

## EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL CLORO EN MICROORGANISMOS FILAMENTOSOS Y FLOCULANTES MEDIANTE TÉCNICAS RESPIROMÉTRICAS

### **Alejandro H. Caravelli**

Licenciado en Biología de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Becario de Formación de Posgrado del CONICET, Argentina.

### **Edgardo M. Contreras**

Bioquímico de la UNLP, Becario de Formación Superior de la UNLP y docente de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, Argentina.

### **Leda Giannuzzi**

Licenciada y Doctora en Química de la Universidad de Buenos Aires (UBA), Investigador Adjunto del CONICET, Profesor Adjunto de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, Argentina.

### **Noemi E. Zaritzky**

Ingeniero Químico de la UNLP y Doctor en Ciencias Químicas de la UBA, Investigador Principal del CONICET, Profesor Titular de la Facultad de Ingeniería de la UNLP, Argentina.

**Dirección:** Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET - Fac. Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. 47 y 116 (1900) La Plata. Argentina.  
FAX: (0221) 425-4853 E-mail: [zaritzky@volta.ing.unlp.edu.ar](mailto:zaritzky@volta.ing.unlp.edu.ar).

## **RESUMEN**

El empleo de plantas de barros activados es una metodología ampliamente utilizada en el tratamiento biológico de efluentes líquidos. Uno de los problemas que ocurre con frecuencia es el denominado bulking filamentoso, siendo la cloración un método de remediación comúnmente utilizado.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del cloro sobre un microorganismo filamentoso (*Sphaerotilus natans*) y uno floculante (*Acinetobacter anitratus*) mediante el empleo de una técnica respirométrica a los efectos de evaluar la supervivencia relativa de ambos microorganismos.

Los resultados hallados indican que el cloro agregado reacciona con el amonio presente en el sistema rápidamente formándose cloraminas las cuales son las responsables del efecto inhibitorio. Asimismo, se propuso una ecuación cinética para interpretar la acción del cloro sobre *S. natans*. Se observaron diferencias importantes en la sensibilidad de los microorganismos estudiados frente a la cloración. *S. natans* resultó ser más susceptible a la acción del cloro a dosis bajas que el microorganismo floculante *A. anitratus*.

Sobre la base de los resultados obtenidos se concluye que la diferente susceptibilidad de *S. natans* y *A. anitratus* frente al cloro es un aspecto importante a tener en cuenta en el 5(ta)-r-99(V245()-86(s)3((e)-88(la)n)6(a)-88(ec)-3s

parecen estar más expuestos a la acción de los compuestos químicos oxidantes respecto de los floculantes a causa de su mayor relación superficie-volumen y a su ubicación en los flóculos debido a que se extienden desde la superficie de los mismos hacia el licor de mezcla (van Leeuwen, 1992).

Cuando se emplea cloro como método no específico de control del bulking filamentoso debe considerarse la supervivencia relativa de microorganismos de tipo floculante y filamentoso a las diferentes dosis ensayadas. Si bien la cloración es un método muy efectivo en la inhibición del crecimiento de microorganismos filamentosos, no es selectivo ya que afecta también a microorganismos floculantes (Neethling y col., 1985a) y por lo tanto es muy importante la estrategia de dosificación del cloro a fin de lograr remediar el bulking sin afectar la eficiencia de la planta. Usualmente la cloración se inicia con concentraciones bajas (menores a 5 mg/L en el tanque de aireación) siendo incrementadas según sea necesario. En diferentes plantas de barros activados estudiadas por Neethling (1985b) las dosis de cloro empleadas para el control del bulking oscilaron en el rango de 0.7 a 20 mg/L y se recomienda que las concentraciones de cloro no deben exceder los 35 mg/L. Otros estudios (Lakay y col., 1988) informan dosis de 8 mgCl<sub>2</sub>/gSSV para el control de bulking filamentoso. Sin embargo, la dosificación de cloro en plantas de tratamiento sigue siendo empírica.

Normalmente en sistemas de barros activados la concentración de amonio resulta suficiente para que el cloro libre (HOCl y OCl<sup>-</sup>) se encuentre como cloraminas. Si bien las cloraminas, también denominadas cloro combinado, tienen menor poder bactericida que el cloro libre presentan la ventaja de ser más persistentes (Neethling y col. 1985b).

El efecto del cloro sobre los microorganismos filamentosos y floculantes ha sido evaluado mediante diferentes técnicas. Se ha propuesto el uso de ATP para medir la actividad microbiana con resultados no concluyentes. En estudios de cultivos puros de microorganismos filamentosos y floculantes, Neethling y colaboradores (1985a y 1985b) no pudieron establecer a partir del uso de ATP, si efectivamente los microorganismos filamentosos son relativamente más sensibles a la acción bactericida de la monocloramina. En el último de estos estudios el recuento en placa fue mucho más sensible que las medidas de ATP en la determinación de la resistencia de las bacterias filamentosas a la cloración (Neethling y col. 1985b).

Recientemente se ha empleado la medición de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR, "oxygen uptake rate"), también llamada respirometría, como un indicador de la actividad de microorganismos aeróbicos (Ros, 1993; Vanrollehem y col., 1994). Las medidas respirométricas están basadas en cambios en la concentración de oxígeno disuelto (OD) en un cultivo debido a la respiración aeróbica de los microorganismos presentes. La respirometría ha sido empleada en estudios de contaminación de aguas, con el consecuente diseño y desarrollo de una amplia variedad de instrumentos respirométricos. La mayoría de éstos fueron desarrollados para determinar DBO y posteriormente fueron utilizados para medición y análisis de aguas de desecho y estudios cinéticos de biodegradación de compuestos químicos en barros activados, siendo por lo tanto de gran utilidad en el control y optimización de los procesos operacionales de las plantas de tratamiento aeróbico, así como en la detección de sustancias tóxicas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la supervivencia relativa de microorganismos filamentosos y floculantes frente a la cloración utilizando una técnica respirométrica.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Como microorganismo filamentoso típico se utilizó una cepa de *Sphaerotilus natans* ATCC #29329 obtenida de American Type Culture Collection. La cepa floculante, que fue identificada como *Acinetobacter anitratus*, fue aislada de una planta de tratamiento de efluentes por barros activados escala laboratorio.

El medio utilizado en el cultivo de los microorganismos se detalla a continuación: ácido cítrico monohidrato 3480 mg/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1000 mg/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 400 mg/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 50 mg/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250 mg/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1000 mg/L, vitamina B<sub>12</sub> 100 µg/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15 mg/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5 mg/L, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3 mg/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.75 mg/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.15 mg/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.5 mg/L, BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub> 0.1 mg/L, IK 0.1 mg/L. La esterilización se realizó mediante autoclave a 121°C durante 45-60 minutos. La vitamina B<sub>12</sub> se esterilizó por filtración con membranas Millipore HA de 0.45 µm y se agregó al medio previamente esterilizado.

Los microorganismos fueron cultivados en un reactor de flujo continuo a 30°C con velocidades de dilución comprendidas entre 0.07 y 0.36 h<sup>-1</sup>, con control de pH, temperatura y oxígeno disuelto.

Teniendo en cuenta que el medio de cultivo empleado contenía amonio en su composición, se evaluó la cinética de formación de cloraminas en las condiciones experimentales de los ensayos de toxicidad realizados. Para ello se realizaron mezclas de medio de cultivo con hipoclorito de sodio obteniendo una relación inicial de 0.04 moles de Cl<sub>2</sub> por mol de amonio y se determinó cloro total y cloro libre mediante un kit comercial (Hach) en función del tiempo (1, 5, 10 y 15 minutos) a temperatura ambiente y en dos condiciones de pH: 7 y 8.

Los ensayos de toxicidad del cloro frente a las diferentes cepas se realizaron en un respirómetro que consistía en un biorreactor conteniendo un electrodo de oxígeno (YSI Modelo 58) con cierre hermético, un aireador, agitación magnética y control de temperatura. Los datos fueron adquiridos mediante un microprocesador con una frecuencia de 1 Hz.

A partir de un cultivo en estado estacionario, se colocaron 20 mL del mismo en el respirómetro, se agregó 1 mL de una solución de ácido cítrico (3.5%) neutralizada con NaOH y la mezcla fue aireada hasta llegar a condiciones saturantes de oxígeno disuelto. Luego la aireación fue detenida y se registró la concentración de oxígeno en función del tiempo. La pendiente de la recta obtenida corresponde al OUR<sub>control</sub> (mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Luego de la determinación de OUR<sub>control</sub>, el electrodo de oxígeno fue retirado del respirómetro para permitir el agregado de diferentes volúmenes de una solución de hipoclorito de sodio (550 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>). El rango de concentraciones estudiado fue de 2.7 a 13.1 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>; dichas concentraciones han sido informadas por van Leeuwen (1992) para el control del bulking en sistema de barros activados. El efecto tóxico fue evaluado para diferentes tiempos de contacto sin aireación y el cloro remanente fue neutralizado con tiosulfato de sodio. El cultivo fue aireado para realizar la medición de la velocidad de consumo de oxígeno luego del tratamiento con cloro (OUR<sub>cloro</sub>). El porcentaje de inhibición sobre los microorganismos producido por el cloro agregado fue evaluado mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 * (\text{OUR}_{\text{control}} - \text{OUR}_{\text{cloro}}) / \text{OUR}_{\text{control}} \quad (1)$$

Las dosis de cloro fueron expresadas como mgCl<sub>2</sub>/gSSV. La concentración biomasa se determinó mediante la absorbancia de los cultivos a 620 nm contra agua destilada como blanco y transformadas a unidades de sólidos suspendidos volátiles a través de una curva de calibración previamente realizada. Las soluciones de hipoclorito de sodio fueron preparadas diariamente la concentración de cloro libre y total fue determinada cada hora por medio de kits específicos para detectar cualquier disminución en la concentración de cloro.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Cinética de formación de cloraminas

Durante los ensayos cinéticos de formación de cloraminas se observó que el cloro se combinaba rápidamente con el amonio presente en el medio en las condiciones de temperatura y pH estudiadas. Para tiempos mayores a 1 minuto el cloro combinado resultó ser del 85 al 90 % del cloro oxidante total, sin observarse cambios significativos para tiempos mayores (Fig.1) en los niveles de pH estudiados. Por otra parte, la concentración de cloro total permaneció constante; esto indica que las cloraminas no reaccionan con el citrato u otros compuestos presentes en el medio de cultivo.

Según Palin (1949), la distribución de cloraminas se encuentra gobernada por las velocidades relativas de formación, las cuales son función de las concentraciones relativas de cloro y amoníaco, así como con el pH y la temperatura. Para concentraciones equimolares de cloro y amoníaco, temperatura de 25°C y pH entre 7 y 8, el porcentaje de la dicloramina es menor al 2%. Asimismo, debe considerarse que el tricloruro de nitrógeno solo se forma cuando el pH es inferior a 4.4. Por lo tanto, en el presente trabajo, más del 98% del cloro combinado corresponde a la monocloramina.

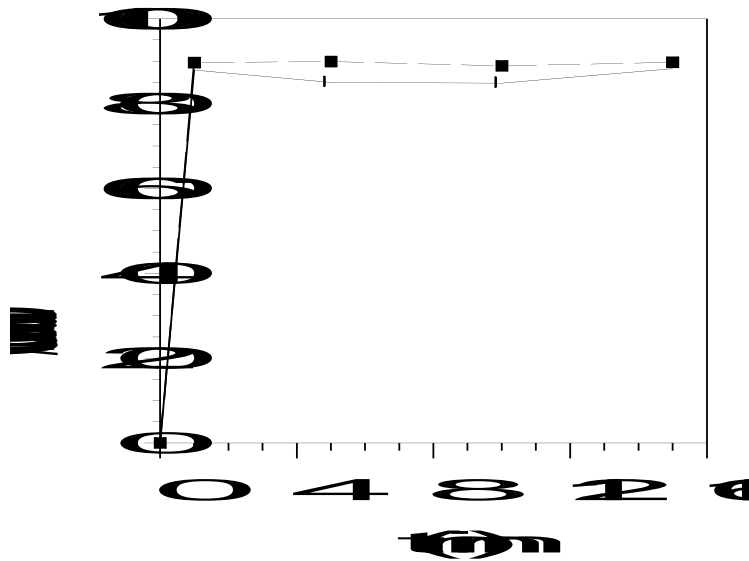


Figura 1. Porcentaje de cloro combinado en función del tiempo.  
(λ) 28 °C, pH = 7, (ν) 26 °C, pH = 8

#### Cinética de inactivación de *Sphaerotilus natans* por cloración

En la Figura 2 se presenta una curva respirométrica típica donde se observa un marcado efecto en la velocidad de consumo de oxígeno en un cultivo puro de *S. natans* debido al cloro agregado, manifestado por una menor pendiente en la curva 2 respecto a la curva 1.

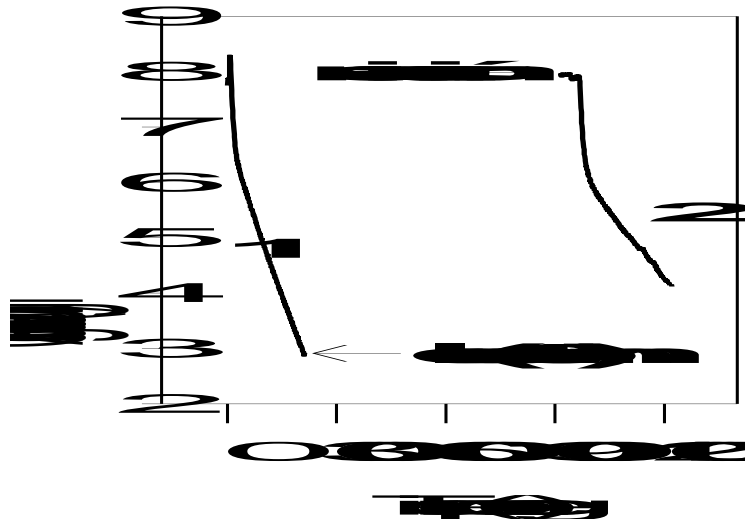


Figura 2: Efecto de la cloración sobre la velocidad de consumo de oxígeno para *Sphaerotilus natans*: (1) OUR<sub>control</sub>, (2) OUR<sub>cloro</sub>

Asumiendo que una parte de las cloraminas actúa frente a la biomasa que se detecta mediante técnicas respirométricas mientras que el resto oxida a la materia orgánica disponible, se propusieron las siguientes ecuaciones cinéticas:

$$-\frac{dN}{dt} = k_1 N [Cl]^n \quad (2)$$

$$-\frac{d[Cl]}{dt} = k_2 [Cl] \quad (3)$$

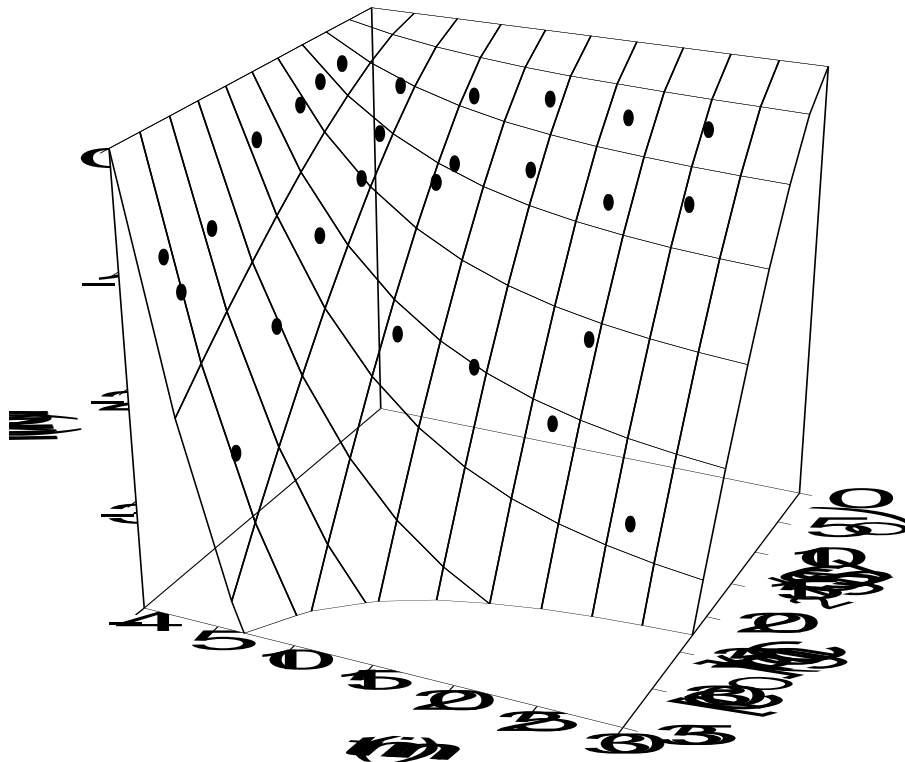
donde N es la concentración de biomasa que se detecta mediante técnicas respirométricas, [Cl] corresponde a la concentración instantánea de cloraminas y t el tiempo.

La integración de ambas ecuaciones conduce a la siguiente expresión:

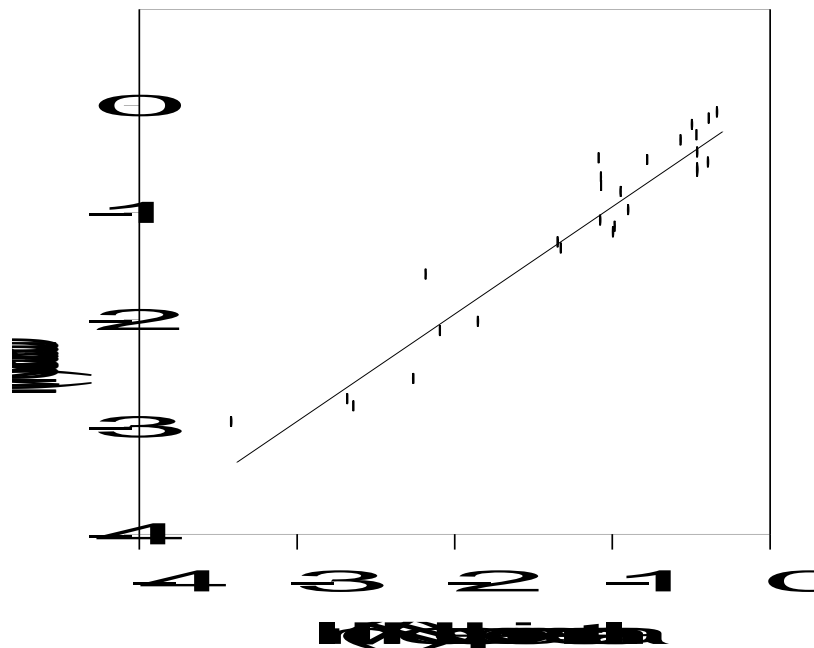
$$\ln \frac{N}{N_0} = -\frac{k_1}{n k_2} [Cl_0]^n \{1 - \exp(-k_2 n t)\} \quad (4)$$

donde  $N_0$  es la concentración inicial de biomasa detectada por el método respirométrico y  $[Cl_0]$  la concentración inicial de cloraminas. El tiempo fue expresado en minutos y los valores de  $N/N_0$  se calcularon a través de los datos respirométricos según como  $N/N_0 = OUR_{\text{cloro}} / OUR_{\text{control}}$ .

La ecuación (4) fue ajustada a los datos experimentales por regresión no lineal utilizando el programa Sigma Plot (Fig. 3); los parámetros obtenidos fueron:  $k_1 = 0.0055$ ,  $k_2 = 0.0778 \text{ min}^{-1}$  y  $n = 1.419$ . Como puede observarse en la Figura 4, se encontró una buena correlación ( $r^2 = 0.917$ ) entre los datos experimentales y los calculados mediante la ecuación (4).



**Figura 3. Efecto de la dosis de cloro aplicada y el tiempo de contacto en la biomasa determinada por el método respirométrico. (□) Datos experimentales (—) Ecuación 4.**



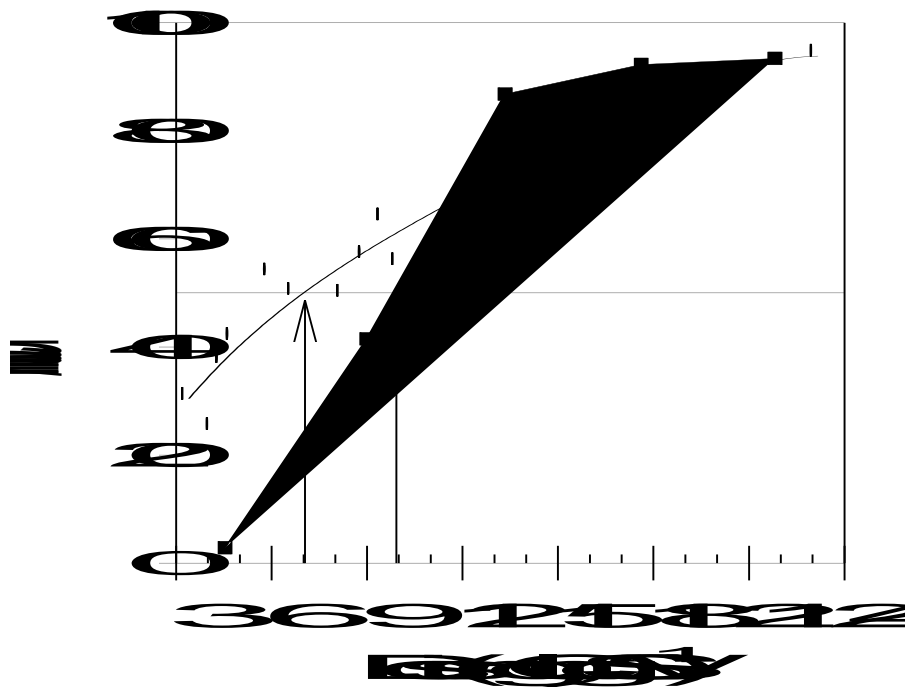
**Figura 4. Valores calculados mediante la ec. (4) en función de los valores experimentales ( $r^2 = 0.917$ )**

### **Efecto del cloro sobre microorganismos filamentosos y floculantes**

En la Figura 5 se presenta el porcentaje de inhibición después de 10 minutos de contacto para *S. natans* y *A. anitratus* en función de las diferentes dosis de cloro expresadas como  $\text{mgCl}_2/\text{gSSV}_0$ . Como se puede observar, a bajas dosis de cloro se encontró una mayor inhibición para *S. natans* que para el microorganismo floculante. Sin embargo, para dosis mayores el efecto inhibitorio sobre *A. anitratus* fue mayor que para *S. natans*.

Tradicionalmente se ha considerado que el control del bulking filamentoso en barros activados por cloración se fundamenta en que los microorganismos filamentosos parecen estar más expuestos a la acción del cloro respecto de los floculantes debido a que los primeros se extienden desde la superficie de los flóculos hacia el medio. Sin embargo, en el presente trabajo se estudiaron cultivos puros donde no se observó formación de flóculos y por lo tanto, la diferente sensibilidad de los microorganismos frente a la cloración es una característica intrínseca de los mismos que no tiene en cuenta los procesos difusionales de las cloraminas dentro de los flóculos.

Los resultados hallados ponen en evidencia la necesidad de evaluar correctamente el efecto tóxico del cloro en los diferentes microorganismos presentes en cada caso particular a fin de planificar una estrategia adecuada para el control del bulking filamentoso por cloración en plantas de tratamiento de efluentes por barros activados. Dicha estrategia debería estar basada en la identificación de los microorganismos responsables del bulking filamentoso a fin de agregar la cantidad mínima de cloro requerida para conseguir su inhibición, minimizando el impacto del tratamiento en los microorganismos floculantes. Para ello es necesario contar con la información específica para cada microorganismo así como evaluar la acción inhibitoria del cloro en los barros considerando los procesos difusionales.



**Figura 5. Inhibición de la respiración en función de la dosis de cloro aplicada**  
 (λ) *Sphaerotilus natans* (v) *Acinetobacter anitratus*.

## CONCLUSIONES

Se modeló en base a ecuaciones cinéticas el efecto de las cloraminas sobre la biomasa cuantificada a través de técnicas respirométricas.

La técnica respirométrica empleada permitió evaluar la toxicidad del cloro sobre cultivos puros de un microorganismo filamentoso (*Sphaerotilus natans*) y uno floculante (*Acinetobacter anitratus*).

Se encontraron diferencias en la sensibilidad de los microorganismos estudiados frente a la cloración, siendo ésta una característica intrínseca de los mismos. *S. natans* resultó ser más susceptible a la cloración respecto a *A. anitratus* para dosis de cloro inferiores a  $11 \text{ mgCl}_2 \cdot \text{gSSV}^{-1}$  y por lo tanto, las dosis de cloro aplicadas para el control del bulking filamentoso causado por *S. natans* deben estar por debajo de este valor.

Sobre la base de los experimentos realizados se concluye que la diferente susceptibilidad de *S. natans* y *A. anitratus* frente al cloro es un aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de una estrategia óptima de control del bulking filamentoso.

Los estudios realizados se completarán en una próxima etapa teniendo en cuenta los procesos difusionales que ocurren cuando los microorganismos forman parte de los flóculos que aparecen en plantas de barros activados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEY A. H., MCCLINTOCK S. A. Battle of the bulk. *Industrial Wastewater* 7, p. 34 -37, 1999.
2. NEETHLING J.B., JENKINS D., JOHNSON K.M. Chemistry, Microbiology and Modeling of Chlorination for Activated Sludge Bulking Control. *J. Water Pollut. Control Fed.* 57 (8), p. 882-889,1985a.
3. NEETHLING J.B., JOHNSON K.M., JENKINS D. Using ATP to Determine the chlorine Resistance of Filamentous Bacteria Associated with Activated Sludge Bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* 57 (8), p. 890-894, 1985b.
4. LAKAY M. T., WENTZEL M. C., EKAMA G. A., MARAIS G. vR. Bulking control with chlorination in a nutrient removal activated sludge system. *Water SA* 14, p. 35 - 42, 1988.
5. PALIN A.T. The Estimation of Free Chlorine and Chloramine in Water. *J. Inst. Water Engrs.*, 3, p. 100-105, 1949.
6. ROOS M. *Respirometry of activated sludge.* Technomic Publishing Inc., Lancaster, Basel, 1993.
7. SMITH R.S., PURDY W.C. The use of Chlorine for correction of sludge bulking in the activated sludge process. *Sew. Wks. J.* 8 (2), p. 223-230, 1936.
8. SWITZENBAUM M.S, PLANTE T. R., WOODWORTH B. K. Filamentous bulking in Massachusetts: extent of the problem and case studies. *Wat. Sci. Tech.* 25, p. 265 - 271, 1992.
9. VAN LEEWEN J. A review of the potential application of non-specific activated sludges bulking control. *Water SA* 18, p. 101-106, 1992.
10. VANROLLEGHEM P.A., KONG Z., ROMBOUITS G., VERSTRAETE W. An on-line respirographic biosensor for the characterization of load and toxicity of wastewater. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 59, p. 321-333, 1994.