeróbico activo.	Determinación de: Sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles. Actividad metanogénica específica: Sistema 0) Testigo, sin AEL.
II. Determinación del efecto inhibitorio del AEL en el lodo anaeróbico.	Determinación del porcentaje de inhibición en sistemas en lote compuestos por el lodo anaeróbico, medio nutritivo líquido y AGV (ácidos grasos volátiles) como sustrato, además de: Sistema 1) 100 ppm AEL Sistema 2) 200 ppm AEL Sistema 3) 300 ppm AEL Sistema 4) 400 ppm AEL Sistema 5) 500 ppm AEL Sistema 6) 800 ppm AEL Incubados por 30 d a 35°C.
III. Determinación del efecto bactericida o bacteriostático del AEL.	Evaluación de la recuperación del AME en el lodo sometido a concentraciones inhibitorias del 50% y mayores del 90% y su posterior lavado con agua destilada.
IV. Determinación de la composición del AEL y su dinámica de modificación en las condiciones de ensayo.	Análisis por cromatografía gaseosa de los extractos con solventes, en la fase sólida (los lodos) y la fase líquida (sobrenadantes). En los sistemas en lote a concentraciones inhibitorias de 50 y mayores de 90%.

3.1. Caracterización del lodo anaeróbico activo

3.1.1. Muestreo

El lodo fue tomado de la parte inferior de un reactor industrial tipo UASB (7.000 m³ de capacidad) instalado en una empresa cítrica ubicada al sur de la provincia. El lodo se tomó directamente desde una válvula toma muestra, inferior. Antes de captar el lodo se dejó abierta la válvula por unos minutos hasta que la salida del mismo fuese homogénea. La muestra fue depositada en un bidón de plástico de 10 litros de capacidad. Una vez en el laboratorio, la preservación de la muestra se realizó manteniendo el lodo en su envase de recolección original y a temperatura ambiente, ya que no se ha encontrado diferencia en los AMEs obtenidos a partir de lodos refrigerados y de lodos mantenidos a temperatura ambiente en estudios de rutina que se realizan normalmente en el laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes.



Figura 6. Lodo anaeróbico activo proveniente del reactor UASB.

3.1.2. Sólidos suspendidos

Para determinar los sólidos suspendidos totales (SST), fijos (SSF) y volátiles (SSV) del lodo, se utilizó una adaptación de la norma francesa T90-105-2 de la AFNOR (AFNOR, 1997). La separación de los sólidos disueltos de un lodo se lleva a cabo por centrifugación y lavados sucesivos. Este método se utiliza cuando los sólidos en suspensión en la muestra son particularmente elevados.

Fundamento del método

El método gravimétrico consiste en determinar la masa de sólidos suspendidos que fueron separados del lodo por sucesivas centrifugaciones, lavados y eliminación del sobrenadante. Los SST se determinan luego de eliminar la humedad de la muestra calentando en estufa a 105°C y los SSF después de eliminar la fracción volátil por calcinación a 550°C durante dos h. Los SSV se obtienen por la diferencia de ambos.

A un volumen medido de la muestra de lodo se lo centrifuga a altas revoluciones (7000 rpm) de manera que queden en el fondo del tubo los sólidos sedimentables (SS) y en el sobrenadante los sólidos disueltos (SD). Se descarta el sobrenadante, se lava el sedimento con agua destilada y se lo re suspende para volver a centrifugar. Esta operación se realiza por triplicado.

Una vez obtenidos los SS se los transfiere a un crisol y se los seca en estufa a 105°C. hasta peso constante. Este peso, referido al volumen de muestra empleado constituye los sólidos suspendidos totales (SST).

Los sólidos suspendidos fijos (SSF) se determinaron por calcinación de los SST a 550°C., durante dos h. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se los calculó por diferencia entre los SST y los SSF.

Procedimiento

1. Se lavaron dos crisoles de porcelana y se dejaron en la mufla por lo menos 2 h. Luego se retiraron y se dejaron enfriar en desecador. Se pesaron en una balanza analítica, repitiéndose el ciclo de secado, enfriado y pesado hasta peso constante. Este fue el peso (P_1) en gramos para cada uno.
2. Se colocaron dentro de dos tubos de centrifuga 20 mL de muestra homogénea (V_m) de lodo más 20 mL de agua destilada en cada uno y se centrifugaron por 15 min a 7.000 rpm.
3. Se descartó el sobrenadante y se agregó agua destilada hasta completar 40 mL y se centrifugaron nuevamente. Se repitió este paso una vez más.
4. Se retiró el sobrenadante y el lodo resultante de cada tubo, fue colocado en su crisol de porcelana correspondiente.
5. Los crisoles se pusieron dentro de la estufa a 103-105°C. por 12 h. o hasta peso constante. Se retiraron de la estufa y se dejaron enfriar en desecador.
6. Una vez enfriados los crisoles se pesaron en balanza analítica, chequeando que el peso fuera constante. Este valor representó el peso (P_2) en gramos para cada crisol.
7. A continuación, se colocaron los crisoles con la muestra seca en la mufla a 550°C. durante 2 h. Se dejaron enfriar en desecador y se pesaron, determinando peso constante (P_3) en gramos, para cada uno.
8. Con los datos de los pesos P_1 , P_2 y P_3 se calcularon los SST, SSF y SSV correspondientes de las muestras, con las siguientes fórmulas.

$$SST = \frac{P2-P1}{V_m} \times 1000 \quad (\text{g/L}) \quad (1)$$

$$SSF = \frac{P3-P1}{V_m} \times 1000 \quad (\text{g/L}) \quad (2)$$

$$SSV = SST - SSF \quad (\text{g/L}) \quad (3)$$

Donde:

SST= sólidos suspendidos totales (g/L)

P1= peso de los crisoles vacíos (Tara) (g)

P2= peso de los crisoles con muestras secas a 105°C (g)

SSF= sólidos suspendidos fijos (g/L)

P3= peso de los crisoles con muestras mufladas a 550°C (g)

V_m= volumen de muestra colocado en cada crisol (mL)

SSV= sólidos suspendidos volátiles (g/L)

1000= factor de conversión de mL a L (ml/L).

3.1.3. Actividad metanogénica específica

Este es un parámetro de gran importancia a la hora de caracterizar un lodo anaeróbico, puesto que permite conocer la máxima capacidad de producción de metano de la población metanogénica en condiciones óptimas. Para su determinación, se utilizó la técnica publicada por Field y col., (1988).

Cuando trabajamos con sustratos solubles la etapa de producción de metano (metanogénesis) es considerada la etapa limitante de los sistemas anaerobios al poseer, ésta, la menor velocidad de crecimiento de todas las poblaciones involucradas.

Fundamento del método

Consiste en incubar una cantidad conocida de lodo anaeróbico en condiciones ambientales óptimas utilizando ácidos grasos volátiles (AGV) como sustrato, de modo de poder establecer la capacidad de la población metanogénica para generar metano a partir de este sustrato. El AME se calcula a partir de la velocidad máxima de producción de metano.

Procedimiento

- 1.** Preparación del lodo (inóculo): Se calculó el volumen de lodo a agregar a los viales para tener una concentración final de 1,5 gSSV/L de biomasa.
- 2.** Se depositó el volumen calculado de lodo en seis tubos de centrifugación de 50 mL y se aforó hasta alcanzar un volumen de 40 mL con agua destilada.
- 3.** Se centrifugó el lodo a 7.000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante de las muestras y se aforaron nuevamente a 40 mL los tubos con agua destilada. Se mezclaron de modo que el pellet adherido fuera resuspendido. Se centrifugaron nuevamente y se repitió el paso anterior una vez más.
- 4.** Preparación de los viales: en los seis viales enjuagados se marcó el nivel correspondiente a un volumen de 100 mL de agua destilada.
- 5.** Se añadió a cada vial 50 mL de agua destilada, las soluciones de nutrientes y reductora como se indica en la tabla 2 de la técnica publicada por Field y col., (1988). Se ajustó el pH de la mezcla a 7-7,5, con HCl 1N.
- 6.** Cada uno de los viales fue inoculado con el lodo preparado (lavado y centrifugado). A cinco de los seis viales, se le agregaron 3 mL de la solución de sustrato (AGV). El vial restante fue utilizado como control de sustrato. Se llevaron los viales a volumen con agua destilada. Se taparon con tapón de caucho y se sellaron con precinto metálico. Se colocaron en la incubadora a 35°C.

Tabla 2. Soluciones utilizadas en el ensayo de AME adaptada de Field y col., (1988).

Solución	Compuestos	Concentración	Cantidad a añadir en 100 mL
Macronutriente 1	NH ₄ Cl	85 g/L	0,4 mL
Macronutriente 2	KH ₂ PO ₄	37 g/L	0,2 mL
Macronutriente 3	CaCl ₂ •2H ₂ O	8 g/L	0,2 mL
Macronutriente 4	MgSO ₄ •4H ₂ O	9 g/L	0,2 mL
Micronutrientes	FeCl ₃ •4H ₂ O	1000 mg/L	0,2 mL
	CoCl ₂ •6H ₂ O	1000 mg/L	
	MnCl•4H ₂ O	250 mg/L	
	CuCl ₂ •2H ₂ O	15 mg/L	
	ZnCl ₂	25 mg/L	
	H ₃ BO ₃	25 mg/L	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	45 mg/L	
	Na ₂ SeO ₃ •5H ₂ O	50 mg/L	
	NiCl ₂ •6H ₂ O	35 mg/L	
	EDTA	500 mg/L	
	HCl 36%	0,5 mL/L	
	Resazurín	250 mg/L	
Reductora	Extracto de levadura	2 g/ mL	1 mL
	Na ₂ S•9H ₂ O	2 g/ mL	
AGV	Acido acético	63,52 mL/L	3 mL
	Propiónico	16,8 mL/L	
	Butírico	17,4 mL/L	

Sistema de medición de metano

El sistema de medición de metano consistió en un recipiente de 500 mL, llamado frasco lavador, el cual contenía una solución de NaOH en una concentración de 40 g/L, cerrado con un tapón de goma al que lo atravesaban dos agujas hipodérmicas. Una de estas se conectaba por medio de una manguera al vial de digestión. La segunda aguja quedaba libre, sin obstrucción y es por donde purgaba la solución de NaOH. El volumen de CH₄ producido se midió por el desplazamiento de la solución del recipiente. El CO₂ contenido en el biogás es absorbido por el medio alcalino, pasando a CO₃²⁻, y el espacio libre del recipiente de medición es ocupado solo por el metano (Fig. 7).

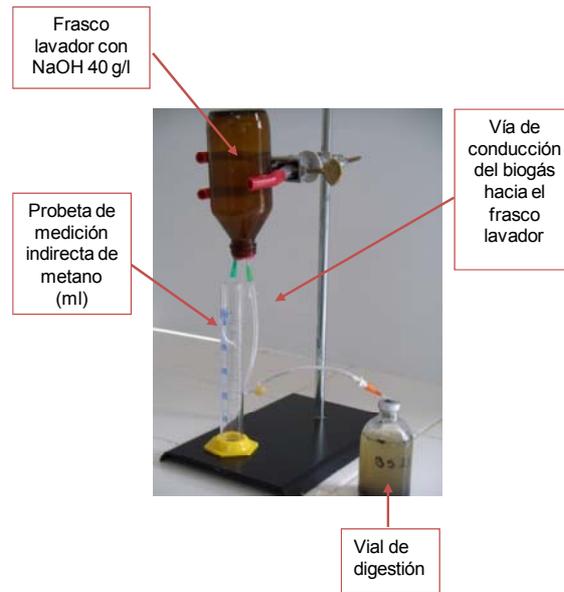


Figura 7. Equipo de medición de CH₄ para determinar AME.

Monitoreo de los viales

Cada 48 h se registró el volumen de CH₄ producido por cada uno de los viales, hasta que dejaron de generar gas (30 d aproximadamente).

Procesamiento de datos y presentación de resultados

La actividad metanogénica específica se obtuvo de la máxima pendiente de la curva de producción de CH₄ en función del tiempo (h). La Fig. 8, muestra un ejemplo de la representación gráfica de la curva de producción de CH₄ en el tiempo.

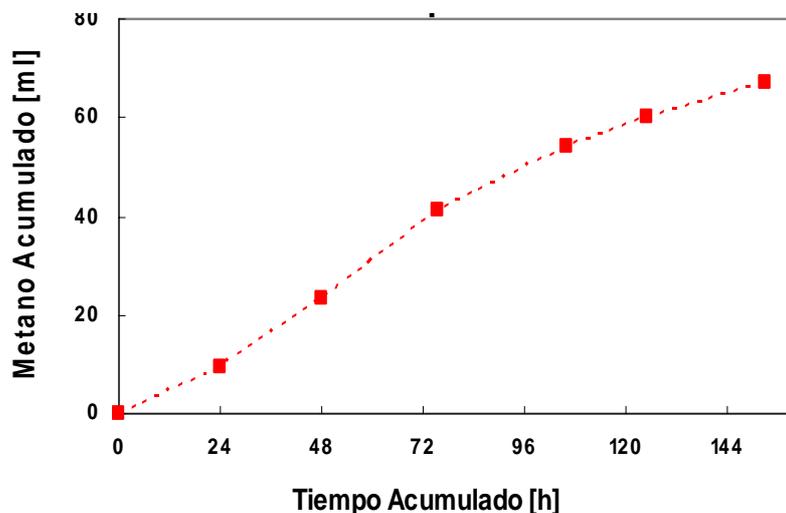


Figura 8. Monitoreo de producción acumulada de CH₄ en el tiempo durante el ensayo de actividad metanogénica.

El cálculo se llevó a cabo de la siguiente manera:

$$AME = \frac{24 \cdot R \cdot 1}{FC \cdot V \cdot SSV} \left(\frac{gDQO_{CH_4}}{gSSV \cdot d} \right) \quad d: \text{ día} \quad (4)$$

Donde:

AME: actividad metanogénica específica (g DQO_{CH₄}/g SSV.d)

R: velocidad de producción de metano (mL CH₄/hs)

FC: factor de conversión, en (mL CH₄/g DQO)

V: volumen efectivo de líquido en el digestor, (L)

SSV: concentración de lodo en el digestor (gSSV/L)

24: factor de conversión, (h/d)

El factor de conversión (FC), sirve para referir la producción de CH₄ a las condiciones ambientales durante el ensayo. Es un factor que se obtiene de tabla, teniendo en cuenta la media de la temperatura de reacción: si está es, por ejemplo, 28°C, el factor a utilizar será un promedio entre los valores de tabla de CH₄ húmedo correspondientes para 25 y 30°C (Tabla 3).

Tabla 3. Valores del factor de conversión para producción de CH₄, según la temperatura Field y col., (1988).

Temperatura (°C)	Metano Seco (mL CH ₄ /gDQO)	Metano Húmedo (mL CH ₄ /gDQO)
20	376	385
25	382	394
30	388	405
37	395	418
40	401	433

3.2. Determinación del efecto inhibitorio del AEL en el lodo anaeróbico

3.2.1. Determinación del porcentaje de inhibición en sistemas en lote

Se evaluó la toxicidad del aceite esencial de limón (AEL) sobre las bacterias metanogénicas presentes en el lodo anaeróbico mediante cultivos en lotes, a los que se les adicionó cantidades crecientes de AEL. Cada sistema consistió en seis viales donde se colocó una cantidad conocida de lodo, medio nutritivo, AGV como sustrato y una concentración determinada de AEL, excepto al vial “control”, el que no llevaba AEL. En total se largaron 7 sistemas (Fig. 9), que iban desde 0 ppm de AEL, hasta los sistemas con 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm y 800 ppm de AEL; llamados, sistemas testigo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

Procedimiento de armado de los sistemas

- El método utilizado fue el mismo empleado para la determinación del AME (apartado 3.1.3), con una única variación. A cada sistema, además de todos los nutrientes, lodo, y sustrato (AGV), se le agregó una concentración determinada de AEL (Fig. 9). El sistema 1) contenía una concentración final de AEL de 100 ppm, el 2) 200 ppm, el 3) 300 ppm, el 4) 400 ppm, el 5) 500 ppm y el 6) 800 ppm. Finalmente se preparó un sistema testigo sin el agregado de AEL.
- Cada sistema estaba conformado por cinco viales de ensayo y un control de AEL, sin el agregado de la sustancia a ensayar.



Figura 9. Esquema de los ensayos utilizados para determinar el efecto inhibitor del AEL.

Procesamiento de datos y presentación de resultados

El valor de AME obtenido del análisis correspondiente al sistema testigo (0 ppm de AEL), denominado AME de referencia (AME_R), constituyó un 100 % de eficiencia del proceso, es decir, un 0 % de inhibición. Por lo tanto, para calcular los porcentajes de inhibición generados por las concentraciones crecientes de AEL (AME_M) de cada uno de los ensayos se procedió de la siguiente forma:

$$AME_M = \frac{R \times 24}{Fc \times V \times 100} \quad [\text{gDQO}_{\text{CH}_4} / \text{gSSV} \cdot \text{d}] \quad \text{d: día} \quad (5)$$

$$AME_R = \frac{R \times 24}{Fc \times V \times 100} \quad [\text{gDQO}_{\text{CH}_4} / \text{gSSV} \cdot \text{d}] \quad (6)$$

$$\% AME = \frac{AME_M}{AME_R} \times 100 \quad (7)$$

$$\% Inhibición_{AEL} = 100 - \% AME \quad (8)$$

Donde:

AME_R : Actividad metanogénica específica de referencia. Es el AME sin el agregado de AEL [gDQO_{CH₄}/gSSV.d].

AME_M : Actividad metanogénica específica de la muestra ensayada con distintas concentraciones de AEL [gDQO_{CH₄}/gSSV.d].

% AME: Porcentaje de AME_M producido respecto del AME_R .

% $Inhibición_{AEL}$: Porcentaje de inhibición del lodo sometido al AEL, respecto del lodo de referencia [%].

3.3. Determinación del efecto bactericida o bacteriostático del AEL

Se conoce que debido a la complejidad en la composición del AEL, este actúa a diferentes niveles estructurales de los microorganismos inhibiendo su crecimiento (bacteriostático) u ocasionándoles la muerte (bactericida). Para determinar si el AEL actúa de una u otra forma sobre las bacterias metanogénicas se realizó la siguiente experiencia.

Se trabajó con las concentraciones de AEL que produjeron el 50% de inhibición en los sistemas en lote (400 ppm) y con el doble de dicha concentración (800 ppm) (Fig. 10).

Procedimiento:

1. Se prepararon dos sistemas, cada uno por quintuplicado, que contenían una cantidad conocida de lodo, macro y micronutrientes, y solución de AGV, como sustrato. A uno de los sistemas, se le agregó 400 ppm de AEL, al otro, se le agregó 800 ppm de AEL.
2. Se sellaron los viales herméticamente y se incubaron a 35°C por treinta d. Periódicamente se monitoreó la producción de CH₄.
3. Una vez finalizado el tiempo de fermentación, se procedió a abrir los viales y se dejó sedimentar los sólidos por 40 min, una vez precipitado el lodo, se sacó el sobrenadante con pipeta de 10 mL, con cuidado de no esparcir el sedimento.

4. Los sólidos, fueron trasvasados a los tubos de centrifuga (50 mL de capacidad) y llevados a 30 mL con agua destilada. Luego se agitó enérgicamente para homogenizar la suspensión para su lavado.
5. El lavado, consistió en centrifugar a 7000 rpm durante 15 min los tubos y luego descartar el sobrenadante. Esta operación se realizó por triplicado en total.
6. Una vez “lavado” el lodo fue re inoculado en viales, a los que se les agregó además, solución nutritiva de macro y micro nutrientes, y una solución de AGV como sustrato.
7. Se incubaron los sistemas por 30 d a 35°C y periódicamente se monitoreó el CH₄ producido.

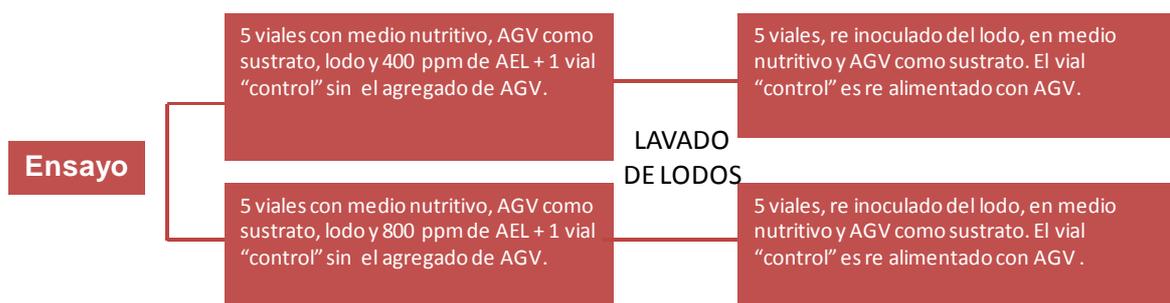


Figura 10. Diagrama de planificación del ensayo, para determinar efecto bacteriostático/bactericida del AEL.

Procesamiento de datos y presentación de resultados

Básicamente, se determinó el porcentaje de inhibición del lodo sometido a concentraciones de 400 y 800 ppm de AEL (sistemas 4 y 6, del apartado 3.2), por 30 d, luego de practicársele un triple lavado con agua destilada, para eliminar los restos de AEL (% Inhibición_L). Para ello se calculó el AME del lodo “lavado” al que se denominó AME_L y se la comparó con la actividad del lodo de referencia (AME_R), es decir los incubados en ausencia de AEL.

Para el cálculo del porcentaje de inhibición del lodo “lavado” se utilizó las ecuaciones 5, 6 y 7 del apartado 3.2, solo que en vez de utilizar la actividad del lodo sometido a una concentración de AEL (AME_M), se la reemplazó por la actividad del lodo “lavado” (AME_L). Finalmente el porcentaje de recuperación del AME (% Recuperación) se calculó mediante la diferencia entre el porcentaje de inhibición del lodo lavado (% Inhibición_L) y el porcentaje de inhibición de ese mismo lodo sometido a la concentración pertinente de AEL (% Inhibición_{AEL}).

$$\% AME = \frac{AME_L}{AME_R} \times 100 \tag{8}$$

$$\% Inhibición_L = 100 - \% AME \tag{9}$$

$$\% Recuperación = \% Inhibición_{AEL} - \% Inhibición_L \tag{10}$$

Donde:

AME_R : Actividad metanogénica específica de referencia. Es la actividad del lodo sin el agregado de AEL [$gDQO_{CH_4}/gSSV.d$].

AME_L : Actividad específica del lodo sometido al AEL pero lavado [$gDQO_{CH_4}/gSSV.d$].

$\% Inhibición_L$: Porcentaje de inhibición del lodo “lavado” respecto de los valores de referencia [%].

$\% Inhibición_{AEL}$: Porcentaje de inhibición del lodo sometido al AEL, respecto del lodo de referencia [%].

$\% Recuperación$: Porcentaje de actividad recuperada, una vez lavado el lodo [%].

3.4. Análisis de la composición del AEL

3.4.1. Muestreo y almacenamiento del AEL

Las muestras de aceite esencial de limón fueron suministradas por una empresa cítrica. Las mismas corresponden a la cosecha 2015 y pertenecen a una muestra representativa de un lote. Las muestras se preservaron en frascos color caramelo de 50 mL, con cierre hermético a $-20^\circ C$, para evitar su deterioro.

3.4.2. Análisis cualitativo y semi cuantitativo de los componentes presentes en el AEL

El análisis para determinar la composición del AEL y la relación de cantidades entre los compuestos que lo conforman, se realizó mediante una cromatografía gaseosa. La cual se efectuó en un cromatógrafo gaseoso marca Agilent Technologies modelo 6890N, con detector de ionización a la llama (FID). Se empleó una columna Zebron ZB-5 de fase estacionaria 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano de 30 m de longitud, por 0,32 mm de diámetro interno, por 0,25 μm de espesor de film. Se fijó la temperatura del inyector en $250^\circ C$ en modo sin derivación (*splitless*). Se empleó N_2 como gas portador (*carrier*) en modo presión constante de 9,64 psi (flujo inicial de 2 mL/min). La temperatura del detector fue de $250^\circ C$. La rampa de temperatura fue la siguiente: temperatura inicial de $70^\circ C$ durante 5 min, rampa de $3^\circ C/min$ hasta $140^\circ C$, pasando directamente a otra rampa de $10^\circ C/min$ hasta $250^\circ C$, permaneciendo en esta temperatura durante 15 min. El tiempo total de corrida fue de 53,33 min.

Se tomó como base para construir la tabla de calibración, la corrida cromatográfica del AEL patrón en una dilución de 1:20 en n-hexano.

3.4.3. Dinámica de las modificaciones en la composición del AEL en el medio de ensayo a concentraciones de inhibición del 50%

Para analizar la composición del AEL, en el medio de reacción, se preparó un sistema para medir la toxicidad con 400 ppm de AEL (según el apartado 3.2) y se realizaron extracciones con n-hexano del sobrenadante y del lodo, a los tiempos cero (T. inicial) apenas preparados los sistemas, a los 15 d de incubación (T. medio) y a los 30 d de incubación (T.final).

Se realizaron análisis cromatográficos en los extractos de las fase líquida (caldo de cultivo) y de las fase sólida (lodo) a los distintos tiempos, para determinar la presencia de compuestos derivados del AEL.

Procedimiento

En la Fig. 11, está representado en forma esquemática el procedimiento realizado para el análisis del AEL antes y después de los ensayos de biodegradación anaerobia.

1. Se prepararon 18 viales con las mismas especificaciones que para el ensayo de AME (apartado 3.1.3).
2. Luego, a 9 de ellos se le añadió 40 µL de AEL, para alcanzar los 400 ppm de concentración final y se mezcló para homogeneizar. Los otros 9 que no llevaban AEL, eran los controles.
3. Seis viales se analizaron inmediatamente (Tres controles y tres con muestras), otros seis a los 15 d de iniciado el ensayo y los seis restantes a los 30 d.

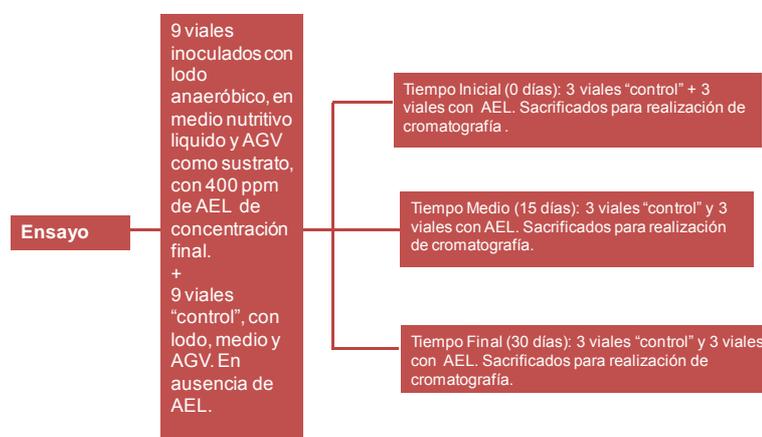


Figura 11. Diagrama del ensayo para estudiar la dinámica de transformación de los componentes del AEL en el medio de incubación con 400 ppm.

Preparación de las muestras para los análisis

A) Fracción sólida (lodo)

1. El contenido de cada vial fue trasvasado a cuatro tubos de centrifuga (25 mL por tubo).
2. Se centrifugó y separó el sobrenadante. Todo el lodo proveniente de cada tubo de centrifuga, se juntó en un vaso de precipitación.
3. El sedimento recolectado, se trasvasó del vaso de precipitación a un tubo de centrifuga y se agregó 2 mL de hexano. Se homogeneizó y se dejó estacionar en heladera por un d. Luego se centrifugó en frío a 5000 rpm.
4. Se sacó el tubo de la centrifuga y con una pipeta Pasteur se tomó la capa oleosa (de color amarillo verdoso intenso) de la superficie y se trasvasó el líquido a pequeños viales de cromatografía para su posterior análisis.

B) Sistema con ausencia de lodo

1. Para conocer si el lodo tenía un efecto directo en las modificaciones producidas en la composición del AEL se realizó un análisis del sistema en ausencia de lodo. Se trabajó con el caldo de cultivo más el AEL, sin el agregado del lodo. Las mezclas fueron pasadas por una columna C18 en una cámara de vacío. Una vez seca la columna los componentes retenidos fueron eluidos con diclorometano y colectados en un vial de centrifuga para su posterior corrida cromatográfica.

3.4.4. Dinámica de transformación de los componentes del AEL en el medio de ensayo a concentraciones de inhibición mayores al 90%

Para determinar los cambios en la composición del AEL en los sistemas donde el porcentaje de inhibición del AME es casi completo (mayor al 90%); se preparó un ensayo de toxicidad del AEL sobre el lodo anaeróbico (según el apartado 3.2) con concentraciones de AEL finales de 800 ppm, se incubaron por 30 d a 35°C y luego ese lodo fue lavado tres veces con agua destilada y se volvió a inocular en sistemas con caldo nutritivo y AGV como sustrato pero sin el agregado del AEL, a los fines de evaluar la recuperación del AME. Se realizaron cromatografías de los lodos post lavado para determinar la presencia de AEL en los mismos.

Metodología

Se preparó un sistema (Fig. 12) para evaluar la toxicidad del AEL sobre las bacterias metanogénicas (según el apartado 2.2). El sistema estuvo compuesto de 5 viales, a los que se les añadió la cantidad necesaria de AEL para que la concentración final dentro de cada vial sea de 800 ppm. Se preparó un vial al que no se le agregó el AEL, que fue el “control” del ensayo. Se dejaron incubar a 35°C por 30 días.

Luego:

1. Una vez finalizado el primer ciclo, en presencia de AEL, se seleccionaron al azar, 3 viales para continuar con el segundo ciclo de incubación en ausencia de AEL (post lavado) y se utilizaron los otros 2 para determinar por cromatografía, la presencia de AEL en el lodo después del lavado.
2. A los viales seleccionados para realizar el análisis cromatográfico, se los dejó sedimentar por una hora, luego se los abrió y se descartó el sobrenadante con pipeta de 10 mL.
3. Los sólidos se trasvasaron a tubos de centrifuga (50 mL de capacidad) y se llevaron a 30 mL con agua destilada.
4. Se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado 2 veces más.
5. Al sólido centrifugado se le agregó 2 mL de hexano y se llevó a la heladera por un día.
6. Luego se centrifugó y se extrajo la capa oleosa con pipeta Pasteur. Dicho extracto se colocó en un vial de centrifugación y se procedió a hacer la corrida cromatografica.
7. Los tres viales restantes, fueron sometidos a un lavado de sus lodos como se describe en el paso 4 de este protocolo y posteriormente se utilizaron nuevamente para preparar sistemas en lote como se detalla en el apartado 3.1.3. para un segundo ciclo de AME, esta vez sin el agregado de AEL.
8. Luego de 30 d de incubación, midiendo periódicamente el CH₄ producido, se procedió a la apertura de los viales y a la extracción del AEL presente en el lodo con el solvente, como esta descrito en los puntos 5, 6 y 7 de este protocolo.

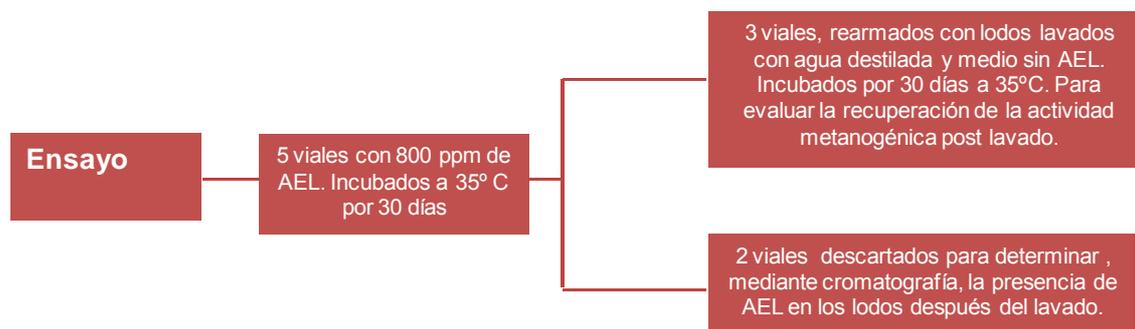


Figura 12. Diagrama de planificación del ensayo para evaluar la presencia de AEL en el lodo post lavado.

Resultados y **discusiones**

4.1. Caracterización del lodo anaeróbico activo

Los principales parámetros biológicos a considerar para caracterizar a un lodo anaeróbico son: la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y la actividad metanogénica específica (AME) (Field y col., 1988), además de los parámetros fisicoquímicos relacionados con las condiciones óptimas del ambiente, como pH, temperatura y alcalinidad. En la Tabla 4, se presentan los resultados de los análisis de caracterización biológica del lodo analizado para llevar a cabo los estudios de este trabajo.

Tabla 4. Caracterización biológica del lodo anaeróbico de un reactor UASB.

SST (g/L)	SSF (g/L)	SSV (g/L)	AME (g DQO _{CH₄} /g SSV.d)
27,51 ± 0,478	11,61 ± 0,450	15,90 ± 0,077	0,444 ± 0,015
CV = 1,74%	CV = 3,88%	CV = 0,48%	CV = 3,38%

- CV = coeficiente de variación.

El valor de AME obtenido (0,444 ± 0,015) refleja una actividad relativamente alta del lodo ya que a pesar de ser tomado de un reactor UASB se trata de lodo floculento, y no granular como era de esperar en un reactor de este tipo. Los valores de AME reportados para lodos granulados van desde 0,3 a 1,2 gDQO_{CH₄}/gSSV.d (Fang y Chuí, 1993), mientras que Van Lier y col. (1995) evaluaron el efecto de la temperatura de reacción en lodos obtenidos de un reactor de mezcla completa alimentado con residuo municipal sólido, encontrando una actividad metanogénica de 0,31 ± 0,01 g DQO_{CH₄}/g SSV.d. Por otro lado, Field y col. (1988) estudiaron diferentes tipos de lodos postulando valores de referencia de AME para cada uno. En el caso de lodos activos provenientes de aguas residuales domésticas y de reactores anaeróbicos, los valores se encuentran entre 0,02 - 2,0 y 0,4 - 1,5 g DQO_{CH₄}/g SSV.d respectivamente.

La relación entre sólidos suspendidos fijos y totales (SSF/SST), refleja la aptitud de los lodos anaeróbicos para ser utilizados como inóculos, ya que aquellos que superan el valor de 0,7, no serían apropiados para ser usados en reactores UASB, debido a la presencia de un alto porcentaje de sólidos inertes (SSF), sin actividad metanogénica, que ocupan un espacio físico en el reactor (Sanchez Riera et al., 1985). El lodo analizado presentó una relación SSF/SST del 0,4.

4.2. Determinación del efecto inhibitorio del AEL en el lodo anaeróbico

4.2.1. Evaluación del efecto inhibitorio del AEL sobre las bacterias metanogénicas en sistemas en lote

En el gráfico presentado en la Fig. 13 se muestran los datos de las actividades metanogénicas específicas (AME) promedio de cada sistema evaluado y en la Fig. 14, los correspondientes porcentajes de inhibición.

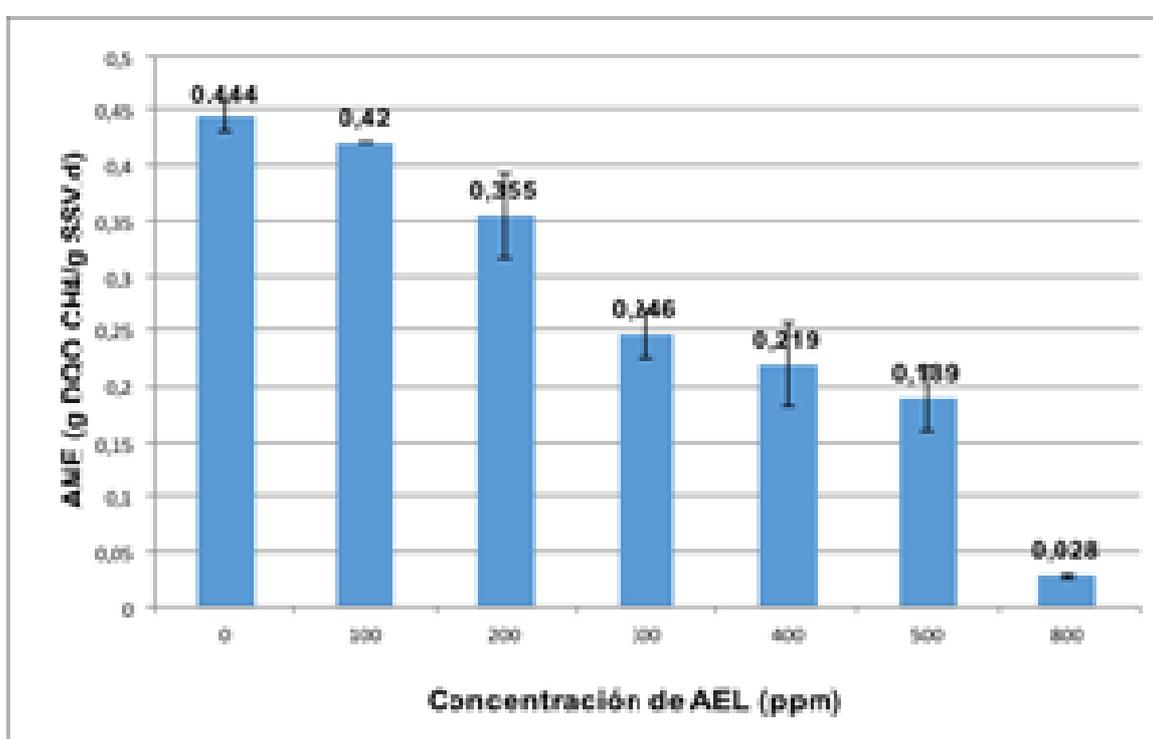


Figura 13. Actividades metanogénicas específicas de los distintos sistemas con concentraciones crecientes de AEL.

Los resultados obtenidos mostraron que el agregado de AEL produce cambios significativos en los valores del AME para todas las concentraciones estudiadas ($p \leq 0,05$), comparadas con el AME obtenido del testigo (Fig. 13).

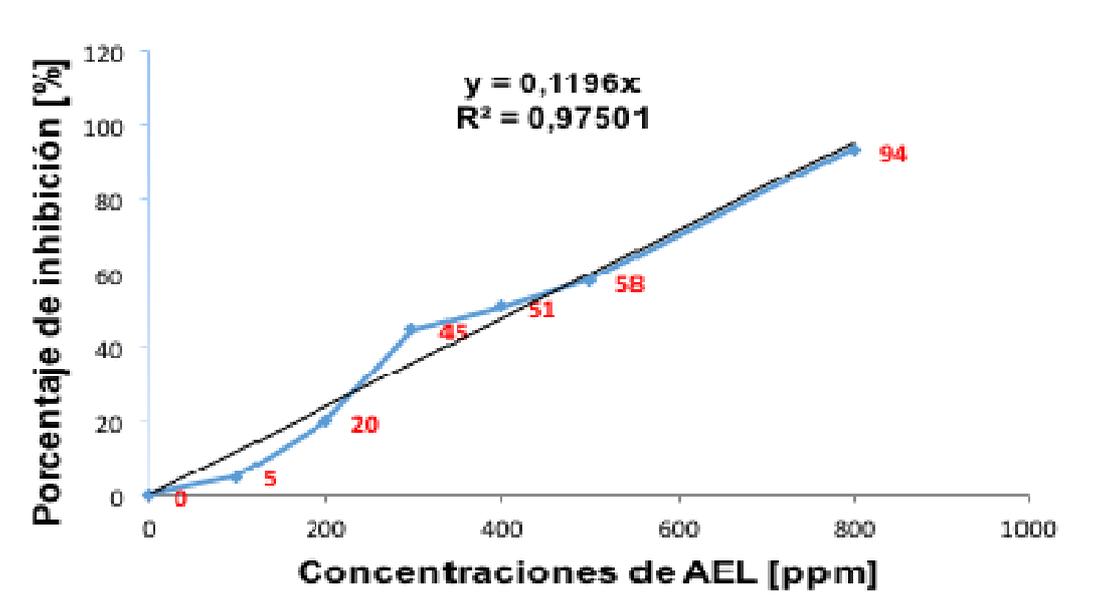


Figura 14. Porcentaje de Inhibición de cada sistema a distintas concentraciones de AEL. En rojo, señalados, los porcentajes para cada sistema.

El porcentaje de inhibición presentó un aumento prácticamente lineal con la concentración del AEL, cuya tasa de inhibición fue de 0,1196 puntos porcentuales por cada ppm de AEL. El porcentaje de inhibición del 50% se alcanzó con una concentración de 400 ppm de AEL. Este resultado tiene cierta similitud con los obtenidos por Sierra-Alvarez y Lettinga (1990) quienes reportaron un 50 % de inhibición de AME cuando se trabajó con 274 ppm de Eugenol y 330 ppm de 4-Terpineol, terpenos volátiles componentes del aceite esencial de limón. Lin y col. (2012) encontraron valores de inhibición del AME de 15 y 58% cuando trabajaron con concentraciones de 200 ppm y 500 ppm respectivamente, con mezclas de aceites esenciales de tomillo, orégano, canela y limón en las siguientes proporciones 1:2:3:4 respectivamente, pudiendo observarse que los rangos de inhibición coinciden con los obtenidos en la Fig. 14.

4.3. Composición del AEL, pre y post ensayos

4.3.1. Caracterización del AEL

En la Fig. 15 se muestra el cromatograma del AEL de la muestra patrón. Las proporciones relativas de los componentes mayoritarios son: D-limoneno 65,36%, β -pineno 12,94%, γ -terpineno 8,34%, sabineno 2,23% y α -pineno 1,9%. Un componente a destacar es el p-cimeno que aunque está en una proporción del 0,16% es el producto típico formado durante el envejecimiento del AEL por deshidrogenación del γ -terpineno en condiciones inadecuadas de almacenamiento (Stanley et al., 1961). Esta composición se encuentra dentro de los valores normales encontrados en otros análisis de cromatografía del AEL, como los reportados por Sinclair (1984) que establecen un rango de D-limoneno 72,2 a 82,9% , β -pineno 3,1 a 13%, γ -terpineno 8,8 a 10%, sabineno 0,6 a 1,9%, α -pineno 1,7 a 2% y p-cimeno trazas a 1%.

4.3.2. Cambios en la composición del AEL a través del tiempo

4.3.2.1. Ensayos con 400 ppm de AEL a distintos tiempos

La Fig. 16 muestra la composición del AEL al tiempo cero (T0). El D-limoneno es el componente mayoritario con un 68,32%. Le sigue el γ -terpineno con un 9,25 %; el sabineno, α -pineno, neral, geranial y p-cimeno tienen un 2,25; 1,48; 0,33; 0,44 y 0,28% respectivamente.

En el cromatograma de la Fig. 17 se observa la composición relativa de la muestra de AEL (T1) obtenida a partir de la extracción con hexano de los lodos incubados durante 15 d. Los porcentajes obtenidos fueron: D-limoneno 49,99 %, γ -terpineno 0,24%, sabineno 0,17%, α -pineno 1,18% y p-cimeno 32,96%. Tanto el neral como el geranial han desaparecido.

En la Fig. 18 se ve el cromatograma de la muestra de AEL (T2), la cual se obtuvo bajo las mismas condiciones que T1 pero luego de un período de 30 d de incubación. Los porcentajes obtenidos fueron: D-limoneno 1,25 %, β -pineno 0,55%, γ -terpineno 0,05%, sabineno "trazas", α -pineno 0,16% y p-cimeno 80,08%. Como puede observarse existe una diferencia significativa entre el cromatograma del AEL de la muestra patrón y los cromatogramas obtenidos a los diferentes tiempos de incubación. La misma se debe a que la extracción con hexano no sólo extrae los componentes del AEL, sino además una batería de compuestos que se encuentran en la constitución normal del lodo. Por eso los cromatogramas de T0, T1 Y T2 poseen una mayor complejidad que se manifiesta en el número de compuestos detectados por cromatografía gaseosa/detector de ionización a la llama (GC/FID).

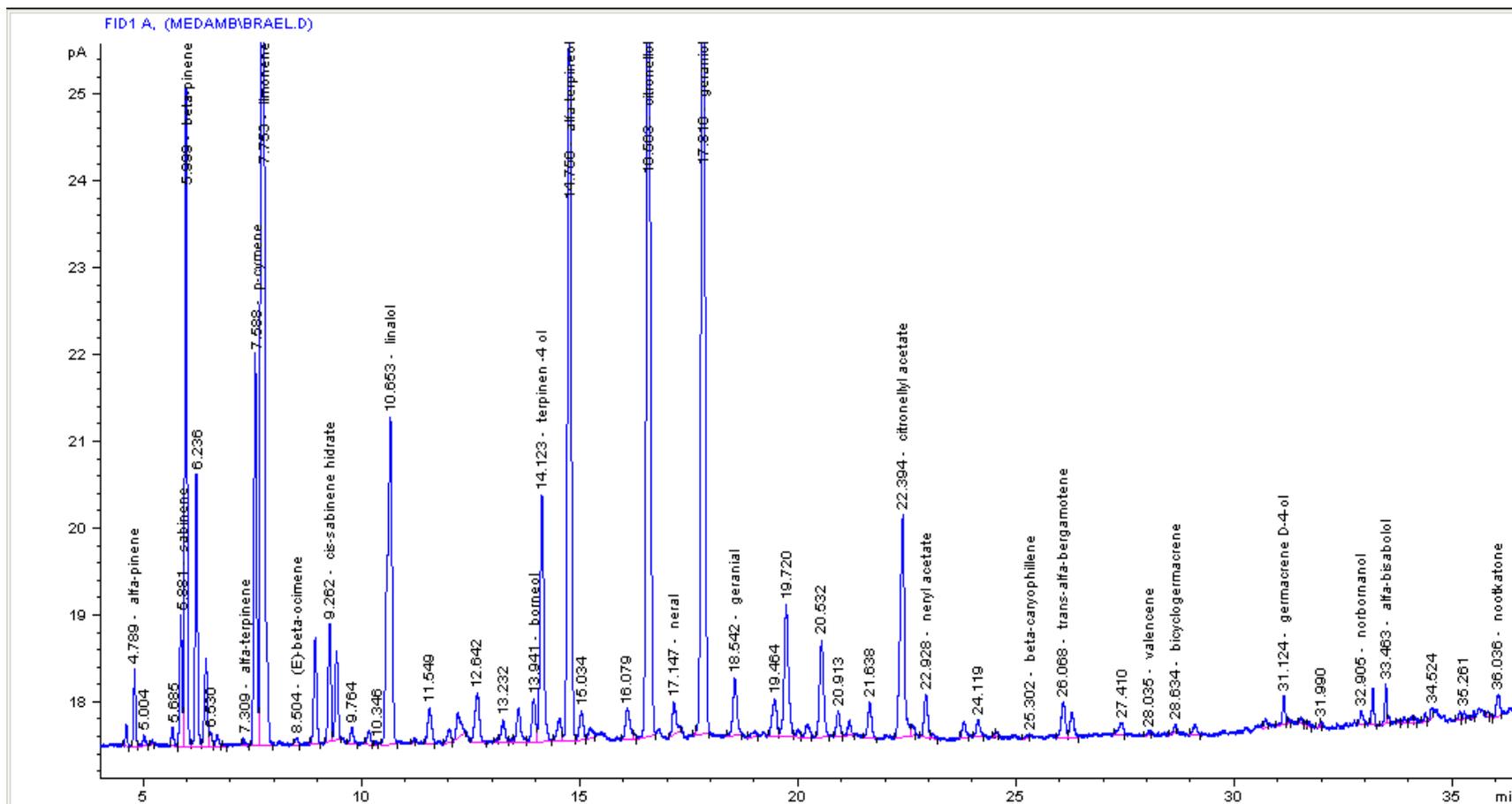


Figura 15. Cromatograma de la muestra de AEL Patrón.

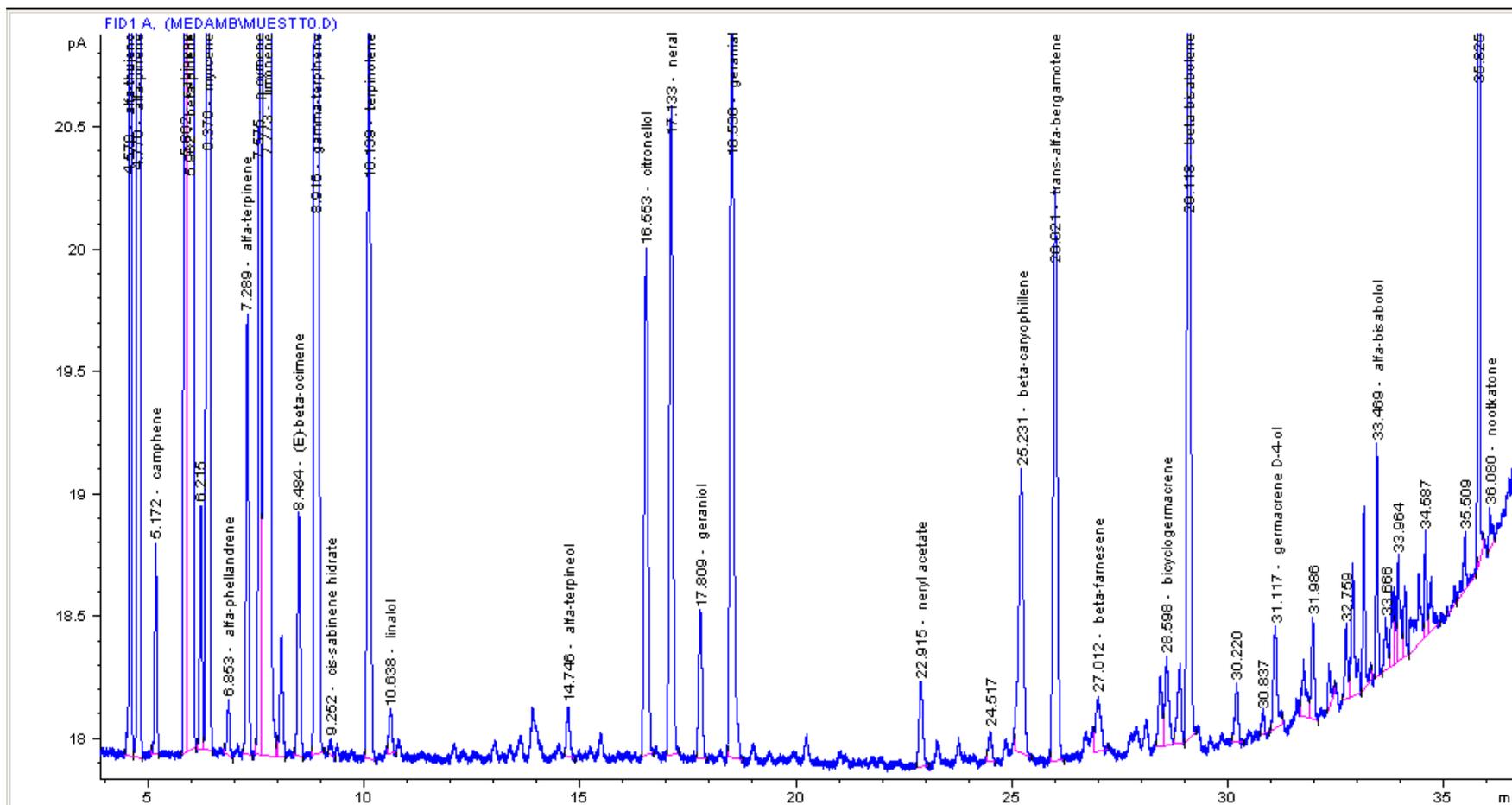


Figura 16. Cromatograma de la muestra de AEL T0

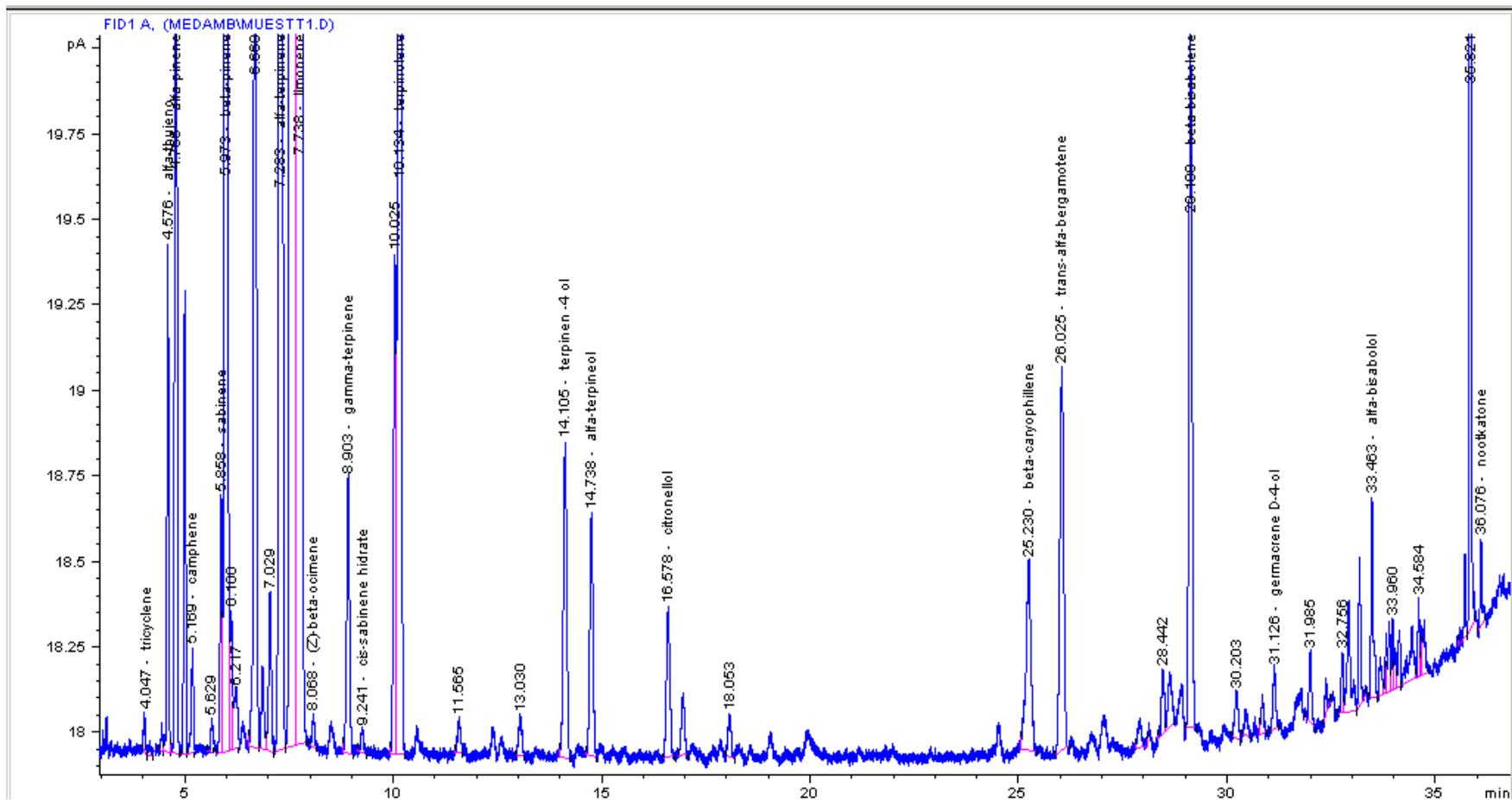


Figura 17. Cromatograma de la muestra de AEL T1

La Fig. 19 resume los cambios sufridos en la composición del AEL desde el T0 (d cero), pasando por el T1 (15 d) hasta llegar al T2 (30 d). El D-limoneno inicialmente posee una concentración relativa del 68,32%, a los 15 y 30 d disminuyó a 49,99 y 1,25% respectivamente. Esta merma coincide con un aumento proporcional en la concentración relativa de p-cimeno. Un estudio realizado en reactores anaeróbicos centrados en α -pineno (Grzona Liliana 2015) han dado a conocer que el D-limoneno en estas condiciones se transforma a γ -terpineno por un reordenamiento electrónico (son isómeros posicionales), el cual a su vez da lugar al p-cimeno por una deshidrogenación.

El γ -terpineno inicialmente poseía una concentración porcentual de 9,25% (Fig. 20) y al cabo de 15 d desapareció del AEL completamente. En ese período de tiempo el p-cimeno incrementó su concentración porcentual por encima del 30%. Este fenómeno se debe en parte a que si alguno de los factores que determinan la conservación del AEL tales como humedad, temperatura, luz o aire, no son mantenidos bajo las condiciones óptimas de almacenamiento se produce el envejecimiento del AEL caracterizado por la desaparición del γ -terpineno dando lugar a la consiguiente aparición del p-cimeno (Stanley et al., 1961) con el desarrollo de un olor característico. Si bien el aumento en la proporción del p-cimeno es mayor a la del γ -terpineno desaparecida, esto puede explicarse por la transformación de otros componentes presentes en el AEL como es el caso del D-limoneno, α -pineno, neral, geranial y sabineno. Clark y Bernhard (1960) informaron la presencia de p-cimeno en aceites de limón determinados por cromatografía gas-líquido (GLC); ellos propusieron que el citral (neral y geranial), principal componente aromatizante de los aceites de limón, es el precursor del p-cimeno en el aceite de limón deteriorado. Estudios realizados por Harder y Foss (1999) mostraron que monoterpenos, como el α -pineno, pueden degradarse bajo condiciones metanogénicas a p-cimeno. Cuando los cultivos fueron inoculados con sabineno, este también se transformó a p-cimeno.

Transcurridos los 15 y 30 d del ensayo la pérdida porcentual de la suma de los precursores de p-cimeno (D-limoneno, γ -terpineno, neral, geranial, α -pineno y sabineno) fue de 30,49 y 80,61% respectivamente y el aumento de p-cimeno fue de 32,80 y 79,62%.

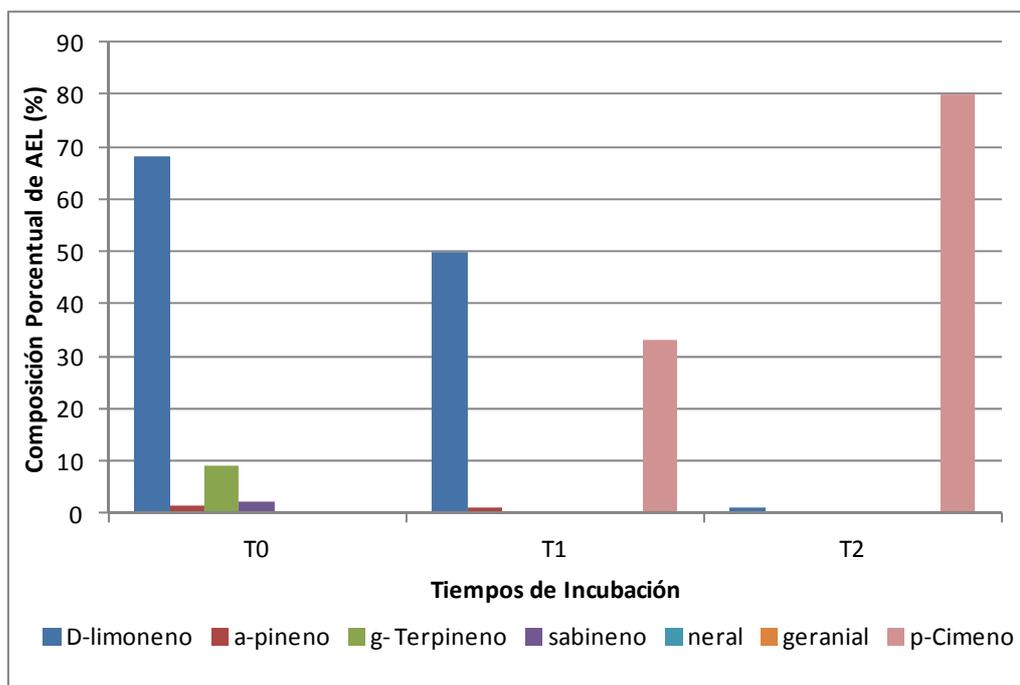


Figura 19. Composición porcentual del AEL a los distintos tiempos de incubación.

4.3.2.2. Ensayos con 800 ppm de AEL a distintos tiempos

El análisis de la composición por GC/FID del AEL en condiciones de digestión anaeróbica muestra una disminución de los componentes mayoritarios del AEL (D-limoneno, γ -terpineno, neral, geranial, α -pineno y sabineno) y un aumento proporcional del p-cimeno a los 30 d de haberse iniciado el ensayo (Fig. 20). A los 60 d de ensayo se observa que se mantienen los rangos de composición proporcional del AEL respecto a los 30 d.

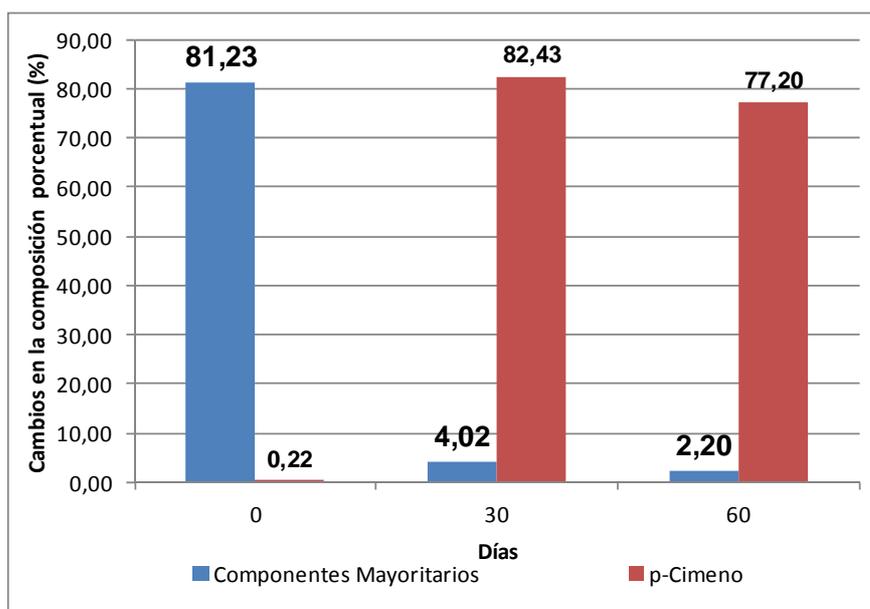


Figura 20. Composición porcentual de los componentes mayoritarios del AEL y del p-cimeno a los distintos tiempos de incubación.

4.3.2.3. Ensayos con 400 ppm de AEL sin la presencia de lodo

El resultado de la cromatografía gaseosa muestra que hubo una disminución en la proporción de D-limoneno, sin embargo esta fue más leve (68,32% a 22,38%) que en los ensayos anteriores cuando el lodo está presente. Se evidencia también que los productos de reacción generados no son los mismos; destacándose la presencia de alcoholes como linalol, terpin4-ol, citronellol, α -terpineol, nerol, α -bisabolol y geraniol. La proporción de alcoholes generados es semejante a la disminución de D-limoneno como se observa en la Fig. 21.

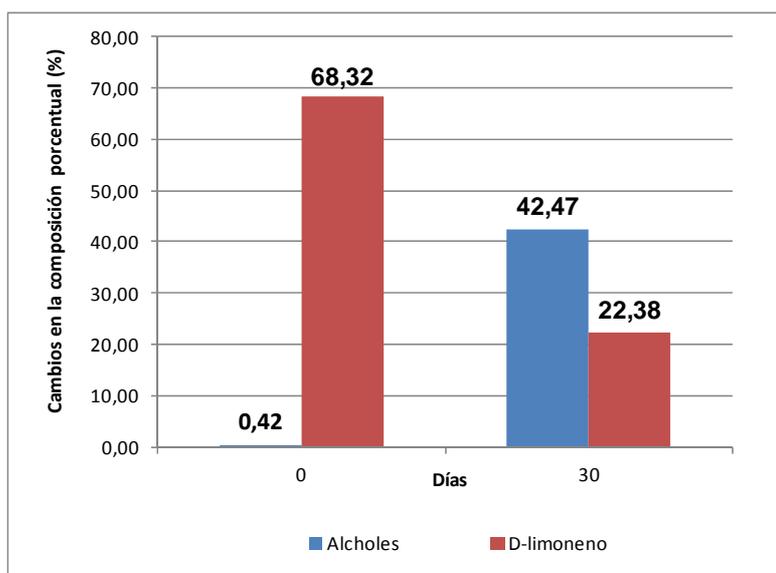


Figura 21. Composición porcentual de los alcoholes y el D-limoneno a los distintos tiempos de incubación.

En la Fig. 22 se observa que la disminución proporcional del D-limoneno al cabo de los 30 d es coincidente al incremento de alcoholes. En base a esto se puede inferir que el D-limoneno se oxida dando lugar a la generación de estos alcoholes.

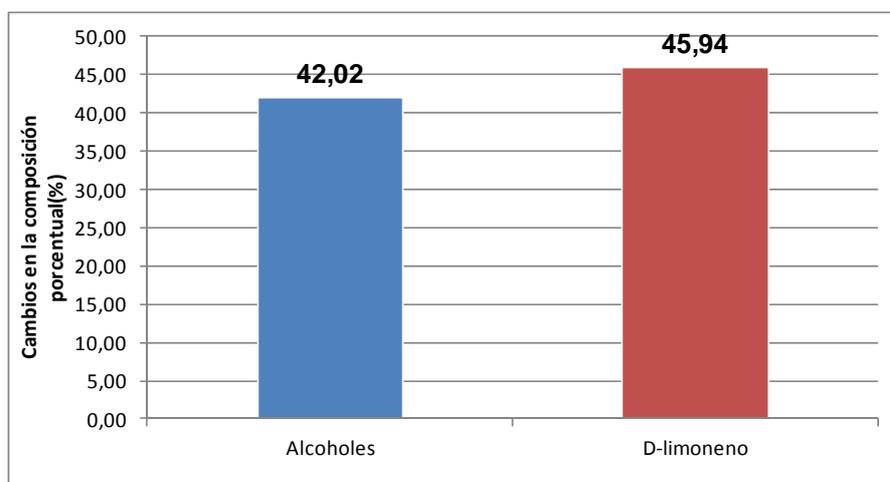


Figura 22. Cambios en la composición porcentual de los alcoholes y el D-limoneno a los 30 d de incubación.

A partir de estos resultados está claro que la presencia del lodo en el sistema es crucial para que los componentes del AEL se transformen en p-cimeno (cuando no hay lodo prácticamente el p-cimeno no se forma 0,28 a 3,49%). No solo eso, a demás cabe destacar que los porcentajes de desaparición del D-limoneno, γ -terpineno, neral, geranial, α -pineno y sabineno a los 30 d de incubación son superiores en presencia de lodo respecto a cuando no lo está (Tabla 5). Estas diferencias entre uno y otro podrían deberse a una adaptación de los microorganismos (bacterias hidrolíticas, acidogénicas, acetogénicas y metanogénicas) al estrés generado por la presencia de AEL en el sistema. Bajo esas condiciones modularían las transformaciones de D-limoneno, γ -terpineno, neral, geranial, α -pineno y sabineno a p-cimeno ya que este compuesto es el menos tóxico de todos. Esta característica se debe a que es termodinámicamente más estable que el resto al presentar la carga deslocalizada en el anillo y no presentar dobles enlaces no conjugados (más reactivos y por lo tanto tóxicos en ambientes anóxicos porque no se pueden oxidar y terminan constituyendo componentes recalcitrantes del sistema).

Componente	% de desaparición	
	CL	SL
D-limoneno	97,84 \pm 0,77	67,24
α -pineno	90,39 \pm 1,31	65,54
γ -Terpineno	99,66 \pm 0,27	88,54
Sabineno	95,83 \pm 6,46	56,89
Neral	100 \pm 0,00	0,00
Geranial	100 \pm 0,00	0,00

Tabla 5. Porcentajes de desaparición en presencia de lodos (CL) y sin lodos (SL).

4.4. Determinación del efecto bactericida o bacteriostático del AEL

4.4.1. Comportamiento del lodo sometido a concentraciones equivalentes al 50% de inhibición del AME

El porcentaje de recuperación del AME para el lodo sometido a una concentración de 400 ppm de AEL después del lavado fue de 30%. Esta recuperación de la actividad parece estar ligada a la desaparición del D-limoneno, ya que después de los primeros 15 días de ensayo donde se produjo una disminución del 30% de su composición porcentual (según los resultados mostrados en el apartado 4.3.1), es donde comienza a verse el aumento en la curva de producción del metano acumulado en función del tiempo (Fig. 25). El limoneno no tiene ningún grupo funcional disponible para la hidrólisis; su anillo de ciclohexeno y su grupo etileno son químicamente resistentes a la hidrólisis (Ruiz, Flotats, 2014) por lo que las bacterias hidrolíticas presentes en el medio no lo pueden degradar. Además, el *D*-limoneno es susceptible a la degradación oxidativa que resulta en la pérdida de su actividad antimicrobiana (Payán Saldívar, 2014), pero al encontrarnos en un

medio anaeróbico éste se considera un compuesto recalcitrante. Se ha demostrado que el D-limoneno inhibe a las bacterias metanogénicas y a las hidrolíticas acidogénicas, ya que su configuración molecular, con ramificaciones y un cierre de anillo le confieren un carácter tóxico, (Ruiz, Flotats, 2014).

El hecho que la recuperación de la actividad no haya sido total podría deberse a la presencia de p-cimeno al final del ensayo. El D-limoneno, β -pineno, α -terpineno, sabineno, α -pineno, neral y geranial en las condiciones del ensayo se convierten en p-cimeno (resultados mostrados en el apartado 4.3.2). En los compuestos no fenólicos, la actividad antimicrobiana está influenciada por el tipo de grupo alquilo; alqueno más activo que alquilo. Por lo tanto, el limoneno (con un grupo vinilo) es más activo que el p-cimeno (con un grupo alquilo) contra microorganismos (Ruiz, Flotats, 2014).

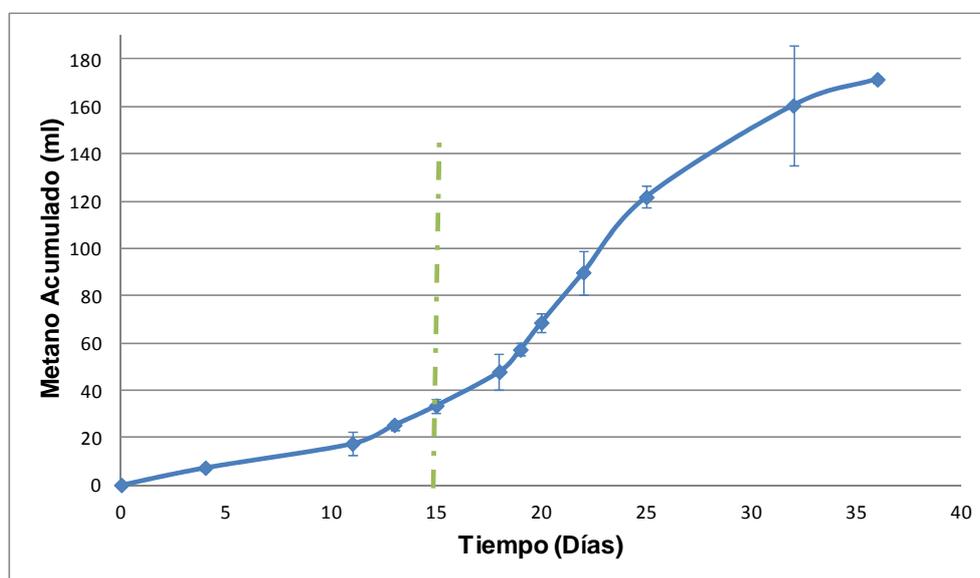


Figura 25. Producción de metano en función del tiempo, en el sistema inoculado con un lodo sometido a 400 ppm de AEL.

4.4.2. Comportamiento del lodo sometido a concentraciones equivalentes al 90% o más de inhibición del AME

El porcentaje de recuperación del AME fue del 66%. Esta recuperación es aproximadamente el doble respecto a la obtenida con 400 ppm de AEL. Esto podría deberse a que cuando la concentración inoculada en el sistema es de 800 ppm de AEL la transformación cuantitativa de D-limoneno a p-cimeno es mayor. La cromatografía gaseosa realizada al ensayo de 800 ppm de AEL evidenció la presencia de AEL aún después del lavado, por lo que éste no constituiría un método eficaz de eliminación de AEL y la recuperación de la actividad podría deberse a los cambios que sufre en su composición el AEL.

Conclusiones

- El AEL muestra un poder de inhibición lineal con respecto a su concentración, alcanzando una inhibición del 50% del AME a una concentración de 400 ppm.
- La composición inicial del AEL no permanece constante a lo largo del ensayo en los viales evidenciándose profundos cambios en su composición final (D-limoneno, γ -terpineno, neral, geranial, α -pineno y sabineno se transforman a p-cimeno un compuesto menos tóxico). Estos cambios serían promovidos por el sistema debido al estrés al que están sometidos los microorganismos presentes en el lodo debido a la presencia del AEL.
- El AEL en un ambiente anaeróbico se comportaría como un agente bacteriostático frente a las bacterias metanogénicas debido a que se observa una recuperación del AME a medida que el D-limoneno, γ -terpineno, neral, geranial, α -pineno y sabineno se convierten en p-cimeno.

Bibliografía

- Ahring B.K., Ibrahim A.A., Mladenovska Z. (2001). Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Research*, 35(10): 2446-2452.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Kohli, R.K., Kaur, S., (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256, 2166-2174.
- Beveridge, T.J., Graham, L.I., 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* 55, 684–705.
- Blonskaja, V., Menert, A., Vilu, R. (2003). Use of two-stage anaerobic treatment for distillery waste. *Adv Environ Res* 7:671–678.
- Burt, S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1914–1920.
- Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A. (2006). Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in vitro systems. *Journal of Dairy Science* 89, 2649-2658.
- Chávez, C., Castillo, R., Dendooven, L., Escamilla-Silva, E. M. (2005). Poultry slaughter wastewater treatment with an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) Reactor. *Bioresource Technology* 96:1730–1736.
- Chen Y., Cheng J. J., Creamer K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99, 4044-4064.
- Dabbah R., Edwards V. M., Moats W. A. (1970). Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Applied Microbiology* 19, 27-31.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2745– 2749.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K., (1993). Maximum COD loading capacity in UASB reactors at 37C. *Journal of the Environmental Engineering Division ASCE* 119 (1), 103–119.

Fang H.H.P., Chui H.K., Li Y.Y., y Chen T. (1994). Performance and granule characteristics of UASB process treating wastewater with hydrolyzed proteins. *Water Sci Technol* 30:55–63.

Fisher, K., Phillips, C. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1232–1240.

Franzios, G., Mirotsoy, M., Hatziapostolou, E., Kral, J., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P. (1997). Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2690–2694.

Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Frag. J.* 14, 322–332.

Guiot, S.R., Lavole, L., Hawari, J.A., Samson, R. (1991). Effect of NSSC spent liquor on granule formation and specific microbial activities in upflow anaerobic reactors. *Water Sci Technol* 24:139–148.

Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R., (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 194–198.

Heijnen, J.J., Mulder, A., Enger W., Hoeks F. (1989). Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in wastewater treatment. *J. Chem. Eng.* 41:37-50.

Helander I.M., Alakomi H-L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J., Gorris L., von Wright A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3590-3595.

Hwu C-S., Donlon B., Lettinga G. (1996). Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Water Science and Technology* 34 (5-6), 351-358.

Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoglu, M., Husnu Can Baser, K., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem.* 93, 551–556.

Kaparaju P., Serranoa M., Angelidaki I. (2009). Effect of reactor configuration on biogas production from wheat straw hydrolysate. *Bioresource Technology*, 100: 6317- 6323.

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essen. Oil Res.* 1, 119–128.

Langenheim, J.H., 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20, 1223-1280.

Lettinga, G., van Velsen, A., Hobma, S., De Zeeuw, W., Klapwijk, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (UASB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 22: 699-734.

Lettinga G., van Velsen A., Hobma S., De Zeeuw W., Klapwijk A. (1980). Use of upflow sludge blanket (UASB) reactor concept for biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 734-1701.

Lettinga, G., Hulshoff Pol, L.W. (1991). UASB—process design for various types of wastewaters. *Water Sci Technol* 24:87–107.

Lettinga, G. (1996). Sustainable integrated biological wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 33(3): 85-98.

Lin B., Lu Y., Wang J.H., Liang Q., Liu J.X. (2012). The effects of combined essential oils along with fumarate on rumen fermentation and methane production in vitro. *Journal of Animal and Feed Sciences* 21, 198–210.

Mata-Alvarez, J. (Ed.). (2003). Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes (p. 42). London, UK: IWA.

Mittal, A. (2011). Biological Wastewater Treatment. *Water Today*, 32-44.

Ostrem K. (2004). Greening waste: anaerobic digestion for treating the organic fraction of municipal solid wastes. Ms Thesis. Earth Engineering Center Columbia University, 6-9.

Rittman B., Mc Carty P. (2001). *Biología del medio ambiente: principios y aplicaciones*. Sexta edición. Editorial McGraw-Hill, 626-647. Madrid, España.

Ruiz B., Flotats X. (2014). Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. *Waste Management* 34, 2063-2079.

Schnell S., Schink B. (1992). Anaerobic degradation of 3-aminobenzoate by a newly isolated sulfate reducer and a methanogenic enrichment culture. *Archives of microbiology*, 158(5): 328-334.

Sierra-Alvarez R., Lettinga G. (1990). The Methanogenic Toxicity of Wood Resin Constituents. *Biological Wastes* 33, 211-226.

Sikkema J., M. de Bont J. A., Poolman B. (1995). Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59, 201-222.

Sinclair W. B. (1984). The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits. Division of agriculture and natural resources. Ed. University of California.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against the important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 118–122.

Stanley, W.L., Ikeda, R.M., and Cook, S. (1961). Hydrocarbon composition of lemon oils and its relationship to optical rotation. *Food Technol.* 15(9):381-85.

Suutari, M., Laakso, S., 1994. Microbial fatty acid and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* 20, 285–328.

Thomas, J.M., Yordy, J.R., Amador, J.A., Alexander, M., 1986. Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 290–296.

Uyanik S. (2003). Granule development in anaerobic baffled reactors. *Turkish Journal Environmental Engineering Science*, 27: 131-144.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J., 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* 174, 233–238.

Ultee, A., Bennik, M.H., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–1568.

van Haandel A.C., Lettinga G. (1994). *Anaerobic sewage treatment: A practical guide for regions with a hot climate*. Ed: John Wiley & Sons. Chichester, UK.

ATC, Asociación Tucumana de Citrus (2016). Publicado al día 25 de noviembre en el sitio web: <http://www.atcitrust.com/noticia/6014>

Bruzzone I. (2010). Aceite esencial de limón. *Alimentos argentinos*. Publicado al día 15 de Octubre en el sitio web: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/46/cadenas/r46_07_AceiteLimon.pdf

Cerutti M., Neumayer F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. Publicado al día 15 de Octubre en el sitio web:

<file:///Users/Alquimista/Downloads/Dialnet-IntroduccionALaObtencionDeAceiteEsencialDeLimon-3331453.pdf>

EEAOC, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres de Tucumán (2015). Publicado al día 1 de noviembre en el sitio web: <http://www.eeaoc.org.ar/contenidos/1084/Sup-rto-limon-2015.html>

Machado W. D., Urueña M. R., Vera van Gelderen E. M., Alonso M. A. (2010). Biodigestión anaeróbica a escala piloto industrial de residuos semisólidos generados en la industrialización del limón. Procesos Industriales: Ambiente e Industria Citrícola. Publicado al día 13 de Octubre en el sitio web: <http://www.eeaoc.org.ar/upload/contenido/pdf/20120313174600000000.pdf>

Sota G. A. (2007). Industria Citrícola: Costos Conjuntos y Costeo Variable Perfeccionado. XXX Congreso Argentino de Profesores Universitarios de Costos. Publicado al día 13 de Octubre en el sitio web: http://www.iapuco.org.ar/trabajos/xxx/Trabajo_015.pdf

Benavides Salazar, O. X. (1998). Arranque de un reactor U. A. S. B. para el tratamiento de aguas residuales de cervecería. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. Ingeniería Química.

Caicedo Messa, F. J. (2006). Diseño, construcción y arranque de un reactor U.A.S.B. piloto para el tratamiento de lixiviados. Universidad Nacional de Colombia, Manizales. Colombia.

Chamy M. R. (2005). Avances en Biotecnología Ambiental: Tratamiento de residuos líquidos y sólidos. Ediciones universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Segunda edición, p.18.

Davies, F.S., Albrigo, L.G., 1999. *Cítricos*. Editorial Acribia. Madrid, España.

Díaz-Báez M., Espitia S., Molina, F. (2002). Digestión anaerobia: una aproximación a la tecnología. Editorial Unibiblios. Bogotá, Colombia.

Maguna F. P., Romero A. M., Garro O. A., Okulik N. B. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Resumen E. 057 N° 355. Universidad Nacional del Nordeste.

Marqueti F. (2013). Arranque y seguimiento del proceso de granulación en un reactor UASB utilizando vinaza como sustrato. Trabajo para obtener el título de Licenciado en Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.

Maté J., Periago P. M., Palop A. (2014). Efecto combinado de nisina y *D*-limoneno sobre *Listeria monocytogenes* aplicados mediante nanoemulsiones. III Workshop en Investigación Agroalimentaria. Universidad Politécnica de Cartagena.

Molina C. F. (2013). Tratamiento anaeróbico de vinaza mediante un reactor de lecho empacado. Tesis para optar al título de Máster en Ingeniería Ambiental. Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Tucumán.

Noyola A. (1994). Escalado de biorreactores anaeróbicos. In Conferencia, Instituto de Ingeniería, UNAM, pp. 20. México, DF.

Pasteris A. (2014). Efectos del agregado de floculante sobre el funcionamiento de reactores UASB. Trabajo para obtener el título de Licenciado en Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.

Payán Saldívar L. E. (2014). Evaluación del efecto combinado de los antimicrobianos naturales nisina, *D*-limoneno, glucósido de steviol y citral sobre *Listeria monocytogenes* en alimentos de origen vegetal. Máster Universitario en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. Universidad Politécnica de Cartagena.

Storti, L., Bevilacqua, M. (2011). Complejo Citrícola: Limón, producción regional por complejos productivos, MECON (Ministerio de Economía y Finanzas Públicas).

