

EFFECTO DE ACESULFAME-K SOBRE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE BARROS ACTIVADOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CONTENIENDO MATERIA ORGÁNICA

LOBO, Ctia C¹; BERTOLA, Nora C¹; ZARITZKY, Noemí E^{1,3}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA - CONICET, UNLP, CIC)

²Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata
Calle 47 y 116- La Plata (1900); zaritzky@ing.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Las industrias de alimentos, bebidas y tabaco en Argentina representan el 21.4% del total de industrias en el país. Durante los procesos de elaboración de alimentos se utilizan grandes volúmenes de agua y se generan elevadas cantidades de agua residual. Dentro de las industrias de alimentos, la industria de bebidas no alcohólicas produce aguas residuales que provienen de operaciones de fabricación como lavado de frutas, envasado, lavados de tanques y envases reutilizables, etc. Asimismo, en algunos casos las aguas residuales incluyen productos devueltos del mercado debido a la caducidad o a fallas en el proceso de embotellado (por ejemplo falta de gas).

El agua residual proveniente de estas industrias es una mezcla de productos químicos que incluyen alto contenido de azúcares 10-12% p/v (glucosa, fructosa, sacarosa), conservantes (ácido fosfórico, benzoato de sodio, sorbato de potasio), edulcorantes (ciclamato, aspartamo, acesulfame K, sucralosa) y otros aditivos como flavonoides (Tripoli y col., 2007). Por esta razón dichas aguas residuales poseen una elevada carga orgánica y a su vez compuestos recalcitrantes como conservantes y edulcorantes no calóricos. Estos edulcorantes no calóricos son utilizados en cantidades considerables en alimentos y bebidas; luego de su ingestión la mayoría pasa a través del organismo sin ser metabolizados y son excretados. Debido a ello, concentraciones traza de estos compuestos han sido encontrados en aguas superficiales en Europa (Loos y col., 2009). Los edulcorantes no calóricos como acesulfame K (ACE) y sucralosa han sido clasificados como contaminantes emergentes (Lange y col., 2012). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) ha definido a los contaminantes emergentes como nuevas sustancias químicas sin regulación, dado que la toxicidad e impacto de estas sustancias sobre el medioambiente se encuentran en discusión. Estos compuestos son persistentes dado que se descargan a los cursos de agua en forma continua. Sin embargo, cabe destacar que en el caso particular de edulcorantes no calóricos el estudio de sus propiedades toxicológicas ha demostrado su persistencia y acumulación en ambientes acuáticos (Tollefsen y col., 2012). El ACE es una sal de potasio con un anillo aromático (6-metil-1,2,3-oxatiazin-4-ona-2, 2-dióxido). Alrededor de 90 países en el mundo aprobaron su empleo en bebidas y alimentos horneados (Kroger y col., 2006), es 200 veces más dulce que la sacarosa y en el Código Alimentario Argentino posee la identificación E950. Se utiliza en la mayoría de las líneas de bebidas light en el mundo, en marcas comerciales de primera línea en una concentración de 120 – 500 mg/L. ACE es generalmente resistente a hidrólisis (Lange y col., 2012) y presenta una incompleta remoción por ozonización (Scheurer y col., 2012). Por otro lado, se ha demostrado que el empleo de tratamientos fisicoquímicos como radiación UV genera intermediarios con una toxicidad mayor que ACE (Sang y col., 2014). Recientemente se ha informado que barros activados de plantas de tratamiento de aguas residuales domiciliarias han demostrado una capacidad para la biodegradación de ACE (Castronov y col., 2017). Por ello es necesario estudiar el efecto de ACE sobre la actividad de barros activados. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad

respiratoria de barros activados en presencia de ACE y la posibilidad de biodegradación de este compuesto como única fuente de carbono y energía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Las sales inorgánicas fueron de grado reactivo Anedra (San Fernando, Argentina). El suero de queso fue obtenido de Food SA (Villa Maipu, Argetina) y ACE fue donado por Grupo Saporiti SA (Buenos Aires, Argentina). La fórmula química de ACE es $C_4H_4KNO_4S$ (Figura 1); su punto de fusión: 225 °C, masa molar: 201.242 g/mol; densidad: 1.81 g/cm³, solubilidad en agua 270 g/L a 20°C.

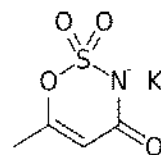


Figura 1.
Estructura
química de
ACE

Barros Activados y condiciones de cultivo

Los barros activados fueron cultivados en un reactor semicontinuo de escala laboratorio (1 L); el tiempo de residencia hidráulico fue de 3.3 días y el tiempo de residencia celular de 20 días. La concentración de oxígeno disuelto en el reactor fue mayor a 4 mgO₂ L⁻¹ y el pH final fue ajustado en 8.0 ± 0.05 mediante la adición de NaOH o HCl. El reactor fue alimentado con un medio de cultivo sintético que representaba un efluente de la industria láctea utilizando suero de queso como única fuente de carbono y energía. La composición del medio de cultivo fue la siguiente: suero de queso deshidratado 1000 mg, (NH₄)₂SO₄ 940 mg, K₂HPO₄ 500 mg, and KH₂PO₄ 250 mg; todos los componentes fueron diluidos en un litro de agua; la Demanda Química de Oxígeno (DQO) inicial del medio fue de 1000 mg DQO/L (Lobo y col, 2016). Cuando se alcanzó el estado estacionario, los barros activados fueron utilizados como fuente de biomasa para los ensayos de biodegradación de ACE y respirometría.

El ensayo de biodegradación de ACE por barros activados fue realizado en un reactor semicontinuo de 1L de volumen, con el siguiente medio de cultivo: 130 mg/L de ACE, (NH₄)₂SO₄ 226 mg/L, K₂HPO₄ 500 mg/L, KH₂PO₄ 250 mg/L MgSO₄·7H₂O 25.2 mg/L, MnSO₄·H₂O 2.52 mg/L, CaCl₂ 2 mg/L, and FeCl₃ 1.2 mg/L; el pH fue ajustado a 8.0 ± 0.05 mediante la adición de NaOH o HCl.

Respirometría

Una vez obtenidas condiciones de operación estables en el reactor se procedió a evaluar la actividad respiratoria del consorcio microbiano en presencia de glucosa (GLC) (50 mgDQO/L), ACE (50 – 2000 mg/L) y en forma conjunta de ambos componentes (GLC+ACE). La concentración de oxígeno disuelto fue determinada mediante un electrodo de oxígeno (YSIProODO™) conectado a un computadora; se adquirió 1 dato por segundo. La muestra de barros activados en presencia de los compuestos a analizar fue aireada hasta obtener condiciones de saturación de oxígeno; luego se detuvo la aireación y se registró el descenso de la concentración de oxígeno debida a la actividad respiratoria de los barros activados. Se determinó la velocidad específica de respiración endógena (q_{end} ; mgO₂/(g_{SST}L)) en ausencia de un sustrato oxidable. Posteriormente, se midió la velocidad específica de respiración exógena (q_{ex} ; mgO₂/(g_{SST}L)) que se corresponde con la oxidación del sustrato. Se determinó la velocidad específica de respiración exógena para glucosa (q_{exGLC}), para ACE (q_{exACE}) y para la mezcla GLC+ACE ($q_{exGLC+ACE}$).

Procedimientos Analíticos

La concentración de biomasa fue determinada como sólidos suspendidos totales (SST, g L⁻¹); la concentración de oxígeno disuelto fue determinada mediante un electrodo de oxígeno (YSIProODO™) y la concentración de materia orgánica fue medida como DQO. La concentración ACE se midió mediante absorbancia a 225 nm por espectroscopía UV-Vis en espectrofotómetro Shimadzu AA-6650.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biodegradación de ACE como única fuente de carbono y energía

Se analizó la biodegradación de ACE por parte de barros activados. En la Figura 2a se puede observar que no hubo una reducción de la concentración de ACE en el biorreactor por un período de 360 horas. Esto pudo ser debido a que los barros activados provenientes del biorreactor alimentado con suero de queso como materia orgánica no fueron capaces de sintetizar las enzimas necesarias para la metabolización del compuesto. Sin embargo, la estructura de los flóculos y organismos presentes (tales como rotíferos, nemátodos, etc) en los barros del biorreactor con efluente simulado de industria láctea (Figura 2b) fue similar a la observada para el consorcio microbiano expuesto a ACE por 360 h (Figura 2c). Por lo cual se puede establecer que si bien ACE no pudo ser degradado por los barros activados, su carácter recalcitrante no afectó a los microorganismos presentes en la biomasa.

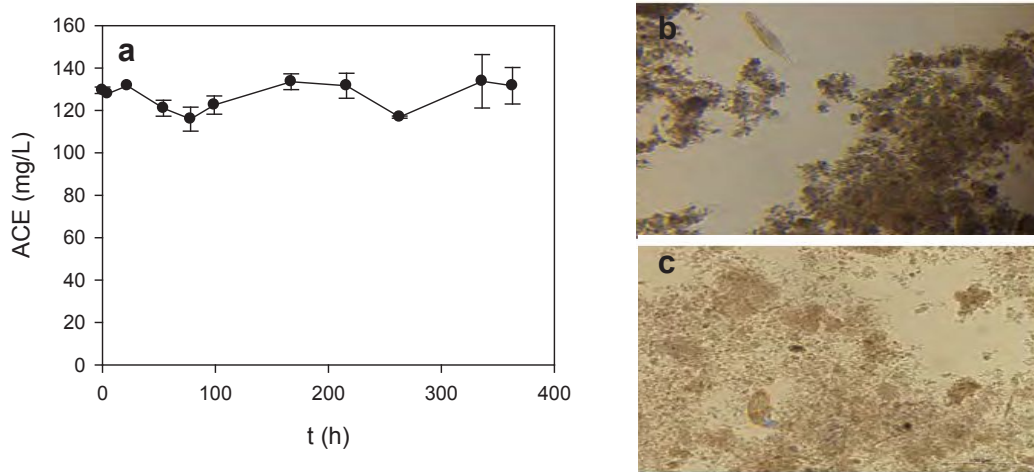


Figura 2.a. Concentración de ACE en función del tiempo para la biodegradación por barros activados de 130mg/L de ACE como única fuente de carbono y energía. b. Barros activados provenientes del reactor biológico con medio de cultivo simulado de industria láctea. c. Barros activados provenientes del reactor biológico con 130 mg/L de ACE.

Actividad respiratoria de barros activados en presencia de glucosa (GLC) y AcesulfameK (ACE)

La GLC y el suero de queso son considerados sustratos biogénicos es decir que son fácilmente biodegradables por ello se realizó el análisis de la actividad respiratoria de ACE en comparación con GLC. En la Figura 3 se presenta la curva obtenida para la disminución de la concentración de oxígeno en función del tiempo para barros activados en ausencia de sustrato (respiración endógena) y en presencia de GLC y la mezcla GLC+ACE. Las curvas obtenidas se ajustaron a ecuaciones lineales (Figura 3a). Las pendientes obtenidas se correspondieron a la velocidad de respiración endógena (en ausencia de sustrato para el mantenimiento de funciones celulares) y velocidades de respiración exógena (correspondiente a la oxidación de los sustratos).

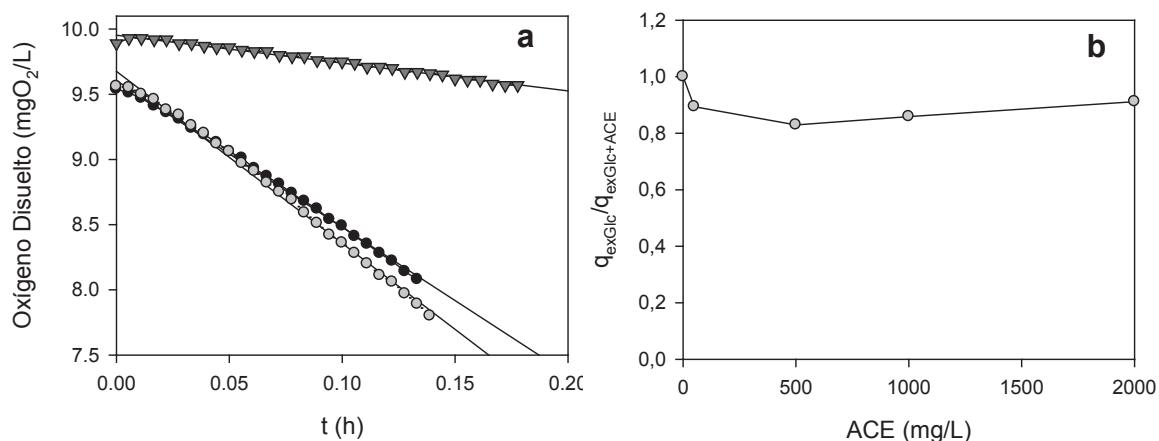


Figura 3.a. Disminución de la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo debido a (∇), respiración endógena y respiración debida a la oxidación de sustrato (\bullet) GLC y (\bullet) mezcla de GLC + ACE. b. Disminución de la actividad respiratoria de los barros activados que biodegradan glucosa en presencia de distintas concentraciones de ACE ($q_{\text{exGLC+ACE}}$; mgO₂/(g_{SSTL})).

Para poder evaluar el efecto de ACE sobre la actividad respiratoria de GLC los resultados fueron expresados como el cociente entre la velocidad específica de respiración exógena en presencia de 50 mg/L de GLC (q_{exGLC} ; mgO₂/(g_{SSTL})) y la velocidad específica de respiración exógena de 50 mg/L de GLC con concentraciones crecientes de ACE ($q_{\text{exGLC+ACE}}$; mgO₂/(g_{SSTL})). En la Figura 3b puede observarse que se produjo una disminución de aproximadamente 20 % de la actividad respiratoria de los barros activados en presencia de ACE. Por lo tanto se pudo determinar que la presencia de ACE afectó la actividad respiratoria de la flora microbiana para el rango de concentraciones de ACE analizadas (50-2000 mg/L).

Por otro lado se determinó la actividad respiratoria de la flora microbiana frente a ACE como único sustrato oxidable. Como puede observarse en la Figura 4 los valores de velocidad específica de respiración exógena en presencia de ACE (q_{exACE}) fueron inferiores a los obtenidos para GLC. El perfil de q_{exACE} en función de la concentración de ACE exhibió una curva característica de un sustrato no inhibitorio (Figura 4). La ecuación de Monod ha sido utilizada para describir la degradación de una amplia variedad de sustratos que limitan la velocidad de respiración pero no son inhibitorios.

Asumiendo que la velocidad específica de respiración endógena (q_{en}) es constante con respecto a la concentración de sustrato (S), la velocidad específica de respiración exógena (q_{ex}) puede expresarse según la ecuación de Monod como:

$$q_{\text{ex}} = q_{\text{exm}} \frac{S}{k_s + S} \quad (1)$$

Donde q_{exm} corresponde a la velocidad de respiración exógena máxima correspondiente a la oxidación del sustrato, k_s es la constante de saturación y S es la concentración de sustrato. Los valores obtenidos de q_{ex} para ACE se ajustaron satisfactoriamente a la ecuación de Monod. Los parámetros calculados fueron $q_{\text{exm}} = 1.84 \pm 0.07$ mgO₂/(g_{SSTL}) y $K_s = 5.69 \pm 1.77$ mg ACE/L ($r^2=0.97$).

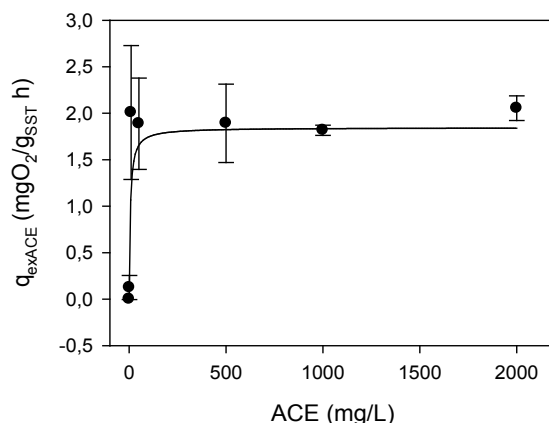


Figura 4. Variación de la velocidad específica de respiración de los barros activados para ACE (q_{exACE} ; mgO₂/(g_{SST}·h)) en función de la concentración de ACE (mg/L). La línea continua corresponde al ajuste a la ecuación de Monod.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se analizó la posibilidad de biodegradación de ACE y se analizó la actividad respiratoria de los barros activados ante la presencia de concentraciones crecientes de este contaminante emergente. Si bien no se observó biodegradación (no se registró una disminución de la concentración de ACE en función del tiempo), la estructura de los flóculos y organismos presentes (tales como rotíferos, nemátodos, etc) en los barros activados del reactor con ACE fue similar a la observada para el consorcio microbiano con suero de queso, es decir su carácter recalcitrante no afectó al sistema microbiano.

Además se estudió el efecto de ACE sobre la actividad respiratoria de los barros activados observándose que ACE disminuyó en un 20 % dicha actividad respiratoria respecto a la medida en presencia de GLC como único sustrato. La curva de q_{exACE} en función de la concentración de ACE se ajustó satisfactoriamente a la ecuación de Monod (que se aplica a sustratos que limitan la velocidad de respiración pero no resultan inhibitorios) y se obtuvieron los parámetros de biooxidación. A través de estos resultados se puede estimar que la actividad respiratoria observada puede corresponder a una oxidación parcial del compuesto dado que no se observó una disminución de la concentración de ACE en el biorreactor. Por lo tanto se puede concluir que para la remoción de ACE sería necesario combinar estrategias aplicando una etapa previa de tratamiento fisicoquímico seguido de un tratamiento biológico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), la Fundación Bunge y Born, Argentina y la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

BIBLIOGRAFÍA

- Castronovo, S., A. Wick, M. Scheurer, K. Nödler, M. Schulz and T. A. Ternes (2017). "Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters." *Water Research* 110: 342-353.
- Kroger, M., Meister, K. y Kava, R. (2006). "Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5(2): 35-47.
- Lange, F., Scheurer, M. y Brauch, H.-J. (2012). "Artificial sweeteners—a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403(9): 2503-2518.
- Lobo, C. C., N. C. Bertola and E. M. Contreras (2016). "Approximate expressions of a SBR for wastewater treatment: Comparison with numeric solutions and application to predict the

biomass concentration in real cases." *Process Safety and Environmental Protection* 100: 65-73.

Loos, R., Gawlik, B. M., Boettcher, K., Locoro, G., Contini, S. y Bidoglio, G. (2009). "Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method." *Journal of Chromatography A* 1216(7): 1126-1131.

Sang, Z., Jiang, Y., Tsoi, Y.-K. y Leung, K. S.-Y. (2014). "Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities." *Water Research* 52(0): 260-274.

Scheurer, M., Godejohann, M., Wick, A., Happel, O., Ternes, T. A., Brauch, H. J., Ruck, W. K. L. y Lange, F. T. (2012). "Structural elucidation of main ozonation products of the artificial sweeteners cyclamate and acesulfame." *Environmental Science and Pollution Research* 19(4): 1107-1118.

Tollefsen, K. E., Nizzetto, L. y Huggett, D. B. (2012). "Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment." *Science of The Total Environment* 438(0): 510-516.

Tripoli, E., Guardia, M. L., Giammanco, S., Majo, D. D. y Giammanco, M. (2007). "Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review." *Food Chemistry* 104(2): 466-479.

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acesulfame_K#section=Spectral-Properties.