

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS



**EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE
FITOSTEROLES PRESENTES EN EFLUENTES DE LA
INDUSTRIA DE CELULOSA KRAFT BLANQUEADA**

ELIZABETH DEL PILAR OÑATE CEA

Seminario de título entregado a la Facultad de Ciencias de la Universidad
Católica de la Santísima Concepción para optar al grado académico de
Licenciado en Química, y al título profesional de Químico Marino
Mención manejo medio ambiental

Profesor Guía: Dra. María Angélica Mondaca

Concepción, 2005

A mi amada y adorada madre, María del Rosario,
por su inmenso amor, apoyo y paciencia,
entregados incondicionalmente en todas las etapas de mi vida,
especialmente en mi educación superior.

Mamá gracias por todo,
te AMO con todas mis fuerzas y corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos padres, Santiago y Maria, y hermanos por el cariñoso apoyo que me han brindado incondicionalmente con todo su esfuerzo y dedicación, a familia Rodríguez Cea por su amor y compañía, así también a mis tíos Joel y Carol, y a mi negro regalón, Matías. A Sandra, mi gran amiga.

A mi profesora guía Dra. María Angélica Mondaca por haberme acogido amorosamente en su laboratorio entregándome mucha dedicación y paciencia en la ejecución de la tesis.

Agradezco al proyecto FONDECYT 1040987, "Influencia de la tecnología de tratamiento en la eliminación biológica de compuestos hormonales activos, contenidos en los efluentes de la industria de celulosa Kraft", el cual proporcionó los recursos económicos para la realización de esta tesis, y a la Dra. Gladys Vidal, investigadora titular del proyecto, por su constante preocupación y apoyo.

No puedo dejar de agradecer al grupo de biotecnología, pues en ellos encontré la amistad y compañerismo altruistas.

Finalmente y por sobre todo, agradezco a Dios por su infinita fidelidad, pues a ÉL le debo todo lo que tengo y soy. Gracias Dios mío, por tanto amor entregado aún cuando no lo merezco.

ÍNDICE

CAPÍTULO I

I.1. Introducción.....	2
I.2. Hipótesis.....	4
I.3. Objetivos.....	4

CAPÍTULO II

II.1. Antecedentes bibliográficos.....	6
II.1.1. Los extractivos de la madera.....	6
II.1.2. Proceso productivo de la industria de celulosa Kraft.....	11
II.1.2.1. Tratamiento de los efluentes y su caracterización fisicoquímica.....	16
II.1.3. Principales contaminantes presentes en los efluentes y su composición química.....	20
II.1.4. Toxicidad de los efluentes y sus efectos sobre los organismos acuáticos.....	26
II.1.5. Genotoxicidad de los efluentes de la industria celulósica.....	30

CAPÍTULO III

III.1. Materiales y métodos.....	39
III.1.1. Diseño experimental.....	39
III.1.2. Muestras de efluentes de la industria de celulosa Kraft.....	39
III.1.3. Reactivos.....	39
III.1.4. Ensayo “rec” de <i>Bacillus subtilis</i>	40
III.1.5. Test de Ames.....	41
III.1.6. Análisis estadístico.....	43

CAPÍTULO IV

IV.1. Resultados.....	45
IV.1.1. Ensayo “rec” de <i>Bacillus subtilis</i>	45
IV.1.1.1. β -sitosterol.....	45
IV.1.1.2. Estigmasterol.....	46
IV.1.1.3. Influentes primarios.....	48
IV.1.1.4. Efluente secundario anaerobio.....	54
IV.1.1.5. Efluente secundario aerobio.....	54
IV.1.2. Test de Ames.....	56
IV.1.2.1. β -sitosterol.....	56
IV.1.2.2. Estigmasterol.....	57
IV.1.2.3. Estigmasterol con activación metabólica.....	58
IV.1.2.4. Influentes primarios.....	59
IV.1.2.5. Efluente secundario anaerobio.....	61
IV.1.2.6. Efluente secundario aerobio.....	62

CAPÍTULO V

V.1. Discusión.....	65
---------------------	----

CAPÍTULO VI

VI.1. Conclusión.....	74
-----------------------	----

CAPÍTULO VII

VII.1. Bibliografía	76
---------------------------	----

ANEXO: Publicaciones y congresos	82
--	----

RESUMEN

Los efluentes de la industria de celulosa y papel contienen disruptores endocrinos de naturaleza química originados naturalmente, tales como los fitosteroles o esteroles vegetales, los cuales están relacionados con una variedad de anormalidades fisiológicas y morfológicas de los peces habitantes en aguas receptoras de estos efluentes. Así también, estos constituyentes de los extractivos de la madera serían responsables de los efectos genotóxicos en los peces expuestos a residuos de la industria de celulosa Kraft, lo cual sugiere que tales efectos no tienen relación alguna con las tecnologías de blanqueo TCF (Total Chlorine Free) o ECF (Elementary Chlorine Free).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la genotoxicidad de los efluentes de la industria de celulosa Kraft y relacionar el efecto genotóxico de dichos efluentes con la presencia de fitosteroles en los mismos, utilizando el ensayo “rec” con *Bacillus subtilis* y el test de Ames con *Salmonella typhimurium*.

Los resultados obtenidos indican que el β -sitosterol y estigmasterol presentan efecto genotóxico demostrado por la diferencia relativa de sobrevivencia entre las cepas *B. subtilis* rec(+) y *B. subtilis* rec(-), siendo estos fitosteroles responsables, en parte, de la genotoxicidad de los efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada, la que es reducida luego del tratamiento biológico tanto aerobio como anaerobio. Los ensayos con el test de Ames no demostraron mutagenicidad evidente de los esteroles vegetales, así mismo en los efluentes con y sin tratamiento biológico, lo cual significa que las muestras ensayadas no son mutagénicas. Estos resultados señalan que otros ensayos de genotoxicidad/mutagenicidad son necesarios para la confirmación de los mismos.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

I.1. INTRODUCCIÓN

Las nuevas tecnologías de blanqueo, libres de cloro elemental (ECF) y totalmente libres de cloro (TCF), que han realizado una eliminación parcial y total de cloro como agente blanqueante, han resultado en la disminución de los compuestos organoclorados emitidos al ambiente (AOX) (Strömberg *et al.*, 1996), los que han sido considerados, tradicionalmente, responsables del mayor porcentaje de la toxicidad de los efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada. Sin embargo, existe evidencia que la toxicidad de estos efluentes se debe no solamente a compuestos AOX, sino también, a variados compuestos no clorados provenientes de la fracción extractiva de la madera, tales como los fitosteroles y ácidos resínicos, los que durante la etapa de pulpaje de la madera (separación de la lignina de los otros componentes de la madera) quedan parcialmente absorbidos en la pulpa, la que posteriormente es lavada. Estas aguas de lavado, llevan consigo, entre otros compuestos, fitosteroles. Estos son finalmente arrastrados por dichas aguas hacia el efluente total, contribuyendo, por lo tanto, a la toxicidad crónica de los peces expuestos a estos efluentes. La toxicidad crónica se manifiesta en efectos biológicos tales como: alteración en el nivel de esteroides sexuales en el plasma de peces y disminución de su capacidad reproductiva. Estos disruptores endocrinos, llamados también fitoestrógenos, son conocidos como “precursores de compuestos con actividad hormonal”. En los efluentes de celulosa Kraft blanqueada existe una cantidad detectable de fitosteroles, siendo el β -sitosterol el compuesto predominante del total de esteroides detectados (25-47%) (Mahmood-Khan & Hall, 2003). Una vía de eliminación de los fitosteroles presentes en los efluentes es mediante los tratamientos biológicos, sin embargo el porcentaje de remoción puede ser variable (Kostamo & Kukonen, 2003).

De los contaminantes identificados en los efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada, un número significativo son clasificados como clastogénicos, carcinogénicos y genotóxicos.

Las sustancias genotóxicas presentes en los efluentes no tendrían relación alguna con el cloro o tipos de procesos de blanqueo. Esto sugiere que los derivados provenientes de los extractivos de la madera serían los responsables de dichos efectos genotóxicos (Ericson & Larsson, 2000). Los ácidos resínicos son conocidos por su genotoxicidad (Maria *et al.*, 2004; Pacheco & Santos, 2002), mientras que la escasa información sobre los fitosteroles señala que estos no muestran actividad mutagénica evidente (Wolfreys & Hepburn, 2002). No obstante, se ha establecido la actividad genotóxica de metabolitos de estradiol y estrona (estrógenos).

Los tratamientos secundarios podrían reducir o eliminar la genotoxicidad de los efluentes, sin embargo el tratamiento no siempre reduce la genotoxicidad, sino que, en algunas instancias, puede incrementarla. Por lo tanto, los ensayos de genotoxicidad constituyen una medida efectiva para el monitoreo medio ambiental y para seleccionar procesos de tratamientos apropiados (Claxton *et al.*, 1998).

I.2. HIPÓTESIS

Los fitosteroles, constituyentes de la fracción extractiva de la madera, son responsables de la genotoxicidad presente en los efluentes de la industria de celulosa Kraft. Dicha genotoxicidad es reducida por los tratamientos biológicos aerobios y anaerobios.

I.3. OBJETIVOS

I.3.1 Objetivo general

Evaluar la genotoxicidad de los efluentes de la industria de celulosa Kraft y relacionar el efecto genotóxico de dichos efluentes con la presencia de los fitosteroles en los mismos.

I.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la genotoxicidad de β -sitosterol y estigmasterol.
- Evaluar la genotoxicidad de los efluentes provenientes de la industria de celulosa Kraft blanqueada sin previo tratamiento biológico.
- Evaluar la genotoxicidad de los efluentes tratados aeróbica y anaeróbicamente.

CAPÍTULO II
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

CAPÍTULO II

II.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

II.1.1. Los extractivos de la madera

Los principales componentes de la madera son: celulosa, hemicelulosa, lignina y extractivos apolares de la madera.

La celulosa es un polisacárido resultante de la polimerización lineal de grupos anhidroglucosa, con enlaces 1-4 β glucosídicos, insoluble en agua y álcalis o en ácidos diluidos a temperatura ambiente (Vidal, 1994).

La hemicelulosa está formada por polisacáridos no celulósicos, producto de la polimerización heterogénea de varios azúcares de cinco y seis átomos de carbono, pentosas (xylosa, arabinosa) y hexosas (manosa, glucosa, galactosa) respectivamente, y de ácidos de azúcares. La hemicelulosa de la madera dura contiene principalmente xylanos, mientras que la hemicelulosa de la madera blanda contiene principalmente glucomanos, de aquí su heterogeneidad química. La hemicelulosa, es el segundo polisacárido más común en la naturaleza, representa sobre el 20-35% de la biomasa lignocelulósica (Saha, 2003). El grado de polimerización es bajo por lo que su solubilidad en agua, álcalis y ácidos diluidos a temperatura ambiente es algo superior (Vidal, 1994).

La lignina es una sustancia mucho más compleja, resultante de la polimerización reticulada en tres dimensiones de monómeros aromáticos, con un grado de polimerización aún no definido (Vidal, 1994). Es un polímero formado esencialmente por unidades de fenilpropano. Los grupos funcionales de la lignina, asociados a estas unidades de fenilpropano, varían según la especie, los más importantes son: metóxilo, hidróxilo fenólico, hidróxilo alifático, carbonilo. Las principales unidades estructurales presentes en la lignina son el alcohol trans-coniferílico, alcohol trans-sinalpílico y el alcohol trans-p-cumarílico (Guiñez, 2002).

Por otra parte, los extractivos son sustancias lipofílicas constituyentes de la madera, solubles en solventes orgánicos o apolares, comúnmente conocidos como resinas de pino (pitch), constituídos principalmente de: triglicéridos, ácidos grasos y resínicos, ceras, alcoholes grasos, esteroides y esteril ésteres (Dorado *et al.*, 2001). La mayor parte de la fracción no polar de la madera, está compuesta por ácidos resínicos y grasos (Ucar & Balaban 2002), no obstante, esto puede cambiar según sea la especie. En la Tabla II.1 se muestra la composición de los extractivos en dos maderas distintas, pino y eucaliptos.

Tabla II.1. Principales constituyentes de los extractivos provenientes de diferentes especies de madera.

Constituyentes de la fracción lipofílica de la madera	<i>Pinus sylvestris</i> (mg/g madera)	<i>Eucalyptus globulus</i> (mg/g madera)
Ácidos grasos	4,0	0,28
Ácidos resínicos	8,9	N.E.
Esteroides (*)	0,2	0,49
Ceras	1,6	0,06
Ésteres de esteroides	1,2	0,52
Triglicéridos	7,3	0,13

N.E.: no estudiado

(*) el valor dado corresponde sólo a la concentración de β -sitosterol.

La variabilidad de las especies de árboles, no sólo está dada por sus diferencias morfológicas, sino también por su composición química especialmente de los extractivos, los cuales son responsables del color y olor de la madera y en el mismo alcance, de sus propiedades físicas.

Estos extractivos juegan un rol importante en la protección de la madera hacia ataques biológicos, tanto del árbol vivo como de los productos de la madera. Sin embargo, pueden tener efectos adversos en el procesamiento de la madera, causando problemas técnicos y ambientales (Dorado *et al.*, 2001).

Las composiciones en promedio, sobre la base de peso seco, de la madera son: celulosa (43%), hemicelulosa (25%) y lignina (28%) y en menor extensión los extractivos de madera (4%). No obstante, estos valores pueden variar según el tipo de madera, de éste modo, la madera blanda (MB) como el *Pinus pinaster* o *Pinus radiata* y madera dura (MD) como *Eucalyptus globulus* o *Populus nigra* se diferencian fundamentalmente en su composición química, tal como se muestra en la Figura 2-1.

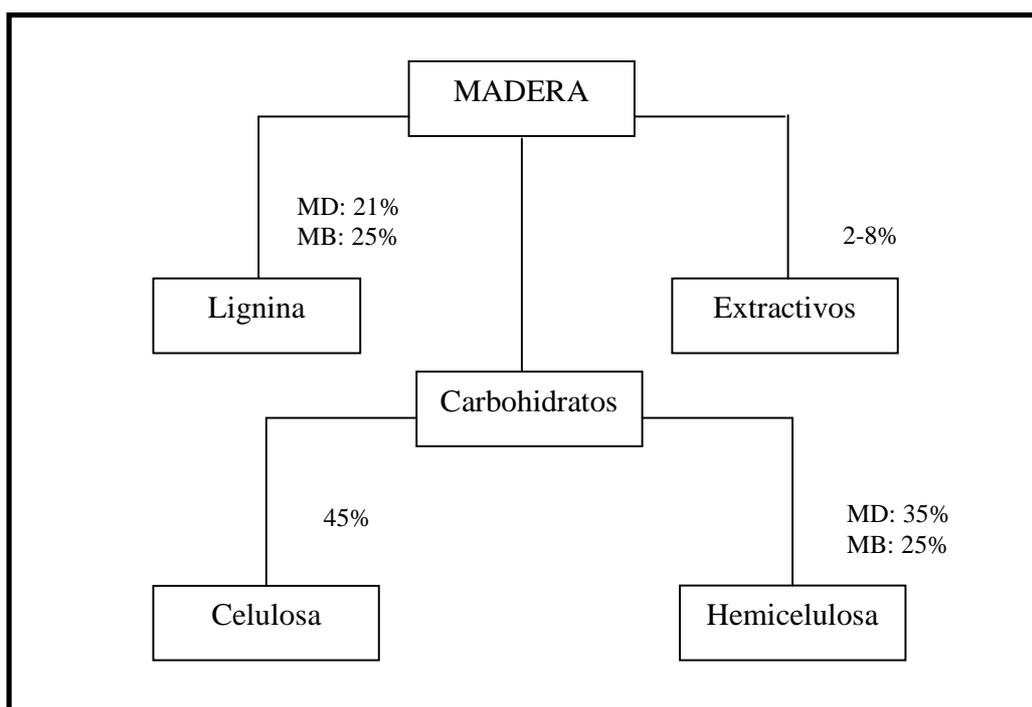


Figura 2-1. Composición química de la madera.

Por otro lado, con relación a los extractivos de la madera, se observa que las maderas blandas, como el pino, presentan mayor cantidad de extractivos (0,5- 7,0%) que las maderas duras, como es el caso del eucalipto (0,2-3,5%) (La Fleur, 1996). Así también, el contenido de los extractivos fluctúa según el tipo de crecimiento de la madera, ya sea éste rápido o lento. De este modo, el total de los extractivos es de 4,2 y 5,1% para árboles de crecimiento rápido y lento, respectivamente (Ucar & Balaban, 2002). Por otra parte, las maderas blandas son ricas en ácidos resínicos (La Fleur, 1996; Mellanen *et al.*, 1996), mientras que en las maderas duras abundan los fitosteroles (La Fleur, 1996; Verta *et al.*, 1996). No obstante, en el *Pinus nigra var. pallasiana* (MB) se ha encontrado altas cantidades de esteroides y menores de ácidos resínicos, mientras que en el pino *Tracian black* (MD) la concentración de los ácidos resínicos fue mayor que la de esteroides, siendo esto considerado como un “ecotipo geográfico” (Ucar & Balaban, 2002), atribuyéndose éste incremento a condiciones ecológicas y climáticas de la región. Cualquiera sea la especie de madera blandas, duras, de crecimiento rápido o lento, éstas contienen extractivos en variadas concentraciones.

En la madera de *Eucalyptus globulus*, los esteroides y ésteres de esteroides encontrados y sus respectivas concentraciones en (g/g madera) fueron: campesterol (1,15), β -sitosterol (48,1), estigmastanol (5,8), fucosterol (2,3), cicloartenol (1,7), 24-metilenecicloartenol (0,96), citrostadienol (1,54), ésteres de β -sitosterol (33,3) y ésteres de estigmastanol (6,7) (del Río *et al.*, 1999).

Las concentraciones de esteroides encontradas en dos estaciones muestreadas del río Lanyang en el noreste de Taiwan, y sus respectivas concentraciones en $\mu\text{g/g}$ de peso seco del material suspendido total, para una estación cercana a una reserva natural, fueron ($\mu\text{g/g}$): campesterol (14,8), estigmastanol (45,2) y β -sitosterol (101,0) (Jeng & Kao, 2002), mientras que para la estación que está lejos de la reserva natural, las concentraciones fueron menores: campesterol (4,13), estigmastanol (1,69) y β -sitosterol (6,39) (Jeng & Kao, 2002), esto deja en evidencia que las plantas mayores son fuentes predominantes de esteroides, pues se supone que producto del aumento de las perturbaciones antropogénicas, la erosión de los

suelos se ve agravada y en consecuencia, estos compuestos presentes en los árboles llegan a las aguas de dicho río.

Dado que los esteroides, al igual que los ésteres de esteroides, son los constituyentes más abundantes de la fracción lipofílica de la madera (Tabla II.1), son los principales responsables de los problemas generados sobre la calidad del producto y operacionales, así también de los impactos ambientales. De esta forma, los esteroides vegetales o fitosteroides juegan un papel importante como constituyentes de los extractivos de la madera, pues son responsables de la toxicidad de los efluentes generados en la industria de celulosa Kraft. Algunos fitosteroides comúnmente encontrados en los efluentes de la industria de celulosa Kraft son: β -sitosterol, estigmasterol, campesterol y estigmastanol. La Figura 2-2 muestra la estructura química de los esteroides anteriormente mencionados.

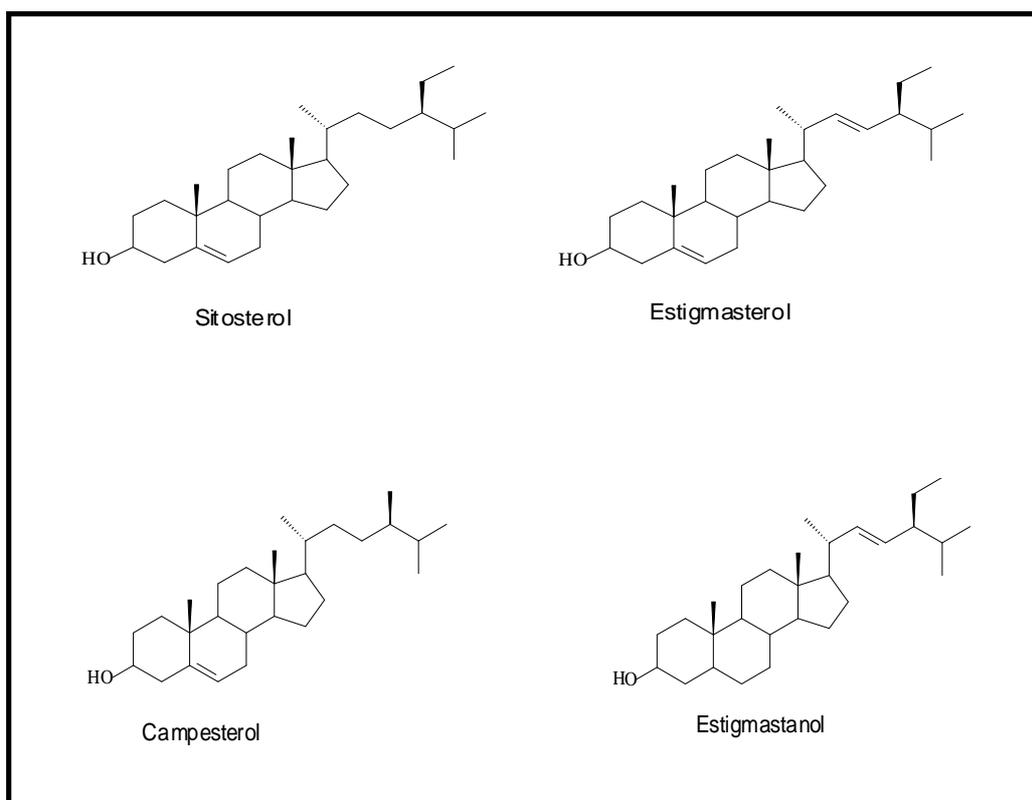


Figura 2-2: Estructura molecular de esteroides vegetales (fitosteroides).

II.1.2. Proceso productivo de la industria de celulosa Kraft

La celulosa constituye el principal producto chileno de exportación forestal. El tipo de celulosa que más se produce en Chile es la blanca de fibra larga BSKP (Bleached Softwood Kraft Pulp) de *Pinus radiata*, destinada principalmente a la exportación. También se produce celulosa de fibra larga no blanqueada UNKP (Unbleached Kraft Pulp) y la celulosa blanca de fibra corta BEKP (Bleached Eucalyptus Kraft Pulp). Chile produce actualmente, cerca de 2,8 millones de toneladas de celulosa Kraft, tanto cruda (15%) como blanqueada (85%). El país exporta el mayor porcentaje de su producción (82%), a países de la comunidad europea, norteamericana y secundariamente a Asia.

La pulpa es un producto que se obtiene de la madera después de separar las fibras de celulosa de los otros compuestos orgánicos (hemicelulosa, lignina, fitosteroles, extractos resinosos, entre otros) presentes en éste recurso.

En general y tal como se ilustra en la Figura 2-3, el proceso de producción de la celulosa se puede separar en cinco operaciones unitarias claramente definidas: preparación de la madera, etapa de pulpaje, separación y lavado de la pasta, blanqueo, secado y embalado. También se identifica a la etapa de pulpaje como una fase crítica, pues compuestos como los fitosteroles, liberados en esta etapa desde la fracción extractiva de la madera, serían probablemente responsables de la genotoxicidad del efluente final de la industria de celulosa Kraft.

A continuación, se hace una descripción sucinta de los principales procesos que intervienen en la producción de celulosa Kraft y se identifican los principales contaminantes generados en la etapa de reducción de la madera o etapa de pulpaje.

En una primera etapa la madera es descortezada y luego reducida a astillas. La corteza desprendida es usada como combustible en las calderas de poder para generar vapor y energía eléctrica, insumos requeridos en distintas fases de la planta. Próximamente, las astillas ingresan a un digestor continuo dentro del cual son sometidas a cocción junto con el licor blanco, compuesto por hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na₂S), a condiciones controladas de temperatura (130-170°C) y presión. El propósito de la etapa de cocción es liberar las fibras de celulosa de los otros componentes de la madera, mediante la disolución de la lignina que las mantiene unidas. Continuamente, se agregan y retiran líquidos de cocción, y en la medida que la mezcla de astillas va descendiendo dentro del digestor, se transforma lentamente en una pasta compuesta por fibras de celulosa, lignina y licor de cocción, mientras que una parte importante de la lignina disuelta es retirada en los líquidos de cocción en forma de licor negro (mezcla de licor blanco y lignina disuelta). En esta fase se genera una gran cantidad de residuos de fibra de celulosa, los que al ser depositados en los cuerpos de agua, generan un exceso de materia orgánica. En consecuencia, el efluente líquido generado está compuesto por sólidos suspendidos (fibras) y productos de degradación de la lignina. Es de crucial importancia destacar que en la etapa de pulpaje se liberan también compuestos que forman parte de la fracción extractiva de la madera tales como fitosteroles (β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, entre otros) y ácidos resínicos (ácido abiético, ácido dehidroabiético, etc).

La pasta fibrosa proveniente de la etapa de reducción kraft, sigue una etapa de lavado a altas temperaturas dentro del digestor, en el cual flujos de agua a contracorriente van eliminando el licor negro de la pasta, el que es posteriormente tratado para regenerar el licor blanco, a través de un proceso de caustificación. Sin embargo, esto no significa la ausencia de residuos líquidos con alto contenido de sustancias orgánicas (lignina, ácidos resínicos, fitosteroles, entre otros), tanto para la fase de pulpaje de la madera como de separación y lavado.

Más tarde, la pasta continúa varias etapas de lavado para eliminar el resto de licor negro, luego pasa al clasificador de nudos (astillas que no alcanzaron una cocción completa). Estos son devueltos al digester continuo y las fibras clasificadas pasan a sucesivas etapas de separación y lavado, obteniéndose finalmente la celulosa Kraft sin blanquear (pasta café) que posee todavía altos niveles de lignina.

Los extractivos de la madera tales como los fitosteroles, originados previamente en la etapa de pulpaje, son liberados en las aguas de lavado de la madera y arrastrados finalmente por estas aguas hacia el efluente total, así estos compuestos causan serios disturbios fisiológicos y bioquímicos sobre los peces expuestos a los efluentes de la industria de celulosa Kraft, pues actúan como disruptores endocrinos en organismos habitantes de aguas receptoras de estos residuos industriales. Por lo que, los fitosteroles son conocidos como fitoestrógenos o pueden actuar como precursores de compuestos con actividad hormonal. Es sabido que los esteroides hormonales poseen propiedades genotóxicas, no obstante, no se conoce información respecto de la genotoxicidad de los fitosteroles, como constituyentes de estos efluentes y contribuyentes de la toxicidad de los tales.

La pasta clasificada y lavada, prosigue varias etapas de blanqueo para eliminar el remanente de lignina contenida en la pasta. Para ello, se utilizan diferentes productos químicos, tales como, cloro elemental (Cl_2), dióxido de cloro (ClO_2), oxígeno (O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y soda cáustica (NaOH). El proceso de blanqueo se lleva a cabo a través de una serie de etapas, las que constituyen secuencias de blanqueo, usadas alternativamente. Estas secuencias se clasifican en tres grupos: estándar, se utiliza cloro elemental; ECF, libre de cloro elemental, se utiliza ClO_2 ; TCF, totalmente libre de cloro, es decir, no se utiliza ningún agente clorado durante la secuencia.

Las plantas de celulosas más modernas cuentan con un proceso adicional de pre-deslignificación con oxígeno, reduciendo sustancialmente el consumo de químicos clorados de blanqueo. Algunas plantas usan ozono (O_3) y enzimas como agentes blanqueantes. En la fase de blanqueo se producen reacciones que solubilizan la lignina residual y se forman grupos cromóforos, los que dan el color café rojizo a la salida de la etapa de cocción (licor negro), lográndose una pulpa blanqueada.

La pasta procedente de la planta de blanqueo es distribuida uniformemente sobre el fourdrinier para extraer el exceso de agua produciéndose las primeras uniones entre las fibras. A continuación, es conducida hacia las prensas de rodillos, donde se le extrae gran cantidad de agua. La hoja, que a esta altura posee una consistencia de aproximadamente un 46%, entra a los presecadores y luego a los secadores principales. A la salida de esta área, la hoja posee una consistencia de 87-92% seco.

Finalmente, la hoja pasa por la cortadora dejándola en forma de pliegos, se embalan en forma de units y se pesan antes de ser guardados en las bodegas. También existe la posibilidad de enrollar la hoja de celulosa sin usar la cortadora, formándose las bobinas.

II.1.2.1. Tratamiento de los efluentes y su caracterización fisicoquímica

Algunas variables relevantes para medir el nivel de toxicidad de las descargas de los efluentes son: sólidos suspendidos totales (SST), demanda bioquímica de oxígeno, usualmente medida después de 5 días, por lo que se conoce como DBO_5 , y los AOX, que mide la concentración de compuestos organoclorados. Finalmente, el pH, debe aproximarse a neutro. La DBO_5 es originada por la presencia de compuestos fácilmente biodegradables, tales como los carbohidratos y los ácidos orgánicos. La toxicidad se atribuye a compuestos extractivos de la madera, tales como terpenos volátiles, ácidos resínicos y fitosteroles, y a los efluentes de blanqueo, que contienen compuestos fenólicos clorados.

A continuación en la Figura 2-4, se muestra un esquema explicativo de los tratamientos aplicados a residuos de la industria de celulosa Kraft.

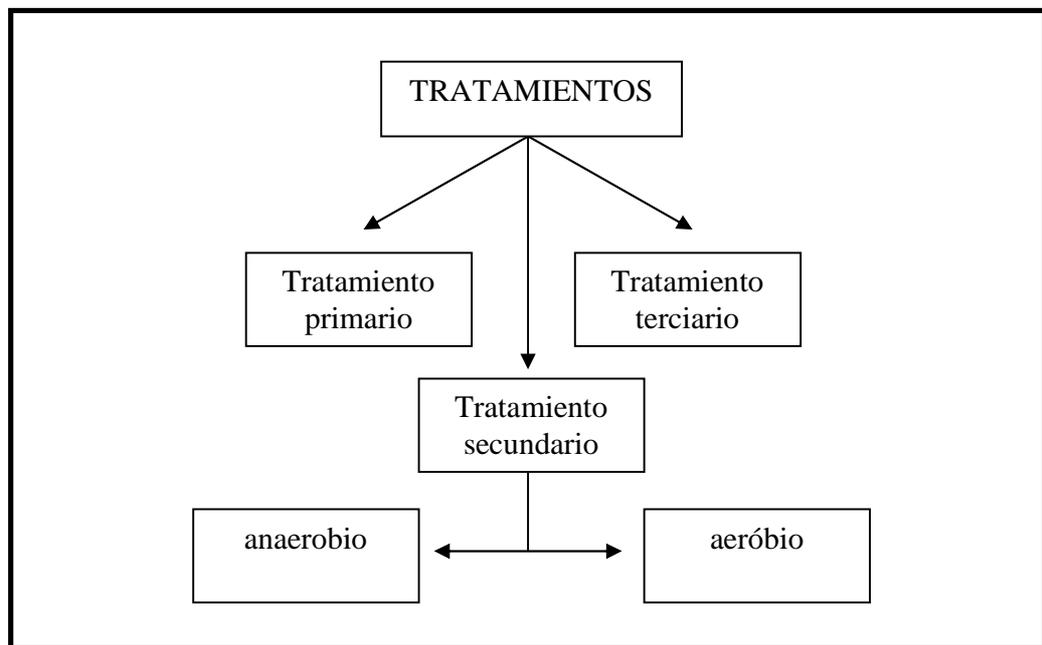


Figura 2-4. Tratamientos aplicados sobre residuos líquidos de la industria de celulosa Kraft.

-Tratamiento primario

Los residuos líquidos procedentes de los diversos procesos de la planta son llevados a la planta de tratamiento primario, donde existe un clarificador o piscina de decantación, cuya función es retirar los sólidos suspendidos. Las fibras son llevadas a la superficie del agua con la ayuda de burbujas de aire inyectadas en el fondo y retiradas por rebalse a través de los bordes superiores de la piscina. Los sólidos más pesados, una vez decantados, son retirados desde el fondo por rastrillos rotatorios, los que posteriormente, junto con las fibras, son prensados para retirarle el agua excedente y depositados en vertederos especialmente habilitados o para ser quemados en calderas de poder.

El efluente prosigue a una etapa de neutralización, donde se le agregan aditivos químicos neutralizantes para que los residuos finales no sean ácidos ni alcalinos. Posteriormente, el efluente está en condiciones para ser devuelto al río. Algunas plantas más modernas, como las recientemente construidas en Chile, poseen un tratamiento secundario para estos efluentes, cuyo objetivo principal es reducir la carga orgánica.

-Tratamiento secundario

Tratamiento biológico aerobio: los tratamientos aerobios han sido los primeros tratamientos biológicos secundarios aplicados, con el objetivo de reducir la carga orgánica biodegradable (DBO_5), siendo habituales tanto en las industrias de pulpa como en las integradas de pulpa y papel. En los procesos de lodos activos se alcanzan elevados porcentajes de eliminación de la carga en DBO_5 , generalmente en el rango 65-99% (Vidal *et al.*, 1996). La eficacia de eliminación de la DQO varía en función de la relación DBO/DQO , siendo inferior en el caso de los efluentes procedentes de los procesos de pulpado químico, en los que dicha relación es baja. La eliminación de color es prácticamente nula.

El tratamiento aerobio reduce fuertemente la toxicidad acuática de los efluentes de digestión y o cocción de las pulpas mecánicas o químicas, al degradarse aquellas sustancias como los ácidos grasos, ácidos orgánicos y ciertos extractivos de la madera. Durante el tratamiento de aguas residuales, las concentraciones de extractivos fueron reducidas sobre un 97%. En el tratamiento con lodo activado sobre un 94% de los ácidos resínicos y sobre un 41 % de los esteroides fueron degradados o transformados en otros compuestos (Kostamo & Kukonen, 2003). No obstante, estos porcentajes de remoción pueden ser variables.

Tratamiento biológico anaerobio: la aplicación de la digestión anaerobia al tratamiento de los efluentes de la industria de la pulpa y papel se inició a mediados de la década de los ochenta, se incrementó fuertemente su presencia en los últimos años de la misma. La digestión anaerobia presenta diferentes ventajas frente al tratamiento aerobio (Tabla II.2), principalmente cuando los efluentes están fuertemente contaminados por la materia orgánica.

Tabla II.2. Ventajas de los tratamientos aerobio y anaerobio.

Tratamiento aerobio	Tratamiento anaerobio
Mayor estabilidad del proceso	Menor tasa de producción de fangos
Mayor capacidad de eliminación de la DBO ₅	Bajo consumo energético
Proceso de degradación más rápido	Operatividad con mayor DBO del influente
Menor tiempo de retención hidráulico	Generación de metano como producto secundario utilizable
Menor volumen de muestra	

Por tanto, la aplicación del tratamiento anaerobio es preferentemente indicada en los efluentes de pulpado mecánico, termomecánico o químico-mecánico y a los condensados de los evaporadores de los sistemas de recuperación en los procesos Kraft.

Otro aspecto a considerar, a favor de la digestión anaerobia de este tipo de efluentes, es el menor requerimiento de nutrientes que en el caso de los tratamientos aerobios, tanto desde un punto de vista económico como ambiental. Con aquellos efluentes de mayor biodegradabilidad y baja toxicidad los porcentajes de depuración varían entre el 60-99%.

Como ya se ha comentado, parte de los efluentes generados por los procesos de pulpa de celulosa y papel (principalmente aquellos procedentes de los procesos de blanqueo, pulpado semiquímico y pulpado químico) son de difícil biodegradabilidad y presentan toxicidad para la biomasa implicada en los sistemas biológicos de tratamientos. Sin embargo, una dilución apropiada de los efluentes hace posible la puesta en marcha adecuada de los digestores para que los microorganismos anaerobios tengan una máxima adaptación.

-Tratamiento terciario

Si la aplicación de tratamientos secundarios biológicos no ha sido suficiente, se puede pensar en aplicar algunos de los pre-tratamientos de detoxificación, tales como adsorción, precipitación u oxidación de los tóxicos orgánicos. Otros procesos como, la filtración con arena y osmosis inversa se pueden utilizar para separar cualquier contaminante residual que no haya sido eliminado durante los procesos de tratamiento biológico previos. No obstante, la aplicación de un tratamiento anaerobio-aerobio puede evitar en gran medida la toxicidad y viabilizar la eliminación de la DBO₅.

II.1.3. Principales contaminantes presentes en los efluentes y su composición química

Los agentes blanqueadores más comúnmente usados en la industria de celulosa y papel son los químicos clorados. Sin embargo, el uso de estos reactivos resulta en la formación de compuestos organoclorados prioritariamente polutantes (del Río *et al.*, 2000). El uso de métodos de blanqueo con oxígeno, ozono o peróxido de hidrógeno (TCF), saludables para el ambiente en la producción de la pulpa, están reemplazando los químicos clorados de blanqueo. No obstante, nuevos problemas respecto de la toxicidad de los efluentes tienen origen con la introducción de los procesos TCF. Algunos de ellos, dicen relación con los compuestos constituyentes de los extractivos de la madera, los cuales causan problemas ambientales en la industria de celulosa y papel. Así, durante la etapa de pulpaje, los extractivos de la madera forman partículas coloidales de resinas. Los fitosteroles, especies químicas constituyentes de estos coloides, sobreviven a la etapa de pulpaje siendo liberados en las aguas de lavado durante la etapa de cocción y de blanqueo, pudiendo quedar almacenados en diferentes partes de la industria o suspendidos en estas aguas hasta finalmente ser descargados en los efluentes, aún cuando la cantidad de los extractivos de la madera en las aguas de lavado disminuye dramáticamente a través de los procesos (cerca del 99% de reducción)(Gutiérrez *et al.*, 2001).

Un estudio realizado por la empresa nacional de celulosa de Pontvedra, España, la cual usa madera de eucaliptos en un proceso Kraft con blanqueo TCF, caracterizó extractos coloidales y aguas de procesos, y fueron comparados con la composición lipofílica de la madera. La Tabla II.3 muestra la composición de la fracción extractiva de la madera, y la Tabla II.4 los principales esteroides libres y esterificados. Presentes en las muestras antes mencionadas.

Tabla II.3. Principales extractivos de la madera de *Eucalyptus globulus* detectados en extractos coloidales y en las aguas de proceso.

Extractivos de la madera	Madera de <i>Eucalyptus globulus</i> (g/g madera)	Extractos coloidales (g/g madera)	Aguas de proceso (mg/10 l de agua^(*))
Esteroles	61,5	69,2	1598
Ésteres de esteroles	50,0	41,0	610
Ácidos grasos	26,9	25,0	N.E.
Cetonas esteroideas	21,2	21,2	28,8
Hidrocarburos	14,4	30,8	48,0

(*) corresponde a las cantidades de extractivos encontrados en aguas del primer y segundo lavado de la pulpa después de la cocción de esta.

Tabla II.4. Principales esteroides y ésteres de esteroides provenientes de la fracción extractiva de la madera de *Eucalyptus globulus* presentes en extractos coloidales y en las aguas de proceso.

Compuestos	Madera de <i>Eucalyptus globulus</i> (g/g madera)	Extractos coloidales (g/g madera)	Aguas de proceso (mg/10 l de agua^(*))
β-sitosterol	48,1	51,9	1134
Estigmastanol	5,80	13,5	236
Fucosterol	2,30	1,54	145
Campesterol	1,15	0,19	N.E.
Otros esteroides	4,23	2,12	83
Ésteres de β-sitosterol	33,7	27,5	243
Ésteres de stigmastanol	6,70	9,60	85
Otros ésteres de esteroides	10,0	3,80	282

(*) corresponde a las cantidades de extractivos encontrados en aguas del primer y segundo lavado de la pulpa después de la cocción de esta.

En consecuencia, la composición de los extractivos encontrados en las partículas coloidales y en las aguas de procesos, fue similar a la composición lipofílica de la madera de eucaliptos. Del mismo modo, la composición de los esteroides libres y esterificados fue proporcional a la encontrada en la madera, siendo el β-sitosterol y ésteres de β-sitosterol y de estigmastanol los más predominantes (del Río *et al.*, 1999).

Aunque los extractivos de la madera corresponden a una pequeña fracción (0.26%) de esta, muchos de sus constituyentes, como ya se ha dicho, permanecen aún después del pulpaje contribuyendo a la formación de los extractos resinosos constituidos especialmente de esteroides y ésteres de esteroides, los que son posteriormente dispersados en la fase acuosa.

Esto indica, que bajo condiciones alcalinas en la cocción Kraft, los esteroides y ésteres de esteroides forman jabones, no ocurriendo mayores cambios estructurales de estos compuestos, por lo tanto, son los principales constituyentes de los residuos líquidos generados (del Río *et al.*, 1999).

La Tabla II.5 muestra las concentraciones de los esteroides totales encontrados en los efluentes tratados y no tratados de la industria de celulosa y papel, las cuales poseen distintos procesos de reducción de la madera (reducción mecánica o química) y sistemas de tratamiento de sus efluentes (lagunas aireadas, lodo activado). Mientras que la Tabla II.6 muestra las concentraciones de los fitosteroides particulares presentes en los efluentes tratados y no tratados.

Tabla II.5. Concentración de esteroides totales presentes en los efluentes tratados y no tratados.

Madera	Esteroides totales ^a (µg / l)		Referencia
	Antes	Después	
M ^b	361-436	353-131	Mahmood-Khan & Hall, 2003
MB	NM	255	Van der Heuvel <i>et al.</i> , 2002
MB/MD	1027	100	Mattson <i>et al.</i> , 2001
MB/MD	NM ^c	72-1056	Mellanen <i>et al.</i> , 1999
MB	350-1734 ^d	77-555	Cook <i>et al.</i> , 1997
MB	66,67-166,67 ^e	10-55	Stromberg <i>et al.</i> , 1996
MD	37-755,6	3,4-282	Stromberg <i>et al.</i> , 1996
MB	20-40	<10-220	Verta <i>et al.</i> , 1996
MB/MD	1060-3420	50-210	Verta <i>et al.</i> , 1996
MD	610-680	400	Verta <i>et al.</i> , 1996
M ^b	1200 ^f	280 ^f	MacLatchy and van der Kraak, 1995

(a) esteroides totales antes y después del tratamiento biológico para distintos procesos y plantas, (b) no está claro el tipo de madera empleada, (c) no medido, (d) valores considerando remoción media de 78% de la cantidad mínima emitida y 68% de remoción de la mayor cantidad emitida, (e) menor y mayor valor medidos por el autor para distintas plantas que procesan el mismo tipo de madera, (f) exclusivamente β-sitosterol.

Tabla II.6. Concentración de los fitosteroles presentes en los efluentes tratados y no tratados.

Madera	Fitosteroles	Concentración de Fitosteroles ($\mu\text{g/l}$)		Referencia
		Antes	Después	
MB	Campesterol	16,550 – 87,750	3,64 – 28,10	Cook et al., 1997 ^a
	Estigmasterol	23,640 – 105,34	5,20 – 33,71	
	β -sitosterol	283,77 – 1422,0	62,43 – 455,10	
	Estigmastanol	26,000 – 05,340	5,72 – 33,70	
MB/MD	β -sitosterol	-----	44 – 711	Mellanen et al., 1999
MB	Campesterol	-----	7,6	Van der Heuvel et al., 2002
	Estigmasterol	-----	21,2	
	β -sitosterol	-----	165,4	
	β -sitostanol	-----	61,2	
M	Campesterol	85 - 67	52 - 36	Mahmood-Khan & Hall, 2003
	Estigmasterol	38 - 30	18 - 20	
	β -sitosterol	126 - 240	17 - 37	
	β -sitostanol	112 – 98	21 - 38	

(a) estimaciones realizadas por Cook *et al.*, 1997, considerando un caudal de 192.21 m³/ ton. y 17.84 m³/ ton. de pulpa producida para el mínimo y máximo valor dado, respectivamente.

II.1.4. Toxicidad de los efluentes y sus efectos sobre los organismos acuáticos

A partir de los estudios realizados sobre *Perca fluviatilis* (1984/1985), se ha demostrado que los efluentes provenientes de las industrias de celulosa Kraft con blanqueo convencional causan serias alteraciones sobre las funciones bioquímicas y fisiológicas vitales, las cuales pueden afectar la sobrevivencia de los peces. Los resultados revelan que los peces son fuertemente afectados por estos efluentes. Algunos síntomas son: reducción del crecimiento gonadal, dilatación del hígado, fuerte inducción de la actividad de ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) en el hígado, alteración en el metabolismo de carbohidratos, disturbios en el balance iónico del plasma, estimulación en la producción de células rojas y una alterada capa de células blancas indicando un debilitado sistema inmune. La disminución en la talla de las gónadas indica inhibición del crecimiento gonadal y un subsiguiente daño o retardo en el desarrollo de las células germinales. Esto va acompañado por reducción de los niveles esteroidales, lo cual fortalece las sospechas de que la exposición de los peces a los efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada produce serios disturbios en su reproductividad fisiológica. En consecuencia, los parámetros bioquímicos y fisiológicos (ej. Actividad de EROD, tamaño de gónadas, cantidad de linfocitos, metabolitos de carbohidratos y composición iónico del plasma), pueden ser usados como indicadores sensitivos y confiables de los efectos tóxicos sobre las poblaciones naturales de peces expuestos a estos efluentes (Förlin *et al.*, 1995). Aunque la toxicidad de los efluentes en general ha disminuido durante las últimas décadas, alteraciones reproductivas son comunes en los peces receptores y se han asociado con un estado hormonal alterado.

La disrupción endocrina observada en los peces expuestos a los efluentes de las industrias de celulosa Kraft, dice relación con los compuestos organoclorados como las dioxinas y furanos, que se generan durante el proceso de blanqueo con cloro elemental o estándar. Sin embargo, los efectos sobre la reproducción de los organismos acuáticos, en análisis de terreno y laboratorio, para los efluentes provenientes de los procesos de blanqueo ECF y TCF, se siguen observando.

Esto sugiere que los compuestos derivados de la madera, como los fitosteroles, presentes en los efluentes de la industria de celulosa Kraft, pueden causar cambios hormonales en peces, estos compuestos hormonalmente activos llamados fitoestrógenos, han sido identificados en numerosas plantas comestibles y asociados con efectos adversos sobre la reproducción del ganado y de la vida silvestre. La madera contiene fitoestrógenos tales como el β -sitosterol. Estos estrógenos derivados de la madera incluyendo el β -sitosterol pueden suprimir la producción de esteroides testiculares y consecuentemente impedir la capacidad de reproducción en el pez macho (Mellanen *et al.*, 1999). Además, se ha encontrado que el poliqueto *Mustela putorius* expuesto a dosis de fitosteroles, además de sufrir disrupción endocrina, cambios en los niveles de testosterona y estradiol, su metabolismo intermediario también se ve afectado con un incremento en el contenido de glicógeno en el hígado, así como una aumentada actividad de glucosa 6-fosfatasa del riñón y disminución en los niveles de colesterol “malo” o LDL (Lipoprotein Density Light) (Nieminen *et al.*, 2002). Por tanto, se ha demostrado que los efluentes de la industria de celulosa Kraft pueden ser una fuente de fitosteroles (fitoestrógenos) para el medio acuático. Así, el β -sitosterol reduce la capacidad reproductora en el pez *Carassius auratus* por disminución de niveles de testosterona y 11-Ketotestosterona en los machos, y niveles de testosterona y 17 β -estradiol en las hembras. Además, el β -sitosterol induce la expresión del gen vitelogenino en trucha *Oncorhynchus mykiss* (Nieminen *et al.*, 2002).

El hígado de pez macho o juvenil puede ser inducido por estrógenos para sintetizar y secretar grandes cantidades de ésta proteína. Esta inducción conduce a la disminución del tamaño de huevo y gónada, decrecimiento de las características sexuales secundarias y reducción de los niveles de esteroides sexuales del plasma luego de la exposición a β -sitosterol, pudiendo ser, tales síntomas, independientes de los efectos en la gónada pituitaria. De esta manera, el nivel de vitelogenina en pez macho, puede ser usado como un biomarcador ecotoxicológico específico y confiable de contaminación estrogénica de los efluentes (Mellanen *et al.*, 1999).

Algunos resultados indican que el efecto estrogénico está asociado con la exposición hacia los efluentes de la industria de celulosa Kraft, pues el incremento de la expresión del gen vitelogenino en peces machos, visto en la cercanía de la industria en estudio, es inducido por contaminantes estrogénicos derivados de la madera o sus semejantes presentes en los efluentes. La industria de celulosa Kraft blanqueada es responsable de las grandes descargas de compuestos derivados de la madera tales como, esteroides y ácidos resínicos, en fracciones solubles y particuladas, dentro del lago. Compuestos estrogénicos descargados en el licor negro y en los efluentes pueden causar continuos problemas de reproducción en los peces, ya sea en ausencia de blanqueo con cloro o en presencia de tratamiento secundario.

Por otra parte, un fuerte efecto de algunos efluentes de la industria de celulosa y papel es el desarrollo de características sexuales secundarias masculinas (disrupción endocrina androgénica) en pez hembra *Poecilia reticulata* (Larsson *et al.*, 2002). Los fitosteroides presentes en el licor negro no pueden ser eliminados como una fuente de masculinización porque bajos niveles de éste licor están presentes en los efluentes. La escasez de hembras altamente masculinizadas permite predecir que una reducción total en el grado de masculinización está asociado con la recuperación del tall-oil (licor negro). Las industrias ahora recuperan aproximadamente el 97% del tall-oil y terpenos (productos complementarios a los procesos de deslignificación de la pulpa de madera) (Cody, 1997).

Otros estudios indican que los fitosteroides, tales como el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol contienen anillos esteroidales y podrían ser potencialmente convertidos por *mycobacterium sp.* en esteroides, incluyendo androstadienediona y androstenediona, los cuales pueden actuar como andrógenos (Larsson *et al.*, 2002; Jenkins *et al.*, 2001). La modificación bacteriana no es la única fuente posible de compuestos androgénicos presentes en los efluentes de la industria de celulosa y papel, sino que también pueden ser suplidos directamente, al menos en pequeñas cantidades, por los productos vegetales. Por ejemplo, la androstenediona se ha identificado en el polen del pino scotch (*Pinus sylvestris*).

Los esteroides presentes en estos efluentes pueden tener efectos masculinizantes como andrógenos o como precursores de andrógenos o por la interferencia con esteroides biosintéticos o por los procesos de biodegradación en los ovarios, tejidos renales o hígado (Jenkins *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de los disruptores endocrinos, provenientes de los efluentes de la industria de celulosa, aún no está dilucidado (Larsson *et al.*, 2002).

Por otro lado, la inducción de la actividad de glutathion reductasa (GR) por los efluentes de la industria de celulosa en experimentos, “in vitro” y “in vivo”, es una respuesta al estrés oxidativo que puede indicar la presencia de compuestos en los efluentes que causan incremento en la demanda de glutathion reducido (GSH). Muchos compuestos o sus metabolitos pueden sufrir ciclos redox y generar, por lo tanto, oxiradicales causando daño oxidativo.

Aunque haya una gran cantidad de fitosteroles detectables en los extractos coloidales (del Río *et al.*, 1998), en las aguas de proceso (Gutiérrez *et al.*, 2001) y consecuentemente en los efluentes de la industria de celulosa Kraft (Cook *et al.*, 1997), el β -sitosterol es el compuesto dominante en la fracción de esteroides detectados. Debido a los efectos adversos de estos compuestos, se hace necesario reducir la emisión de ellos hacia el medio acuático, empleando tecnologías de tratamientos de efluentes como lagunas de estabilización aireada y lodos activados. Estudios ya realizados con 22 plantas de pulpaje en EE UU muestran eficiencia de remoción de los fitosteroles en el rango de 64-79% (Cook *et al.*, 1997). En el mismo contexto, en la industria de celulosa Kraft con blanqueo ECF localizada al este de Finlandia, durante el tratamiento de sus aguas residuales, las concentraciones de los extractivos de la madera fueron reducidas sobre un 97%. En el tratamiento de lodo activado, sobre un 94% de los ácidos resínicos y sobre un 41% de los esteroides fueron degradados o transformados en otros compuestos (Kostamo & Kukkonen, 2003). Esteroides totales medidos en los efluentes de la industria de celulosa fueron removidos, mediante el sistema de tratamiento de lodo activado, con un promedio de eficiencia de remoción de un 72 y 66% para las dos industrias inspeccionadas (Mahmood-Khan & Hall, 2003).

II.1.5. Genotoxicidad de los efluentes de la industria celulósica

La genotoxicidad es el efecto que se produce sobre el ADN y otros blancos celulares que controlan la integridad del material genético. Esto incluye inducción de aductos de ADN, ruptura de la doble hélice, mutaciones puntuales y alteraciones cromosomales (estructurales y numéricas) (Gollapudi & Krishna, 2000). En otras palabras, la genotoxicidad es el daño a nivel del ADN producto de las interacciones entre las moléculas de ADN y compuestos químicos tóxicos.

La modificación química de ADN es generalmente aceptada como una etapa de iniciación de la carcinogénesis, por lo tanto, futuras generaciones podrían ser afectadas por una reducida viabilidad embrionaria y desordenes genéticos, siendo de crucial importancia la evaluación de la genotoxicidad en los estudios ambientales (Ericson & Larsson, 2000).

Se han identificado varias industrias, tales como manufactureras de tinturas, refinerías de petróleo, de metales e industrias de celulosa y papel, como emisoras de efluentes genotóxicos y mutagénicos (Claxton *et al.*, 1998).

Aunque los análisis químicos son los métodos principales para evaluar el potencial de toxicidad de los efluentes, está claro que tal aproximación contiene limitaciones inherentes. En contraste a los análisis químicos, los bioensayos proveen un medio de evaluación de toxicidad de mezclas complejas sin un previo conocimiento sobre la composición química de la mezcla. Así, la genotoxicidad de los efluentes puede ser efectivamente evaluada, a través de bioensayos sin requerir información previa sobre su composición química. La evaluación biológica, toxicidad aguda y test de genotoxicidad, para las descargas de los efluentes es obligatoria en algunos campos, mientras en otros los efluentes son evaluados sólo por sus propiedades químicas y físicas.

En los efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada, que son descargados a partir de las eficientes plantas de tratamiento secundario, se ha detectado baja toxicidad aguda. Sin embargo, tales efluentes pueden incluir compuestos que causan efectos a largo plazo, siendo, por ejemplo, genotóxicos, hormonalmente activos o bioacumulativos.

Muchos de estos compuestos aparecen a bajas concentraciones o son de características químicas desconocidas y esto no sólo hace que los análisis químicos requieran tiempo, sino también métodos de alta tecnología. Por ésta razón, el uso de ensayos biológicos en el monitoreo de los efluentes puede ser útil. Resultados muestran que los efluentes o aguas residuales pueden tener diversas propiedades y debido a esto su evaluación podría no ser limitada sólo análisis químico o a uno o dos ensayos. Por tanto, una rápida batería de bioensayos para la evaluación de la toxicidad aguda y crónica, la genotoxicidad y los efectos hormonales podría ser conveniente para el monitoreo biológico del efluente total (Piia Pessala *et al.* , 2004).

De los procesos de pulpaje resulta una compleja descarga conteniendo lignina disuelta, productos de degradación de la celulosa y extractivos de la madera tales como terpenoides, ácidos resínicos, fitosteroles y constituyentes fenólicos. Además, compuestos derivados del proceso de blanqueo. De los contaminantes identificados en los efluentes de la industria de celulosa Kraft un número significativo de químicos (sobre 300) son clasificados como clastogénicos, mutagénicos y carcinogénicos. Houk (1992) enumeró 31 compuestos genotóxicos, originados naturalmente de la pulpa o formados en la etapa de cloración. Los efluentes totales provenientes de la industria procesadora de la madera son una de las mayores fuentes de contaminación acuática, pues inducen activación de biotransformación y genotoxicidad a diferentes niveles biológicos. En estudios de genotoxicidad (mutagenicidad) con bacterias se ha demostrado que los efluentes de la industria celulósica poseen un potencial daño sobre el ADN. Utilizando el test de Ames, se ha descrito la inducción de mutación, principalmente, por sustitución de bases. Estudios recientes han demostrado que los efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada podrían ser una fuente de compuestos genotóxicos, pues se ha observado un aumento en la concentración de aductos de ADN dosis-dependiente en *Onchorhynchus tshawytscha* y *Perca fluviatilis*, indicando que los peces fueron expuestos a contaminantes potencialmente genotóxicos.

Por otra parte, se demostró elevados niveles de micronúcleos hepáticos en trucha rainbow (*Onchorhynchus mykiss*) después de la inyección de una fracción mutagénica proveniente de extractos de efluente de industria de pulpa, a pesar de la ausencia de respuesta mutagénica usando la cepa *S. typhimurium* TA-100 sin activación microsomal. En otros trabajos, mediante el test de Ames, se ha evidenciado genotoxicidad en trucha, debido al contenido de mutágenos en dichos efluentes. (Maria *et al.*, 2003; Pirjo Sipi *et al.*, 1997; Ericson & Larsson, 2000).

Los estudios de genotoxicidad, utilizando el test de Ames, han mostrado que licores provenientes de la etapa de cloración son significativamente más genotóxicos que otros procesos de extracción de lignina (extracción alcalina, etapas de dióxido de cloro o hipoclorito), y que los efluentes liofilizados son genotóxicos en cultivos de células de mamíferos. Ensayos “in vivo” e “in vitro” han demostrado que químicos principalmente clorados de bajo peso molecular son responsables de la actividad genotóxica (Maria *et al.*, 2004). No obstante, se ha demostrado el potencial genotóxico de ácido dehidroabiético (DDHA) y ácido abiético (AA) (Pacheco & Santos, 2002; Maria *et al.*, 2003). Otros estudios, indican que los efluentes bioblanqueados (hemicelulasa) poseen leve efecto genotóxico, señalando que compuestos clorofenólicos presentes, en el efluente derivado del proceso de blanqueo convencional Kraft, están también presentes en el efluente del proceso de blanqueo enzimático (Pérez-Alzola & Santos, 1997). No así, en un experimento recientemente realizado en el laboratorio, trucha rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a un efluente de industria de celulosa kraft proveniente de un proceso totalmente libre de cloro, exhibieron formación de aductos de ADN de hígado, sugiriendo que, al menos parte de sustancias genotóxicas presentes en los efluentes de la industria no tienen relación alguna con el cloro o tipos de procesos de blanqueo, debido que, al parecer derivados provenientes de los extractivos de la madera serían los responsables de dichos efectos genotóxicos (Ericson & Larsson, 2000).

Los ácidos resínicos son conocidos por su mutagenicidad (genotoxicidad), mientras que la escasa información sobre los fitosteroles (fitoestrógenos) señalan que estos y ésteres de fitosteroles no muestran actividad mutagénica evidente en ninguno de los ensayos utilizados (ensayo de mutación bacteriana y ensayo de aberración cromosomal “in vitro”) cuando es evaluado de acuerdo a las pautas OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) para la evaluación de la genotoxicidad de químicos (Wolfreys & Hepburn, 2002). Otros resultados muestran que un concentrado de oxido de fitosteroles conteniendo aproximadamente un 30% de oxido de fitosteroles no posee potencial genotóxico ni evidencia de toxicidad cuando es administrado en la dieta de rata por 90 días consecutivos (Lea *et al.*, 2004). En contraste, se ha establecido la actividad genotóxica de los metabolitos de estradiol y estrona. El potencial genotóxico de estradiol, estrona y acetato de ciproterona con sus análogos puede jugar un rol anormal bajo condiciones fisiológicas y terapéuticas (Joosten *et al.*, 2004).

La activación de ciertos xenobióticos resulta en la producción de oxiradicales, los cuales reaccionan con muchas moléculas biológicas, incluyendo el ADN cuya integridad puede ser afectada. Considerando los riesgos asociados con el ADN, la implementación de biomarcadores de genotoxicidad tales como aducto de ADN, ruptura de la doble hélice de ADN, micronúcleo y anormalidades nucleares eritrocíticas (ENAs; Erythrocytic Nuclear Abnormalities) es de particular importancia.

La predominancia de los metabolitos epóxidos, junto con los metabolitos de saturación y/o conjugación de la fase II, contribuyen a la formación de enlaces covalentes con el ADN. Así, efectos genotóxicos pueden ser esperados en los peces expuestos hacia xenobióticos, si la fase II (conjugación) es estresada y el mecanismo de reparación de ADN es inhibido. No obstante, no ha sido posible establecer una relación entre actividad de biotransformación y genotoxicidad, puesto que los resultados obtenidos son variables, así por ejemplo, en *A. anguilla* expuesta a ácido abiético, una baja actividad de EROD hepático parece ser capaz de inducir un incremento en la ruptura de las hebras de ADN, mientras que anormalidades nucleares eritrocíticas (ENAs) fueron observadas sólo después de una larga exposición hacia mayores concentraciones de ácido Abiético (Maria *et al.*, 2004).

En otros estudios, la inducción de ENA en *A. anguilla* expuesta a los efluentes de la industria celulósica no fue asociada con una inducción precedente o simultánea de EROD, señalando que ésta respuesta genotóxica no depende de una alta variedad de actividad de biotransformación. Sin embargo, los mayores niveles de ENA fueron observados cuando los peces exhiben los mayores niveles de actividad de EROD, sugiriendo que, particularmente para ácido dehidroabiético (DHAA), una fuerte actividad de biotransformación podría potenciar la expresión de la genotoxicidad. Por lo tanto, la eventual interdependencia entre las respuestas previas puede variar con el contaminante.

Algunos autores sugieren que la actividad enzimática aumentada de la fase I, tal como la actividad de EROD, es una importante alteración fisiológica que puede promover un efecto genotóxico adverso, causado por la biotransformación de algunos compuestos de los efluentes, tales como DHAA, AA, fitosteroles y reteno en metabolitos activos. Sin embargo, la relación entre la inducción de las oxigenasas de función mixta (MFO; Mixed Function Oxigenase) y la genotoxicidad en peces no está completamente clarificada (Maria *et al.*, 2003).

Los tests de genotoxicidad de complejos efluentes industriales y sitios medio ambientales contaminados demostraron que éstas mezclas ambientales contienen tóxicos potencialmente cancerígenos no identificados, y por lo tanto, no regulados. Se ha demostrado que extractos de los efluentes de la industria celulósica contienen actividad mutagénica e inducen respuestas bioquímicas en los peces, tal como una actividad aumentada del sistema enzimático MFO.

Los tratamientos de los efluentes de la industria de celulosa Kraft han mostrado reducción o eliminación de la genotoxicidad. Sin embargo, resultados demuestran que los compuestos genotóxicos están aún presentes luego de ser tratados con lodo activado, pues las rupturas de las hebras de ADN, en muestras de sangre y homogeneizado de hígado de peces, ocurrió a las 72 horas de exposición. En otros casos, tratamiento y remediación, han mostrado aumento de la genotoxicidad, tal como el tratamiento de aceite crudo mediante degradación por hongos (Claxton *et al.*, 1998).

Debido a que, muchas veces la genotoxicidad de las aguas residuales industriales o efluentes permanece aún después de ser tratadas, surge la siguiente interrogante ¿son las sustancias genotóxicas no biodegradables? la respuesta es probablemente no. Los compuestos genotóxicos son, en general hidrofóbicos, fácilmente absorbidos dentro del lodo. Por lo tanto, una vez que la interacción xenobiótico-ADN toma lugar, estos tóxicos podrían ser modificados biológicamente tornándose en metabolitos aún más tóxicos. Esto debe ser otro factor desconocido involucrado en los bajos rangos de remoción de la genotoxicidad en los procesos de lodo activado (Takigami *et al.*, 2002). La genotoxicidad remanente en los efluentes tratados sugiere que muchos micropolutantes genotóxicos desconocidos pueden pasar a través de los procesos de tratamiento de aguas residuales, tal como sucede en el tratamiento de lodo activado. Resultados del ensayo “rec” de *B. subtilis* muestran que la contaminación genotóxica es ampliamente extendida en las aguas ambientales y éste tipo de contaminación no puede ser efectivamente removida por los procesos de tratamientos convencionales. En consecuencia, para proteger los ecosistemas, se hace necesario desarrollar nuevas estructuras de tecnología ambiental (Takigami *et al.*, 2002). Estrategias de tratamiento han fluctuado desde simples hasta sofisticados esfuerzos de ingeniería que incluyen el aumento del pH del efluente, sustitución de cloro por dióxido de cloro, tratamiento de los efluentes con dióxido de sulfuro, uso de lagunas aireadas, y el uso de métodos de intercambio iónico.

Los procesos de tratamiento podrían reducir o eliminar la genotoxicidad de un efluente. Un ejemplo donde el tratamiento puede reducir efectivamente la genotoxicidad del efluente industrial en varios órdenes de magnitud es ilustrado por el uso de tratamiento secundario de aguas biotratadas (lagunas de aireación) de la industria de celulosa. Sin embargo, el tratamiento de aguas no siempre reduce la genotoxicidad de los efluentes y puede en algunas instancias incrementar la genotoxicidad. Por lo tanto, los ensayos de genotoxicidad proveen un medio efectivo para el monitoreo medio ambiental y para seleccionar procesos de tratamientos apropiados (Claxton *et al.*, 1998).

Los estudios sobre la genotoxicidad de los efluentes industriales, evaluados principalmente a través del bioensayo de mutagenicidad en *S. typhimurium*, indican que estos presentan un relativo potencial mutagénico.

Cerca del 60% de los estudios han usado el ensayo con *S. typhimurium* o test de Ames, el 22% han utilizado otros ensayos de mutación, 10% usó ensayos cromosomales, y el 7%, el ensayo “rec” de *B. subtilis*, para determinar daño al ADN; Aproximadamente el 2,5% utilizaron ensayos con animales vivos (Claxton *et al.*, 1998). La razón por la que se ha usado mayormente el ensayo con *S. typhimurium* y el uso limitado de otros ensayos es que este (Ames) representa mejor lo que sucedería en las células eucarióticas (organismos superiores).

Aunque los bioensayos comúnmente disponibles no pueden proveer información precisa y detallada sobre la naturaleza química de los mutágenos detectados, tales ensayos proveen una posible respuesta a la interrogante si las muestras examinadas contienen mutágenos a niveles potencialmente dañinos para los organismos. Por lo tanto, se ha visto que la estrategia más razonable para la evaluación de las muestras ambientales es el uso de ensayos biológicos como un test preliminar para detectar la presencia de compuestos mutagénicos y genotóxicos.

El ensayo “rec” de *B. subtilis* fue especialmente diseñado para evaluar la genotoxicidad de varios tipos de aguas. Este ensayo puede ser una herramienta muy poderosa, gracias a su mayor sensibilidad para la detección de mutágenos en las aguas altamente poluídas, comparado con otros ensayos de mutagenicidad (Takigami *et al.*, 2002).

Aunque el ensayo “rec” de *B. subtilis*, ensayo de daño a nivel de ADN, no es un ensayo de mutagenicidad, este es muy útil, sumado a los ensayos mutagénicos para programas de screening preliminares (Mazza, 1982). El acoplamiento de ensayos utilizando bacterias (test de Ames) con ensayos químicos amplía la utilidad de estos bioensayos y permite el aislamiento e identificación de fracciones químicas definidas que contienen actividad genotóxica (Claxton *et al.*, 1998).

Estos bioensayos son complementarios cuando son aplicados a un screening de los efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada por su potencial genotóxico (Rao *et al.*, 1995).

Los bioensayos de genotoxicidad constituyen una herramienta integral en la evaluación de compuestos genotóxicos presentes en el ambiente suministrando información útil sobre los posibles riesgos hacia el medio ambiente y su ecosistema.

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO III

III.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.1. Diseño Experimental

Se evaluó la genotoxicidad mediante el ensayo “rec” de *Bacillus subtilis* y la mutagenicidad con *Salmonella typhimurium* o test de Ames sin activación metabólica, sobre muestras de fitosteroles que correspondieron a soluciones estándares de β -sitosterol y estigmasterol cuyas concentraciones fluctuaron entre 1 y 32 mgL⁻¹. Así también, muestras de efluentes de la industria de celulosa Kraft con y sin tratamiento biológico, en dosis de 0,1 a 0,5 mL. Para estigmasterol se realizó el ensayo de mutagenicidad en presencia de activación metabólica (mezcla S9).

III.1.2. Muestras de efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada

Las muestras fueron obtenidas de industrias de celulosa Kraft blanqueada que utilizan como materia prima el *Pinus radiata*. Las etapas de blanqueo de éstas industrias están sujetas a tecnologías libre de cloro elemental (ECF), con secuencias de Blanqueo D-Eop-D-D, previo a una etapa de deslignificación con oxígeno.

Las muestras de efluente de la industria celulósica fueron previamente sometidas a tratamiento biológico aerobio y anaerobio en el laboratorio de biotecnología ambiental del Centro de Ciencias Ambientales EULA, Chile. Dichos tratamientos corresponden a laguna aireada y a un biorreactor anaerobio con biomasa inmovilizada.

III.1.3. Reactivos

Los fitosteroles, β -sitosterol (22,23-Dihydrofucosterol) cuyo peso molecular es 414,7 g/gmol con un 95% de pureza, constituido por un 75,5% de β -sitosterol y un 13,0% de β -sitostanol, y el estigmasterol, 3 β -Hydroxy-24-ethyl-5,22-Cholestadiene, con peso molecular

412,7 g/gmol y un 95% de pureza fueron proveídos por Calbiochem y Sigma, respectivamente.

Araclor 1254 inducido en KCl, preparaciones de homogeneizado de hígado de rata (fracción microsomal S9) y nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido, NADPH Regensys A, fueron obtenidos de Gene X Press *Life Science Business*.

III.1.4. Ensayo “rec” de *Bacillus subtilis*

El ensayo “rec” de *B. subtilis* se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Mazza (1982), utilizándose las cepas *B. subtilis* 1652 rec(+) y *B. subtilis* 1791 rec(-).

Se preparó una solución estándar de 100 mgL^{-1} de β -sitosterol y estigmasterol. A partir de ellas se realizaron diluciones crecientes de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 mgL^{-1} . Luego desde un cultivo de *B. subtilis* de toda la noche se efectuó una dilución seriada de la cepa rec(+) y rec(-) hasta 10^{-4} y ésta última diluida a la mitad. A continuación se adicionó 0,1 mL de cada una de las concentraciones, anteriormente mencionadas, del fitosterol correspondiente y 0,1 mL de cada cepa previamente diluida, en tubos que contenían agar soft mantenidos en baño maría en seco a una temperatura de 45°C . Finalmente, el contenido de estos tubos fueron vertidos sobre placas petri rotuladas y preparadas con agar nutritivo, agitando cada vez los tubos antes de ser vertidos en un vortex modelo M-16710-12-26 y distribuyendo la mezcla homogéneamente sobre la superficie de las placas. Una vez solidificado el agar, las placas se incubaron a 37°C durante 19 a 24 horas. El control se realizó del mismo modo pero en ausencia de las soluciones de β -sitosterol y estigmasterol. Después de incubar se realizó el recuento de las colonias desarrolladas en las placas y los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonias (UFC).

Las muestras de efluentes ajustadas a pH 7,0 fueron previamente filtradas a través de filtros millipore de $0,25 \mu\text{m}$ y se realizó, posteriormente, el ensayo “rec” de *B. subtilis* del mismo modo descrito para los fitosteroles. En dosis de 0,1, 0,3 y 0,5 mL de efluente. Todos los ensayos se realizaron en duplicado.

El ensayo “rec” de *B. subtilis* se basa en la diferencia relativa de sobrevivencia (N/No) de la cepa rec(+) capaz de reparar el daño causado sobre el ADN, y su cepa deficiente rec(-). La diferencia entre sus sobrevivencias es, por lo tanto, interpretado simplemente como genotoxicidad. Usando este criterio los resultados son expresados en una curva dosis-respuesta, dónde un claro efecto se manifiesta cuando la sobrevivencia de la cepa rec(-) es significativamente menor respecto de la sobrevivencia de la cepa rec(+), a medida que aumenta la dosis o concentración de la muestra a evaluar. Por lo tanto, el valor de eficiencia de placa (A) menor que 1 indica presencia de efecto genotóxico, Así:

$$A = N/No \text{ rec}(-) / N/No \text{ rec}(+) \quad (1)$$

Dónde,

-N/No rec(-) = unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa rec(-) de placa ensayo en presencia del contaminante o muestra / UFC de la cepa rec(-) en ausencia del contaminante (control).

-N/No rec(+) = unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa rec(+) de placa ensayo en presencia del contaminante o muestra / UFC de la cepa rec(+) en ausencia del contaminante (control).

III.1.5. Test de Ames

Los análisis de mutagenicidad se realizaron utilizando el test de Ames descrito por Ames *et al.* (1975) y modificado por Maron & Ames (1983).

A tubos con top agar, suplementado con 0,05 mM de histidina y biotina, y mantenidos en baño seco a 45°C, se adicionó en duplicado 0,1mL de cada una de las diluciones de las soluciones estándares, anteriormente preparadas, del fitosterol correspondiente, luego se agregó por separado 0,1mL de un cultivo de 18-24 h de *S. typhimurium*, cepas TA-100 y T-A98. A continuación, se agitó el contenido de cada tubo en un vortex modelo M-16710-12-26 y se vertió sobre placas petri con agar mínimo glucosa adecuadamente rotuladas y se

homogenizaron manualmente. Una vez solidificado el agar de superficie (top agar), las placas se incubaron a 37°C durante 72 h. Se efectuó el recuento y los resultados fueron expresados como número de revertantes promedio por placas \pm desviación estándar (DE) para tratamientos y controles.

Las muestras de los efluentes ajustadas a pH 7,0 se filtraron a través de filtros millipore de 0,25 μ m y se realizó el test de Ames del mismo modo descrito para los fitosteroles. En dosis de 0,1, 0,3 y 0,5 mL de efluente. Todos los ensayos se realizaron en duplicado.

El test de Ames con activación metabólica, en presencia de fracción S9, fue realizado sólo para el estigmasterol, agregando 0,5 mL de ésta fracción en los tubos con top agar, antes de adicionar las diluciones de la solución estándar de estigmasterol.

Para cada ensayo se realizó un control positivo con 0,1mL de 2-Antramina y un control negativo con 0,1 mL de agua estéril, cada uno de ellos en duplicados.

Previo a los ensayos se confirmaron las características fenotípicas de las cepas utilizadas. La determinación de la tasa de reversión espontánea, la tasa de reversión por acción de un agente mutágeno conocido (control positivo) y la viabilidad de la cepa se realizaron en cada experimento.

Usando éste procedimiento, la mutagenicidad se expresó en términos de la razón de mutagenicidad (RM), expresada como la relación entre el número de revertantes obtenidas con la muestra ensayada y el número de revertantes naturales (reversión espontánea).

Se considera una respuesta positiva cuando la RM es mayor o igual a 2 y existe un claro efecto dosis-respuesta. Así,

$$RM = E / C \quad (2)$$

Donde,

-E = número de colonias revertantes placa ensayo (revertantes inducidas).

-C = número de colonias revertantes en la placa control negativo (revertantes espontáneas).

III.1.6. Análisis estadístico

Los resultados del ensayo “rec” de *B. subtilis* así como también, del test de Ames fueron tratados con el programa Statistix for Windows 2.2.

Con el propósito de encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$) los resultados obtenidos de eficiencia de placa y razón de mutagenicidad (variables dependientes), fueron sometidos a análisis de varianza de una y dos vías (ANOVA). Luego de encontrar diferencias se aplicó la prueba paramétrica Bonferroni para comparación de promedios, ya sea de eficiencia de placa y/o razón de mutagenicidad, según corresponda. Las variables independientes utilizadas fueron dosis (o concentración) y muestra, la cual en algunas instancias posee réplicas, es decir el ensayo se realizó más de una vez con la misma muestra. En el caso del test de Ames se incluyó además la variable independiente cepa con dos niveles, TA-100 y TA-98.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

CAPÍTULO IV

IV.1. RESULTADOS

IV.1.1. Ensayo “rec” de *Bacillus subtilis*

En la Figura 4-1 y 4-2 se muestran los resultados de genotoxicidad al ensayar los fitosteroles, β -sitosterol y estigmasterol, respectivamente con *B. subtilis*.

IV.1.1.2. β -sitosterol

En la Figura 4-1 se observan los resultados obtenidos al ensayar el β -sitosterol. La sobrevivencia de ambas cepas se mantiene constante hasta los 16 mgL^{-1} . A partir de esta concentración la cepa rec(+) tiende a incrementar su sobrevivencia a medida que aumenta la concentración de β -sitosterol, lo que podría deberse a que dicho compuesto estaría siendo metabolizado por esta cepa. Mientras que la sobrevivencia de la cepa rec(-) se ve levemente afectada en presencia de éste compuesto puesto que, dicha cepa se caracteriza por ser incapaz de reparar el daño causado a nivel del ADN. Por lo tanto, el β -sitosterol muestra un efecto genotóxico a concentraciones superiores a 16 mgL^{-1} , debido a la diferencia relativa de sobrevivencia existente entre las cepas.

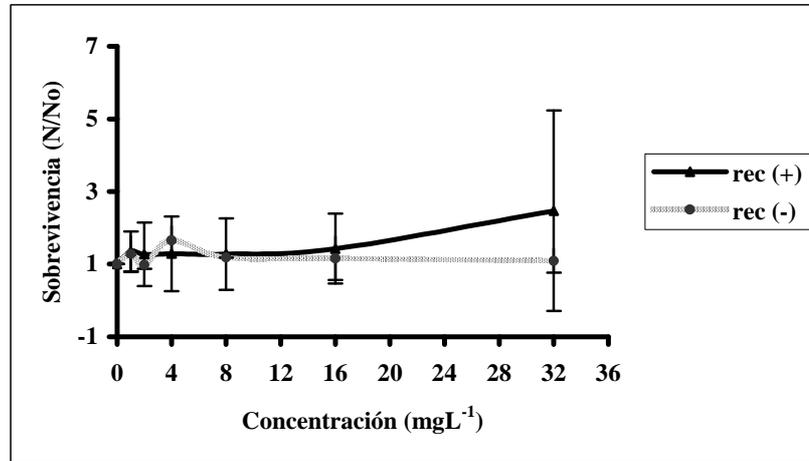


Figura 4-1. Fracción de sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* 1652 rec(+) y *B. subtilis* 1791 rec(-) en presencia de diferentes concentraciones de β -sitosterol.

IV.1.1.3. Estigmasterol

En la Figura 4-2 se muestran los resultados obtenidos al ensayar el estigmasterol. Se observa que la sobrevivencia de la cepa rec(+) sufre variaciones, y la relación N/No es mayor que 1, en cambio dicha relación para la cepa rec(-) se mantiene constante. Pero existe una marcada diferencia entre los valores de la fracción de sobrevivencia de la cepa rec(+) y rec(-) respectivamente, lo que significa que el compuesto ensayado presenta una actividad genotóxica, en el rango de concentración estudiada.

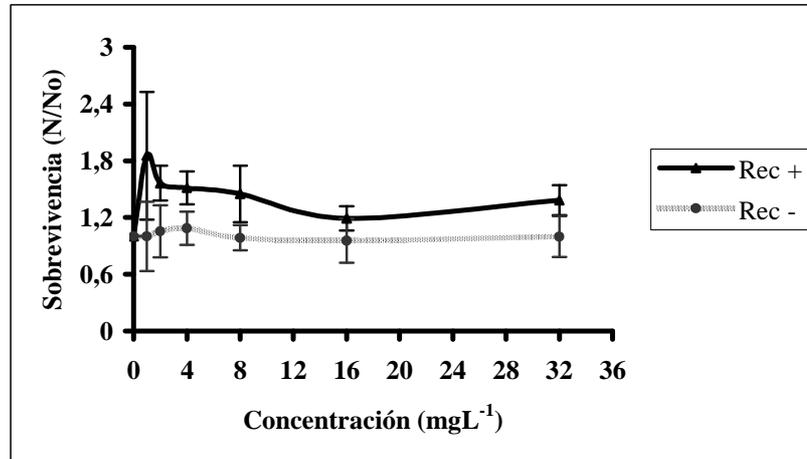


Figura 4-2. Fracción de sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* 1652 rec(+) y *B. subtilis* 1791 rec(-) en presencia de diferentes concentraciones de estigmasterol.

El valor promedio de eficiencia de placas para cada esteroide demuestra que el estigmasterol es más genotóxico ($A = 0,6917$) que el β -sitosterol ($A = 1,1342$) (Bonferroni), existiendo diferencias significativas entre estos valores ($p < 0,05$). Sin embargo, los valores promedio de eficiencia de placas, no son significativamente diferentes entre las concentraciones por fitosterol usado (interacción concentración-compuesto).

En general, la sobrevivencia promedio de cada una de las cepas, ya sea para el β -sitosterol o el estigmasterol, son significativamente diferentes una de otra ($p < 0,05$), así la cepa rec(+) posee mayor sobrevivencia promedio ($N/No = 1,5012$) que la cepa rec(-) ($N/No = 1,1187$). Por tanto, ambos fitosteroles tendrían un efecto genotóxico.

IV.1.1.3. Influentes primario

En la Figura 4-3 se muestra una fotografía del ensayo “rec” donde es posible apreciar la diferencia relativa de sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* 1652 rec(+) y *B. subtilis* 1791 rec(-) en función de la dosis creciente de Influyente 1, lo cual representa un efecto genotóxico, ya que a medida que aumenta la dosis del Influyente (de izquierda a derecha) las unidades formadoras de colonias desarrolladas por la cepa rec(+) son mayores en comparación con las UFC de la cepa rec(-), y estas a su vez, son menores que las placas del control. En la figura 4-4, se presentan en la fila superior el crecimiento de colonias de *B. subtilis* 1652 rec(+) y en la fila inferior las UFC de la cepa de *B. subtilis* 1791 rec(-), desarrolladas en ausencia del contaminante (Influyente 1).

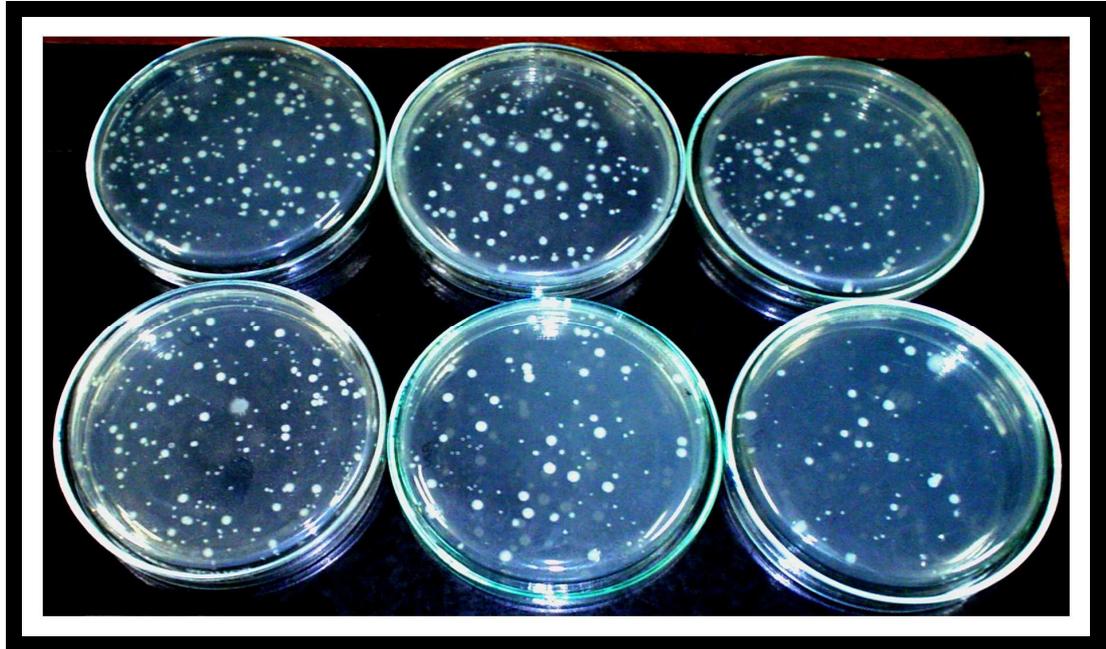


Figura 4-3. Diferencia relativa de sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* en función del aumento de la dosis de influente 1. Donde la fila superior corresponde a UFC de la cepa de *B. subtilis* 1652 rec(+) y la fila inferior a UFC de *B. subtilis* 1791 rec(-).

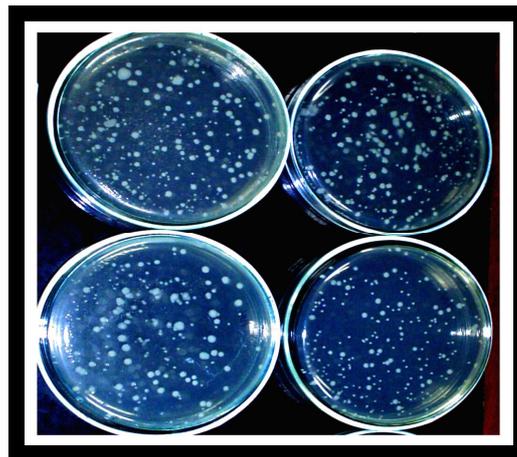
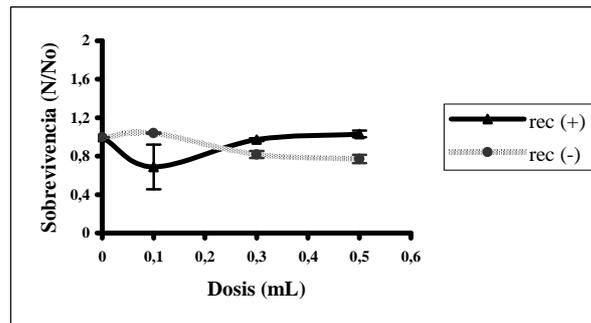


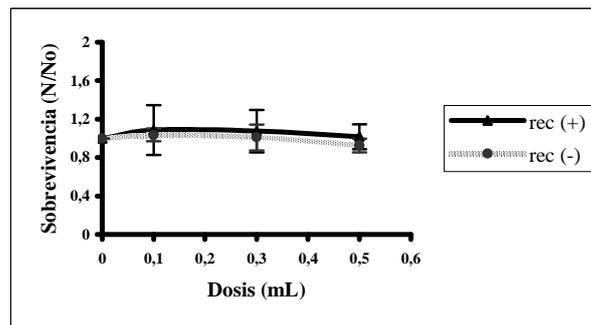
Figura 4-4. UFC de la cepa de *B. subtilis* 1652 rec(+) (fila superior) y UFC de *B. subtilis* 1791 rec(-) (fila inferior) desarrolladas en ausencia del contaminante.

En la Figura 4-5 se muestran los resultados obtenidos al ensayar una muestra de efluente de la industria de celulosa Kraft sin previo tratamiento biológico (Influente 1).

A)



B)



C)

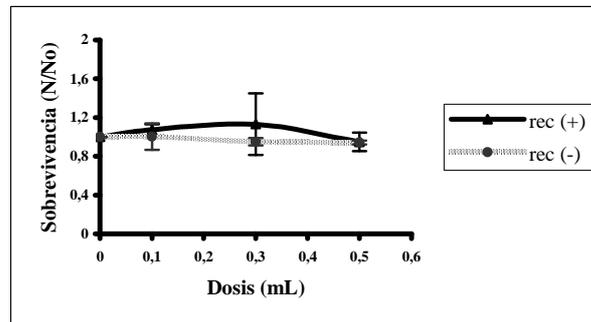
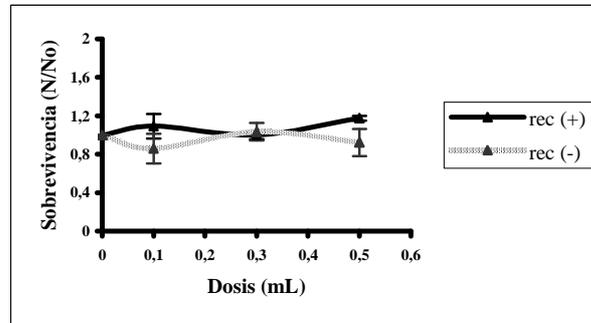


Figura 4-5. Fracción de sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* 1652 rec(+) y *B. subtilis* 1791 rec(-) en presencia de diferentes dosis de Influyente 1 con tres réplicas (A, B y C).

El Influyente 1 (Figura 4-5) presenta efecto genotóxico en el rango de dosis usada, ya que existe diferencia entre las sobrevivencias de ambas cepas, siendo la sobrevivencia de la cepa rec(-) menor ($N/N_0 = 0,9444$) respecto de la cepa rec(+)($N/N_0 = 1,0026$), excepto en la réplica A, donde el valor de eficiencia de placa promedio en la dosis de 0,1 mL es distinto estadísticamente de la réplica B y C en esta misma dosis. Así también dentro de la misma réplica (A) el valor de eficiencia de placa promedio a la dosis de 0,1 mL es diferente de las dosis de 0,3 y 0,5 mL (Bonferroni). Esto último, puede ser atribuido a la elevada desviación estándar en esta primera dosis respecto de las otras, debido a un error experimental al ensayar dicha dosis (Figura 4-5-A). De hecho, las DE sufren cambios entre las réplicas, aunque no significativos estadísticamente, siendo los valores de las desviaciones estándares de las Figuras 4-5-B y C mayores en comparación con los valores de las DE de la Figura 4-5-A. De lo contrario, podríamos inferir que las variaciones en la sobrevivencia de la cepa rec(+) de la réplica A se debe a que las bacterias utilizarían los compuestos presentes en el influente como sustrato para sus procesos metabólicos, y no a las variaciones de las desviaciones estándares de la sobrevivencia de la cepa rec(+) entre las dosis ensayadas (Figura 4-5-A). La sobrevivencia de la cepa rec(-) disminuye a medida que aumenta la cantidad de influente ensayado (Figura 4-5-A), lo que significa un efecto genotóxico en las dosis ensayadas. En resumen, el Influyente 1 (Figura 4-5) muestra efecto genotóxico en las dosis ensayadas, no existiendo diferencias significativas entre los valores promedios de eficiencia de placas de cada una de las réplicas (A, B y C), a pesar de que las Figuras 4-5-B y C presentan mayores desviaciones estándares en comparación con la Figura 4-5-A. No obstante, la eficiencia de placa promedio varía significativamente con la dosis ensayada por réplica realizada (interacción réplica-dosis; $p < 0,05$).

En la Figura 4-6 se presentan los resultados obtenidos al ensayar un efluente sin previo tratamiento biológico con dos réplicas D y E (Influente 2).

D)



E)

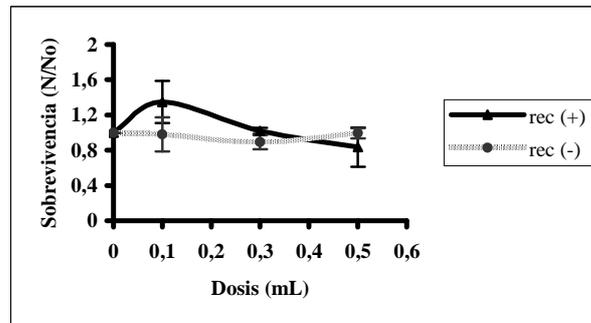


Figura 4-6. Fracción de sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* 1652 rec(+) y *B. subtilis* 1791 rec(-) en presencia de diferentes dosis de Influyente 2 con dos réplicas (D y E).

Podemos observar que hay variaciones en las desviaciones estándares de las sobrevivencias de las cepas en cada una de las réplicas realizadas por dosis evaluada, así por ejemplo, la desviación estándar de la sobrevivencia de la cepa rec(-) a los 0,3 mL es mayor en la réplica D, mientras que a los 0,5 mL la desviación estándar de la sobrevivencia de ésta misma cepa decrece en la réplica E, no así la desviación estándar de la sobrevivencia de la cepa rec(+), pues se ve aumentada en ésta dosis con respecto a la Figura 4-6-D.

Probablemente la variación de las desviaciones estándares de las sobrevivencias de las cepas entre las dosis por réplicas efectuadas, sea la razón por la cual no es posible encontrar un efecto genotóxico constante en cada réplica en el rango de dosis evaluado. Sin embargo, es posible apreciar la presencia de genotoxicidad en el Influyente 2 (Figura 4-6), simplemente por la existencia de diferencia entre las sobrevivencias de la cepa rec(+) en relación a la cepa rec(-) no encontrándose diferencias significativas de los valores promedios de eficiencia de placas entre las réplicas ni en su interacción con las dosis ensayadas. Por otra parte es posible señalar la existencia de un efecto citotóxico, demostrado por la disminución de la sobrevivencia de la cepa rec(+)(Figura 4-6-E).

Ambos efluentes de celulosa Kraft sin previo tratamiento biológico, Influentes 1 y 2, muestran efecto genotóxico (Figura 4-5 y Figura 4-6), encontrándose diferencias significativas en sus promedios de eficiencias de placas entre las réplicas de ambos Influentes por dosis ensayada ($p < 0,05$). Por tanto, la genotoxicidad se hace evidente en cada una de las réplicas de los influentes, por la notoria diferencia existente entre la sobrevivencia de la cepa rec(+) respecto de la cepa rec(-) en el rango de dosis empleada, siendo la fracción de sobrevivencia de la cepa rec(+) mayor respecto de la cepa rec(-) en cada una de las réplicas de los Influentes ensayados (1 y 2).

Las Figuras 4-7 y 4-8 muestran los resultados de Influyente 2 sometido a tratamiento anaeróbico y aeróbico, respectivamente (efluentes secundarios).

IV.1.1.4. Efluente secundario anaerobio

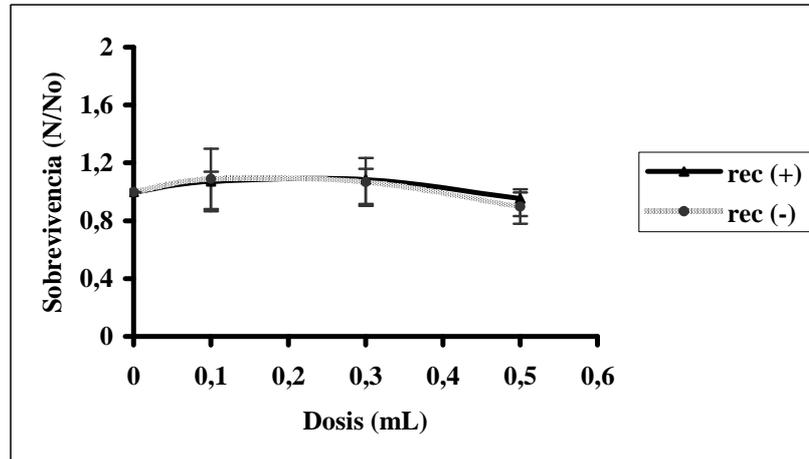


Figura 4-7. Fracción de sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* 1652 rec(+) y *B. subtilis* 1791 rec(-) en presencia de diferentes dosis de efluente tratado anaeróbicamente.

IV.1.1.5. Efluente secundario aerobio

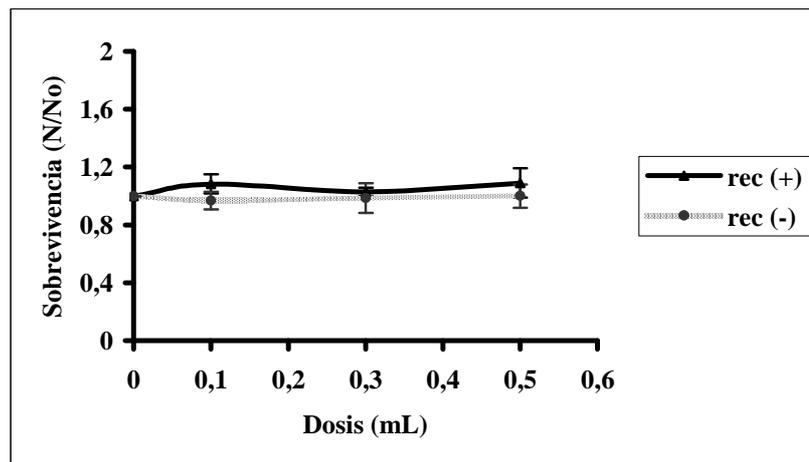


Figura 4-8. Fracción de sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* 1652 rec(+) y *B. subtilis* 1791 rec(-) en presencia de diferentes dosis de efluente tratado aeróbicamente.

La muestra tratada anaeróbicamente presenta un valor promedio de eficiencia de placa ($A = 0,9844$) mayor que la obtenida del tratamiento aeróbico ($A = 0,9256$), indicando que éste último tratamiento presentaría mayor efecto genotóxico, en tanto que para el tratamiento anaeróbico casi no hay efecto. No obstante, estos valores promedios de A entre ambos tratamientos, no son estadísticamente diferentes.

Los tratamientos secundarios, anaerobio y aeróbico, reducirían la genotoxicidad de los efluentes sin previo tratamiento biológico, pues los A promedio de las réplicas A, E (Figura 4-5 y Figura 4-6) y los tratamientos biológicos (Figura 4-7 y Figura 4-8) varían significativamente en las dosis por muestra analizada (interacción dosis-muestra; $p < 0,05$). Tal diferencia no se pudo apreciar con los Figuras 4-5-B, 4-5-C, 4-6-D y los tratamientos (Figura 4-7 y Figura 4-8), debido probablemente a la mayor desviación estándar que poseen las réplicas de la Figura 4-5-B y 4-5-C, con relación, a la Figura 4-5-A, y a la variabilidad de las desviaciones estándares en la Figura 4-6-D, respecto de la Figura 4-6-E, entre las cepas.

Por lo tanto, la genotoxicidad de los efluentes con y sin tratamiento es significativamente diferente ($p < 0,05$). Los tratamientos biológicos (aeróbico y anaeróbico), reducen los efectos genotóxicos de los efluentes sin mostrar diferencias estadísticas entre uno y otro tratamiento.

Debido a la poca diferencia existente entre los A promedio de los fitosteroles versus los efluentes e influentes es posible inferir que la presencia de estos compuestos en los efluentes de la industria celulósica potenciaría el efecto genotóxico de dichos efluentes, el cual es reducido por los tratamientos biológicos.

IV.1.2. Test de Ames

En la Tabla IV.1 y Tabla IV.2 se muestran los resultados de mutagenicidad al ensayar los fitosteroles, β -sitosterol y estigmasterol, respectivamente con *S. typhimurium* / Test de Ames.

IV.1.2.1. β -sitosterol

Tabla IV.1. Detección del efecto mutagénico de β -sitosterol utilizando las cepas de *S. typhimurim* TA-100 y TA-98 en ausencia de la fracción S9.

Concentración (mgL ⁻¹)	Revertantes por placas \pm DE		RM	
	TA-100	TA-98	TA-100	TA-98
1	15,5 \pm 4,05	29,5 \pm 2,12	0,97	1,05
2	10,5 \pm 2,12	31,0 \pm 0	0,66	1,11
4	8,5 \pm 2,12	18,5 \pm 2,12	0,53	0,66
8	11,0 \pm 2,83	16,0 \pm 5,66	0,69	0,57
16	13,0 \pm 5,66	27,5 \pm 0,71	0,81	0,98
32	12,5 \pm 2,12	28,0 \pm 2,83	0,78	1,0
0,1 mL de agua destilada estéril	16,0 \pm 5,66	28,0 \pm 2,83		
0,1 mL de 2-Antramina	7,5 \pm 2,12	26,0 \pm 2,83		

IV.1.2.2. Estigmasterol

Tabla IV.2. Detección del efecto mutagénico de estigmasterol utilizando las cepas de *S. typhimurim* TA-100 y TA-98 en ausencia de la mezcla S9.

Concentración (mgL ⁻¹)	Revertantes por placas \pm DE		RM	
	TA-100	TA-98	TA-100	TA-98
1	07,5 \pm 2,12	20,0 \pm 4,24	0,47	0,71
2	12,5 \pm 4,95	26,5 \pm 13,4	0,78	0,95
4	10,5 \pm 2,12	22,0 \pm 11,3	0,66	0,79
8	13,0 \pm 1,41	18,5 \pm 2,12	0,81	0,66
16	18,5 \pm 7,78	29,0 \pm 8,49	1,16	1,04
32	10,5 \pm 3,54	21,0 \pm 11,3	0,66	0,75
0,1 mL de agua destilada estéril	16,0 \pm 5,66	28,0 \pm 2,83		
0,1 mL de 2-Antramina	7,5 \pm 2,12	26,0 \pm 2,83		

El β -sitosterol y estigmasterol no presentan efecto mutagénico evidente, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. Es decir, la razón de mutagenicidad (RM) promedio de las cepas no difiere significativamente entre los fitosteroles analizados. Sin embargo, el estigmasterol presenta una razón de mutagenicidad promedio mayor que el β -sitosterol.

IV.1.2.3. Estigmasterol con activación metabólica

Tabla IV.3. Detección del efecto mutagénico de estigmasterol utilizando las cepas de *S. typhimurim* TA-100 y TA-98 en presencia de la fracción S9.

Concentración (mgL ⁻¹)	Revertantes por placas ± DE		RM	
	TA-100	TA-98	TA-100	TA-98
1	321 ± 30,4	16,5 ± 4,95	1,44	0,63
2	288 ± 14,8	21,5 ± 14,8	1,29	0,83
4	295 ± 20,5	15,5 ± 4,95	1,32	0,60
8	306 ± 39,6	23,5 ± 6,36	1,37	0,90
16	295 ± 137	27 ± 5,66	1,32	1,04
32	274 ± 120	21,5 ± 2,12	1,23	0,83
0,1 mL de agua destilada estéril	373 ± 84,1	54 ± 14,8		
0,1 mL de 2-Antramina	223 ± 14,1	26 ± 12,7		

La RM varía con la cepa por estigmasterol con y sin S9 ($p < 0,05$). Es decir, para ambos, estigmasterol con y sin S9, la razón de mutagenicidad de la cepa TA-100 es mayor respecto de la RM de la cepa TA-98. En otras palabras, al ensayar el estigmasterol en presencia de S9 se tiene que la razón de mutagenicidad de la cepa TA-100 incrementa significativamente ($p < 0,05$) con relación a la RM de esta misma cepa para el estigmasterol ensayado en ausencia de activación metabólica. Esto sugiere la presencia de un efecto, lo que significaría que el estigmasterol por acción de las enzimas hepáticas se activaría, por tanto, actuaría como un promutágeno, siendo necesario realizar el ensayo a mayores concentraciones para confirmar su comportamiento promutagénico.

IV.1.2.4. Influentes primarios

Las Tablas IV.4 y IV.5 muestran los resultados logrados después de ensayar la muestra de Influyente 1 y 2, respectivamente con la cepa *S. typhimurim*.

Tabla IV.4. Detección del efecto mutagénico del Influyente 1 utilizando las cepas de *S. typhimurim* TA-100 y TA-98 en ausencia de la fracción S9.

Dosis (mL)	Revertantes por placas \pm DE		RM	
	TA-100	TA-98	TA-100	TA-98
0,1	120,5 \pm 0,71	23,5 \pm 2,12	0,84	1,62
0,3	91,5 \pm 10,6	16,5 \pm 7,78	0,64	1,13
0,5	131 \pm 16,97	16,0 \pm 2,83	0,91	1,10
0,1 de agua destilada estéril	144,0 \pm 39,60	14,5 \pm 0,71		
0,1 de 2-Antramina	189,0 \pm 29,70	29,0 \pm 11,31		

Se observa una disminución en el número de revertantes, en comparación con el control, lo que podría significar un efecto citotóxico sobre las bacterias ensayadas. Por lo tanto, se debe realizar el ensayo con menores dosis de la muestra.

Tabla IV.5. Detección del efecto mutagénico del Influyente 2 utilizando las cepas de *S. typhimurim* TA-100 y TA-98 en ausencia de la fracción S9.

Dosis (mL)	Revertantes por placas \pm DE		RM	
	TA-100	TA-98	TA-100	TA-98
0,1	129,5 \pm 9,19	20,5 \pm 2,12	0,90	1,41
0,3	142,0 \pm 4,24	19,5 \pm 7,78	0,99	1,34
0,5	143,0 \pm 1,41	20,0 \pm 2,83	0,99	1,38
0,1 de agua destilada estéril	144,0 \pm 39,60	14,5 \pm 0,71		
0,1 de 2-Antramina	189,0 \pm 29,70	29,0 \pm 11,31		

Los Influentes 1 y 2 poseen razón de mutagenicidad significativamente diferentes entre las cepas TA-100 y TA-98 ($p < 0,05$). Siendo la razón de mutagenicidad de la cepa TA-98 mayor que la razón de mutagenicidad de la cepa TA-100 (Bonferroni). Por tanto, se sugiere la presencia de compuestos que alterarían el marco de lectura en estos influentes. Para confirmar la presencia de estos compuestos es necesario realizar estos ensayos aumentando la cantidad o dosis de las muestras.

IV.1.2.5. Efluente secundario anaerobio

Las Tablas IV.6 y IV.7 presentan los resultados de test de Ames con *S. typhimurim* al ensayar influente sometido a tratamiento anaerobio y aerobio, respectivamente (efluentes secundarios).

Tabla IV.6. Detección del efecto mutagénico del Influyente 2 con tratamiento anaeróbico utilizando las cepas de *S. typhimurim* TA-100 y TA-98 en ausencia de la fracción S9.

Dosis (mL)	Revertantes por placas \pm DE		RM	
	TA-100	TA-98	TA-100	TA-98
0,1	210,0 \pm 5,66	17,5 \pm 6,36	1,0	0,76
0,3	218,0 \pm 0	18,5 \pm 6,36	1,04	0,80
0,5	196,5 \pm 4,95	20,5 \pm 10,61	0,94	0,89
0,1 de agua destilada estéril	209,5 \pm 9,19	23,0 \pm 7,07		
0,1 de 2-Antramina	247,5 \pm 37,48	32,5 \pm 9,19		

IV.1.2.6. Efluente secundario aerobio

Tabla IV.7. Detección del efecto mutagénico del Influyente 2 con tratamiento aeróbico utilizando las cepas de *S. typhimurim* TA-100 y TA-98 en ausencia de la fracción S9.

Dosis (mL)	Revertantes por placas \pm DE		RM	
	TA-100	TA-98	TA-100	TA-98
0,1	92,0 \pm 15,56	18,0 \pm 1,41	0,64	1,24
0,3	107,0 \pm 18,38	16,0 \pm 4,24	0,74	1,10
0,5	139,0 \pm 14,85	17,5 \pm 1,21	0,97	1,21
0,1 de agua destilada estéril	144,0 \pm 39,60	14,5 \pm 0,71		
0,1 de 2-Antramina	189,0 \pm 29,70	29,0 \pm 11,31		

La razón de mutagenicidad varía significativamente con la cepa y los efluentes usados ($p < 0,05$). Así, La razón de mutagenicidad promedio para el efluente tratado anaerobicamente es menor que la razón de mutagenicidad del efluente tratado vía aeróbica, siendo, en consecuencia, más efectivo el tratamiento anaeróbico en la remoción o eliminación de compuestos genotóxicos de las muestras de influentes. Así también, la razón de mutagenicidad de la cepa TA-98 del efluente tratado aeróbicamente es mayor que para el efluente obtenido del tratamiento anaeróbico. En tanto que, la razón de mutagenicidad de la cepa TA-100 del efluente anaerobio es mayor que del efluente aeróbico.

Para las muestras de los efluentes con y sin tratamiento biológico, la razón de mutagenicidad de la cepa TA-98 es significativamente mayor que la razón de mutagenicidad de la cepa TA-100 ($p < 0,05$; Bonferroni).

La razón de mutagenicidad de las cepas es diferente significativamente entre las muestras de efluentes con y sin tratamiento ($p < 0,05$). Siendo la razón de mutagenicidad promedio de los influentes mayor que para los efluentes (Bonferroni).

La razón de mutagenicidad varía significativamente con las cepas, TA-100 y TA-98, por muestras analizadas ($p < 0,05$). No encontrándose diferencias significativas en la razón de mutagenicidad promedio de la cepa TA-100 entre las muestras de efluente con y sin tratamiento biológico. En tanto que, la razón de mutagenicidad promedio de la cepa TA-98 de las muestras sin y con tratamiento poseen diferencias significativas. Siendo, la muestra de efluente sin tratamiento biológico (influyente) la que posee una razón de mutagenicidad promedio, de la cepa TA-98, mayor que las muestras de los efluentes ya tratados (Bonferroni).

La razón de mutagenicidad varía entre las muestras de influentes, efluentes y fitosteroles ($p < 0,05$). Ambos fitosteroles estudiados poseen razón de mutagenicidad menor que las muestras de los efluentes con y sin tratamiento, siguiendo la razón de mutagenicidad de influentes, efluentes y fitosteroles un orden decreciente, respectivamente. Entre los fitosteroles, β -sitosterol y estigmasterol no hubo diferencias. Por otra parte se tiene que la RM varía entre las cepas por muestras ($p < 0,05$), así la razón de mutagenicidad de la cepa TA-98 es mayor para influentes que para los efluentes, mientras que para la cepa TA-100 la RM es mayor para los efluentes que influentes.

Aún cuando se han encontrado diferencias significativas en la razón de mutagenicidad entre las muestras de influentes y efluentes; influentes, efluentes y fitosteroles, no es posible afirmar que existe mutagenicidad, ya sea de sustitución de pares de base o desplazamiento del marco de lectura, puesto que no hay ningún valor de razón de mutagenicidad superior o igual a dos. Pero los resultados sugieren actividad promutagénica para el estigmasterol y la posible presencia, en los efluentes provenientes de la industria de celulosa Kraft, de compuestos que causarían mutación por alteración del cuadro de lectura. En consecuencia, a mayores concentraciones o dosis de las muestras se podría manifestar la mutagenicidad.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

CAPÍTULO V

V.1. DISCUSIÓN

El β -sitosterol presenta una leve disminución de la sobrevivencia de la cepa rec(-) lo que confirma su incapacidad de reparación genética. Mientras que, la cepa rec(+) tiende a incrementar su sobrevivencia en presencia de este compuesto, lo cual demuestra que este esteroide vegetal podría estar siendo metabolizado por dicha cepa. Por su parte, el estigmasterol muestra genotoxicidad en el rango de concentración estudiada, debido a la relativa diferencia de sobrevivencia entre una cepa y otra, no obstante los valores de eficiencia de placa varían dentro del rango de concentración, debido a que la fracción de sobrevivencia de la cepa rec(+) sufre variaciones en tanto que la cepa rec(-) se mantiene prácticamente constante, resultando esto en un progresivo aumento de los valores de eficiencia de placa hasta los 16 mgL^{-1} y un descenso de esta luego de dicha concentración. Por tanto, el efecto genotóxico mostrado se ve condicionado por las variaciones que presenta la sobrevivencia de la cepa rec(+) y no al decrecimiento paulatino de la sobrevivencia de la cepa rec(-) ante un agente dañino, esto indica entonces que probablemente este fitosterol cause daño sobre el ADN celular, pero ambas cepas serían capaces de reparar dicho daño, sólo que la cepa rec(+) es más eficiente en reparar en comparación a la cepa rec(-) cuyo mecanismo de reparación se encuentra alterado.

Aún cuando los valores de eficiencia de placa entre las concentraciones usadas por fitosterol analizado no son estadísticamente distintos, el valor promedio de eficiencia de placa para el β -sitosterol es significativamente mayor que para el estigmasterol, indicando que este último tendría un efecto genotóxico mayor, sin embargo ya hemos señalado que la disminución de la eficiencia de placa del estigmasterol no se debe principalmente al decaimiento de la sobrevivencia de la cepa rec(-), sino a las variaciones de la razón N/No de la cepa rec(+). No obstante, la diferencia entre las sobrevivencias de ambas cepas indica la presencia de efecto genotóxico.

Se sabe que las maderas blandas son ricas en ácidos resínicos en tanto que en las maderas duras abundan los fitosteroles, pero cuando se utilizan ambos tipos de madera, la concentración de los fitosteroles descargados en los efluentes se acentúa aún más (Tabla II.5), lo que no implica la ausencia de estos compuestos en los efluentes provenientes de procesos en los que se utiliza sólo madera blanda como es el *Pinus radiata*. Estas concentraciones pueden ser variables y no estar sujetas únicamente al tipo de madera sino también a las condiciones geográficas que la afectan (ecotipo geográfico). Además, la madera blanda de *Pinus radiata* es de crecimiento rápido y en consecuencia posee mayor cantidad de extractivos que las maderas de crecimiento lento, por lo tanto el procesamiento de la madera eliminaría cantidades detectables de esteroides provenientes de la fracción extractiva de la madera. De hecho, en las dos primeras etapas de lavado de la pulpa se liberan significativas cantidades de fitosteroles, los que son reducidos a través del proceso productivo. Sin embargo, cuando la remoción de esteroides totales es considerable, estos están aún presentes en el efluente final ($3,4 \text{ mgL}^{-1}$) (Tabla II.5), por lo tanto, la genotoxicidad de estos efluentes podría ser atribuida, en cierta medida, a los fitosteroles como el β -sitosterol y estigmasterol, puesto que ambos presentan efecto genotóxico en el rango de $1\text{-}32 \text{ mgL}^{-1}$, según el ensayo "rec" de *B. subtilis* realizado. Siendo el β -sitosterol, el esteroide predominante encontrado en los extractivos de la madera, en las aguas de lavado y consecuentemente en los efluentes, no obstante, este esteroide no muestra un claro efecto genotóxico en las primeras concentraciones ensayadas ($1\text{-}16 \text{ mgL}^{-1}$), por lo que este podría causar efectos dañinos sobre el ADN, cuando los organismos son expuestos a los efluentes en un tiempo prolongado permitiendo así su bioacumulación.

Si bien es cierto, las cantidades de β -sitosterol y estigmasterol encontradas en los efluentes de la industria de celulosa Kraft son pequeñas (Tabla II.6), cabe señalar que estos pueden tener efecto genotóxico adverso sobre los organismos acuáticos, puesto que tales compuestos, como ya se mencionó, podrían bioacumularse y/o biomagnificarse, siendo posible la presencia de ellos a mayores concentraciones en dichos organismos, causando tal efecto.

En este mismo contexto, se sabe que los fitosteroles son liposolubles, por lo que se solubilizan fácilmente en las membranas biológicas permitiendo el ingreso de estos a los organismos por vía dérmica pudiendo ser de este modo, bioacumulados y/o biomagnificados.

En las tres réplicas de Influyente 1 existe presencia de genotoxicidad debido a la diferencia manifestada de las sobrevivencias entre las cepas, no encontrándose diferencias significativas entre los promedios de eficiencia placa por réplicas, sin embargo las diferencias fueron dadas por las dosis ya que para la primera réplica a la dosis de 0,1 mL la eficiencia de placa promedio es significativamente mayor en comparación a las demás réplicas a esta misma dosis y dentro de la misma réplica. Esta diferencia se atribuiría a un error experimental ocurrido, de ahí su mayor desviación estándar, y por tal razón se repite el ensayo resultando entonces la réplica B, donde se ve claramente una disminución de los valores de eficiencia de placa a medida que aumenta la dosis de la muestra ensayada, sugiriendo que la fracción de sobrevivencia de ambas cepas decrecen, siendo la cepa rec(+) más eficiente en reparar el daño causado sobre su ADN puesto que su mecanismo de reparación no se encuentra mutado sino en condiciones normales, no así la cepa rec(-). Debido a las mayores desviaciones estándares encontrada en esta réplica se realizó una tercera réplica, la cual confirma la presencia de efecto genotóxico para este influente (Influente 1) y que la variabilidad en las desviaciones estándares se puede deber no tan sólo a errores experimentales sino también a errores aleatorios.

El Influyente 2 muestra genotoxicidad en ambas réplicas no existiendo ningún tipo de diferencia estadística entre ellas. Sin embargo, por el aumento de la sobrevivencia de la cepa rec(-) en la dosis de 0,3 mL se efectuó una segunda réplica mejorándose tal irregularidad, lo cual queda demostrado por la menor desviación estándar lograda, de la cepa mutada, en esta última réplica. No obstante, es posible apreciar también un efecto citotóxico, pues la sobrevivencia de la cepa madre tiende a disminuir progresivamente, en tanto que, la cepa rec(-) se mantiene relativamente constante, esto probablemente ocurra debido a un daño sobre la membrana de la célula madre causando consecuentemente la muerte de ella y la declinación en su sobrevivencia respecto de su cepa mutada.

Los tratamientos biológicos reducen la genotoxicidad presente en los efluentes de la industria de celulosa Kraft, puesto que la diferencia entre las sobrevivencias de ambas cepas de los efluentes biológicamente tratados es menor comparada con los influentes. Esto indica que la genotoxicidad de los efluentes luego de ser tratados es reducida o prácticamente eliminada, pues en el tratamiento anaeróbico casi no hay efecto debido a la muy poca diferencia existente entre las sobrevivencias de las cepas, mientras que en el efluente tratado aeróbicamente la diferencia entre sus sobrevivencias es un poco mayor, pero menor respecto de los influentes. No obstante, valores de eficiencia de placa promedio son menores para los efluentes, aunque no significativamente, en comparación con los influentes lo que puede ser atribuido a las irregularidades que presenta la fracción de sobrevivencia de la cepa rec(+) en tanto que la cepa rec(-) se mantiene prácticamente constante en todas las muestras de efluentes e influentes. Sólo para el caso del tratamiento anaeróbico el promedio de A es mayor que el influente (Figura 4-4-E), aunque no significativamente, señalando con esto que el tratamiento anaerobio sería más eficiente en reducir la genotoxicidad de los efluentes de la industria de celulosa Kraft que el tratamiento aeróbico ya que el efluente obtenido de este tratamiento posee un A promedio menor que dicho influente, y que el efluente proveniente del tratamiento anaeróbico. Es conocido que el tratamiento biológico aerobio presenta ventajas sobre el tratamiento anaerobio tales como metabolismo celular rápido por tanto una mayor reducción de la materia orgánica, mayor estabilidad del proceso y facilidad de su control. En contraste, el metabolismo anaerobio es más lento por lo que requiere mayor volumen y las sustancias tóxicas deben permanecer más tiempo en el reactor (mayor tiempo de residencia), además implica mayor dificultad de operación dado que una falla en el proceso significa consumo de tiempo para que los microorganismos colonicen el reactor y ponerlo nuevamente en funcionamiento. Sin embargo, el tratamiento anaerobio genera una baja producción de fangos, produce metano como subproducto utilizable y no necesita energía para su funcionamiento. La mayoría de las plantas de tratamiento biológicos a nivel industrial son de tipo aerobias, pues el principal objetivo es lograr una mayor reducción de la DBO_5 con facilidad de operación.

En este contexto, según los resultados obtenidos, estos no son suficientes para afirmar la eficiencia de uno u otro tratamiento, pues cabe la posibilidad que el efluente aeróbico posea mayor genotoxicidad debido a la transformación de la materia orgánica en otros compuestos que causen daño sobre el ADN celular (Takigami *et al.*, 2002), que contenga una mayor DBO₅ debido a una mayor cantidad de materia celular, y por otra parte la posible eliminación de la genotoxicidad por parte del tratamiento anaeróbico se deba a que la tasa de destrucción de los orgánicos peligrosos se ha maximizado mediante la inmovilización de la masa sobre un soporte. Además, no se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos de modo que se pueda asegurar la eficiencia de eliminación o aumento de la genotoxicidad por parte del tratamiento anaerobio y aerobio respectivamente (Claxton *et al.*, 1998). Pero sí se observa eliminación de la genotoxicidad de los efluentes tratados biológicamente, lo que estaría de acuerdo con la reducción de los fitosteroles contenidos en ellos luego de ser tratados.

De los fitosteroles, analizados con el test de Ames, los valores de razón de mutagenicidad sugieren que el estigmasterol con y sin S9 induciría mutación por sustitución de base CG, mientras que el β -sitosterol causaría mutación por desplazamiento en el marco de lectura. Además la marcada diferencia en la RM de la cepa TA-100 para el estigmasterol ensayado con S9 respecto de la RM del estigmasterol sin S9 indicaría que el sistema de activación metabólico estaría biotransformando los compuestos en metabolitos más reactivos hacia el ADN, los que serían responsables de la mutación por desplazamiento del marco de lectura. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los valores promedio de la razón de mutagenicidad de cada una de las cepas por compuesto estudiado, ni existe, al menos, un valor superior a dos, de modo que no se puede afirmar que estos fitosteroles posean una respuesta positiva, es decir, sean mutagénicos en presencia o ausencia de fracción S9, según corresponda. No obstante, el estigmasterol muestra actividad promutagénica, puesto que ensayado con fracción metabólica se activaría. Por lo que se hace necesario profundizar estos estudios variando las concentraciones, utilizando fracción S9 y otros ensayos, y realizar bioensayos cuyas respuestas sean dadas en función del tiempo.

Las muestras de influentes provenientes de la industria de celulosa Kraft nos indican que luego de ser tratadas biológicamente estas disminuyen su razón de mutagenicidad, sin embargo, ambos, influentes y efluentes, inducirían mutaciones por desplazamiento del cuadro de lectura, esto se explica porque los efluentes son mezclas complejas donde uno de los contaminantes son los fitosteroles, entre otros de los miles de compuestos genotóxicos existentes en estos efluentes, tales como ácidos resínicos, compuestos clorados, etc. (Houk, 1992; Maria *et al.*, 2004; Pacheco & Santos, 2002; Maria *et al.*, 2003; Pérez-Alzola & Santos, 1997). Pero esta inducción podría ser significativamente menor luego de que el Influyente (2) es sometido a tratamiento secundario. En el efluente obtenido luego de ser sometido a tratamiento aeróbico se sugiere la presencia de compuestos que causarían mutación por desplazamiento del marco de lectura, tales compuestos no serían eliminados eficientemente por este tratamiento desde la muestra de Influyente (2), mientras que en el efluente resultante del tratamiento anaeróbico estarían presentes compuestos que causarían mutación por sustitución de bases (GC), esto indica que luego del tratamiento anaeróbico compuestos orgánicos biodegradables presentes en el Influyente (2) serían biotransformados en compuestos capaces de causar mutación por sustitución de bases. Debido a que la razón de mutagenicidad promedio de la muestra sometida a tratamiento anaeróbico es menor, se cree que este tratamiento biológico es más efectivo que el tratamiento aeróbico en la eliminación de la genotoxicidad.

Los resultados obtenidos con el test de Ames no muestran, al menos un valor superior a 2, y no existe un claro efecto dosis-respuesta, por tanto, no es posible afirmar con certeza de que los fitosteroles, influentes y efluentes sean mutagénicos, pero sí muestran o sugieren cierto efecto mutagénico, haciéndose necesario usar una batería de bioensayos para determinar la presencia o ausencia efectiva de la mutagenicidad (genotoxicidad), ya que debido a las diversas propiedades y respuestas bioquímicas de los efluentes de la industria de celulosa Kraft, la evaluación de estos efluentes podría no solamente estar limitada a uno o dos bioensayos o sólo a análisis químico, sino a una batería de métodos, puesto que la ausencia de un efecto específico no siempre refleja la ausencia de contaminación con efecto genotóxico/mutagénico.

Siendo necesario medir varias respuestas biológicas para evaluar los efectos antropogénicos sobre los ecosistemas acuáticos y particularmente de los efluentes, logrando así una mayor comprensión de los efectos biológicos de los efluentes.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el test de Ames y ensayo “rec” de *B. subtilis*, sugieren que una respuesta tiempo dependiente es necesaria y útil de ser evaluada, considerando que los compuestos contaminantes como los fitosteroles pueden ser bioacumulados y biomagnificados en el tiempo.

Por otro lado, compuestos con actividad hormonal (estrógenos), derivados de los fitosteroles, muestran respuestas genotóxicas, siendo entonces los fitosteroles precursores de compuestos con actividad genotóxica. (Joosten *et al.* , 2004; Larsson *et al.*, 2002; Jenkins *et al.*, 2001)

En el test de Ames para un screening general se sugiere realizar una secuencia metodológica (tier approach) usando las cepas TA-98 y TA-100 con y sin activación metabólica. En este caso luego de obtenerse una respuesta negativa con las cepas ya mencionadas lo recomendable es usar otras cepas tales como TA1535 y TA97 con y sin activación metabólica, confirmando el experimento sólo si se obtiene una respuesta positiva usando las condiciones y cepas en la cual se observe la respuesta mutagénica. Si con la cepa TA97 se obtiene respuestas leve o errada, la cepa TA1537 puede ser usada en una tentativa por clarificar los resultados (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Los resultados obtenidos con el test de Ames estarían en acuerdo con Wolfreys *et al.* (2002) que encontró que los fitosteroles y ésteres de fitosteroles no muestran ninguna evidencia de actividad mutagénica en ninguno de los ensayos, ensayo de mutación bacteriana y ensayo de aberración cromosomal “in vitro”. Por otro lado, el ensayo “rec” de *B. subtilis* señala que los fitosteroles presentan actividad genotóxica, junto con los influentes de la industria de celulosa Kraft, la cual disminuye luego de tratar los influentes biológicamente. Estando de acuerdo esto con informes que dicen que los fitosteroles o sus derivados como hormonas esteroidales presentan genotoxicidad, así también los efluentes de la industria de celulosa Kraft (Kinae, *et al.* 1981; Kotelevtsev, *et al.*, 2000; Rao, *et al.*, 1995), los cuales pueden

incluir sustancias peligrosas que causan efectos a largo plazo, siendo por ejemplo, genotóxicas, hormonalmente activos o bioacumulativas, dichas sustancias aparecen a bajas concentraciones o son de carácter químico desconocido, lo cual hace que su análisis químico requiera tiempo y métodos de alta tecnología. Por lo tanto, el uso de bioensayos en el monitoreo de los efluentes tiene una gran utilidad (Piia Pessala *et al.* , 2004).

En resumen, se puede decir que ambos ensayos son útiles para determinar efecto a nivel del ADN, sin embargo, dado las diversas propiedades de los efluentes de la industria de celulosa Kraft, los resultados son variables, siendo conveniente usar una rápida batería de bioensayos a pequeña escala para la evaluación de la genotoxicidad y los efectos hormonales, complementado con bioensayos de toxicidad aguda y crónica, con el propósito de establecer una relación entre toxicidad y genotoxicidad, y esclarecer aún más los resultados (Rao *et al.*, 1995; Maria *et al.*, 2004; Maria *et al.*, 2003). Además la respuesta negativa en el test de Ames no necesariamente indica ausencia de genotoxicidad pues sólo se evalúa un cambio genético en el operón de histidina, mientras que el ensayo “rec” de *B. subtilis*, evalúa el daño en el ADN total, por lo tanto el daño encontrado en este ensayo podría deberse a otro mecanismo o propiedad del ADN y no sólo a un mecanismo de mutación expresado por la reversión de la mutación en el operón de histidina. Un estudio de genotoxicidad y/o mutagenicidad no puede evaluarse con un par de ensayos, se sugiere una batería de ensayos donde se incluyan otros organismos, además de bacterias, tales como hongos, células animales, entre otros (Gollapudi & Krishna, 2000).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIÓN

CAPÍTULO VI

VI.1. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos, de acuerdo al ensayo “rec” de *Bacillus subtilis*, indican que los fitosteroles, estigmasterol y β -sitosterol, muestran efecto genotóxico. Estos no son mutagénicos según el test de Ames.
2. El efecto genotóxico de los efluentes ensayados estaría dado, en parte, por la presencia de los fitosteroles contenidos en ellos.
3. Los tratamientos biológicos, aerobio y anaerobio disminuyen el efecto genotóxico de los efluentes provenientes de la industria de celulosa Kraft.
4. Considerando que los resultados presentados son preliminares, se sugiere realizar otros ensayos para la confirmación de los mismos.
5. Es importante destacar que no existe información en la literatura acerca de las propiedades genotóxicas de los fitosteroles como constituyentes de los efluentes de la industria de celulosa Kraft, por lo tanto los resultados obtenidos serían un aporte en este contexto.

CAPÍTULO VII
BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO VII

VII.1. BIBLIOGRAFÍA

- Ames B., J. McCann, E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31: 347-364.
- Claxton L., V. Houk, T. Hughes (1998) Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation research*, 410: 237-243.
- Cody R., S. Bortone (1997) Masculinization of mosquitofish as an indicator of exposure to Kraft mill effluent. *Bulletin Environmental Contamination & Toxicology*, 58: 429-436.
- Cook D., L. La Fleur, A. Parrish, J. Jones, D. Hoy (1997) Characterization of plant sterols from 22 US pulp and paper mills. *Water Science Technology*, 35: 297-303.
- del Río J., J. Romero, A. Gutiérrez (2000) Analysis of deposits produced in Kraft pulp mills using a totally chlorine free bleaching sequence. *Journal of Chromatography A*, 874: 235-245.
- del Río J., A. Gutierrez, F. Gonzales-Vila (1999) Analisis of impurities occurring in a totally chlorine free-bleached Kraft pulp. *Journal of Chromatography A*, 830: 227-232.
- del Rio J., A. Gutierrez, F. Gonzalez-Vila, F. Martin, J. Romero (1998) Characterization of organic deposits produced in the Kraft pulping of *Eucaliptus Globulus* wood. *Journal of Chromatography A*, 82: 457-465.
- Dorado J., T. van Beek, F. Claassen, R. Sierra-Alvarez (2001) Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus sylvestris* by the white-rot fungi *Bjerkandera sp.* And *Trametes versicolor*. *Wood Science and Technology*, 35: 117-125.
- Ericson G. & A. Larsson (2000) DNA Adducts in Perch (*Perca Fluviatilis*) Living in coastal water polluted with bleached pulp mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 167-173.

- Espinosa C. (2000) Evaluación de los impactos de la producción de celulosa. Publicaciones Terram, 4: 1-11.
- Field J., R. Sierra-Alvarez, G. Lettinga, J. Rintala (1992). Environmental biotechnology for the treatment of forest industry pollutants profiles on biotechnology, IV Congreso Nacional y I Hispano-Luso de Biotecnología (BIOTEC): 357-395.
- Förlin L., T. Andersson, L. Balk, A. Larsson (1995) Biochemical and physiological effects in fish exposed to bleached Kraft mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30: 164-170.
- Gollapudi B., G. Krishna (2000) Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. *Mutation Research*, 455: 21-28.
- Gutiérrez A., J. Romero, J. del Rio (2001) Lipophilic extractives in process waters during manufacturing of totally chlorine free Kraft from eucalypt wood. *Chemosphere*, 44: 1237-1242.
- Houk V. (1992) The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A review, *Mutation Research*, 227: 91-138.
- Jansson M., P. Wormald, O. Dahlman (1995) Reactions of wood extractives during ECF and TCF bleaching of Kraft pulp *Pulp and Paper Canadian*, 96: 42-45.
- Jenkins R., R. Angus, H. McNatt, W. Howell, J. Kemppainen, M. Kirk, E. Wilson (2001) Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 1325-1331.
- Jeng W.-L. & S.-J. Kao (2002) Lipids in suspended matter from the human-disturbed Lanyang river, northeastern Taiwan. *Environmental Geology*, 43: 138-144.
- Joosten H., F. van Acker, D. van den Dobbelsteen, G. Horbach, E. Krajnc (2004) Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicology Letters*, 151: 113-134.
- Kinae N., T. Hashizume, T. Makita, I. Tomita, I. Kimura, H. Kanamori (1981) Studies on the toxicity of pulp and paper mill effluents-II. Mutagenicity of the extracts of the liver from spotted sea trout (*Nibea mitsukurii*). *Water Research*, 15: 25-30.
- Kostamo A. & J. Kukkonen (2003) Removal of resin acids and sterols from pulp mill effluent by activated sludge treatment. *Water Research*, 37: 2813-2820.

- Kotelevtsev S., O. Hänninen, P. Lindström-Seppä, S. Huuskonen, L. Stepanova, V. Glaser, A. Beim (2000) Mutagenicity of bleached and unbleached effluents from Baikalsk pulp and paper mill at lake Baikal, Russia. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3: 95-104.
- Larsson D., K. Kinnberg, J. Sturve, E. Stephensen, M. Skon, L. Forlin (2002) Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in guppies (*Poecilia reticulata*) Exposed to effluent from a pulp mill. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52: 13-20.
- LaFleur L. (1996) Sources of pulping and bleaching derived chemical in effluents. Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents, M. Servos, K. Munkittrick, J. Carey, G. van der Kraak, (Eds), St Lucie Press, Delray Press, FL. : 21-31.
- Lea L., P. Hepburn, A. Wolfreys, P. Baldrick (2004) Safety evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 771-783.
- MacLatchy D. & G. Van der Kraak (1995) The phytoestrogen β -sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134: 305-312.
- Mahmood-khan Z. & E. Hall (2003) Occurrence and removal of plant sterols in pulp an paper mill effluents. *Journal Environmental Engineering Science*, 2: 17-26.
- Maria V., A. Correia, M. Santos (2004) *Anguilla anguilla* L. genotoxic and liver biotransformation responses to abietic acid exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58: 202-210.
- Maria V., A. Correia, M. Santos (2003) Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary-treated effluents on *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 126-137.
- Maron D., & B. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113: 173-215.

- Mattsson K., K-J. Lehtinen, J. Tana, J. Härdig, J. Kukkonen, T. Nakari, C. Engström (2001) Effects of pulp mill effluents and restricted diet on growth and physiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49: 144-154.
- Mazza G. (1982) *Bacillus subtilis* “rec assay” Test with isogenic strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 177-184.
- Mellanen P., T. Petänen, J. Lehtimäki, S. Mäkelä , G. Bylund, B. Holmbom, E. Mannila, A. Oikari, R. Santti (1996) Wood-derived estrogens: studies *in vitro* with breast cancer cell lines and *in vivo* in trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 136: 381–388.
- Mellanen P., M. Soimasuo, B. Holmbom, A. Oikari, R. Santti (1999) Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus L. s.l.*) exposed to effluents from pulp and paper mills. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43: 133-137.
- Guíñez D. (2002) Efecto del porcentaje de sustitución de cloro por dióxido de cloro sobre las características de los efluentes de blanqueo de pulpa Kraft de *Pinus radiata*. Informe de memoria de título para optar al título de Ingeniero Civil Químico. Facultad de ingeniería, departamento de ingeniería química. Universidad de Concepción.
- Mortelmans K. & E. Zeiger (2000) Test Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29-60.
- Nieminen P., A. Mustonen, P. Lindström-Seppä, J. Asikainen, H. Mussalo-Rauhamaa, J. Kukkonen (2002) Phytosterols act as endocrine and metabolic disruptors in the european polecat (*Mustela putorius*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 178: 22–28.
- Pacheco M. & M. Santos (2002) Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in european eel (*Anguilla anguilla L.*) *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 331-347.

- Pérez-Alzola L. & M. Santos (1997) In vitro genotoxic evaluation of conventional bleached and biobleached softwood pulp mill effluents. *Mutation Research*, 395: 107-112.
- Pessala P., E. Schultz, T. Nakari, A. Joutti, S. Herve (2004) Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotest and fractionation procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59:263-272.
- Rao S., B. Quinn, B. Burnison, M. Hayes, C. Metcalfe (1995) Assesment of the genotoxic potential of pulp mill effluent using bacterial, fish and mammalian assays. *Chemosphere*, 31: 3553-3566.
- Saha B. (2003) Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30: 279-291.
- Sipi P., C. Rosenberg, Z. Rudek, P. Jäppinen, H. Vainio, H. Norppa (1997) Cytogenetic effects of softwood Kraft pulp bleaching effluents and methanesulfonyl choride in chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*, 390: 105-112.
- Strömberg L., R. Morck, P. Sousa, O. Dahlman (1996) Effects of internal process changes and external treatment on effluent chemistry. *Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents*, M. Servos, K. Munkittrick, J. Carey, G. van der Kraak, (Eds), St Lucie Press, Delray Press, FL., USA.: 3-19.
- Takigami H., S. Matsui, T. Matsuda, Y. Shimizu (2002) The *Bacillus subtilis* “rec assay”: a powerful tool for the detection of genotoxic substances in the water environment. Prospect for assessing potential impact of pollutants from stabilized wastes. *Waste Management*, 22: 209-213.
- Ucar G. & M. Balaban (2002) Ciclohexane extracts of black pine wood naturally grown in eastern Thrace. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 60: 34-40.
- Vidal G. (1994) Biodegradación de compuestos tóxicos en efluentes de industrias de madera. Memoria de grado para optar al grado de doctor por la Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de ingeniería química, Universidad de Santiago de Compostela.
- Vidal G., R. Méndez y J. Lema (1996) La industria celulósica de pasta y papel. Departamento de ingeniería química, Universidad de Santiago de Compostela, 139-145.

- Verta M., J. Ahtiainen, T. Nakari, A. Langi, E. Talka (1996) The effect of waste constituents on the toxicity of TCF and ECF pulp bleaching effluents. Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents, M. Servos, K. Munkittrick, J. Carey, G. van der Kraak, (Eds), St Lucie Press, Delray Press, FL.: 41-51.
- Van den Heuvel M., R. Ellis, L. Tremblay, T. Stuthridge (2002) Exposure of reproductively maturing rainbow trout to a New Zealand pulp and paper mill effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51: 65-75.
- Wolfreys A. & P. Hepburn (2002) Safety evaluation of phytosterol esters. Part 7. Assesment of mutagenic activity of phytosterols, phytosterol esters and cholesterol derivative, 4-cholesten-3-one. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 461-470.
- Información obtenida de las siguientes paginas: www.cmpc.cl, www.papelnet.cl, www.arauco.cl.

ANEXO

Publicaciones

- Xavier, C. R., Oñate, E., Mondaca, M. A. and Vidal, G. 2005. Genotoxicity assess on kraft pulp mill effluent treated by activated sludge and aerated lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (submitted).

Congresos

1. Oñate, E., Decap, J., Chamorro, S., Vidal, G. y Mondaca, M. A. 2004. Evaluación de la genotoxicidad de fitosteroles presentes en efluentes de fábrica de celulosa Kraft mediante el ensayo “Rec” de *Bacillus subtilis*. XXVI Congreso Chileno de microbiología. Valparaíso, 1 al 3 de Diciembre.
2. Oñate, E., Xavier, C., Belmonte, M., Vidal, G., Mondaca, M. A. 2005. Ensayo “rec” con *Bacillus subtilis* usado para evaluar la remoción de la genotoxicidad por el tratamiento de efluentes de la industria de celulosa Kraft. XXVII Congreso Chileno de microbiología. Pucón, 13 al 16 de Octubre (Enviado).
3. Oñate, E., Xavier, C., Mondaca, M. A., Belmonte, M., Vidal, G. 2005. La genotoxicidad como indicador de eficiencia en sistemas de tratamientos aeróbicos. XVI Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS-Chile. Viña del Mar, 23 al 26 de Octubre (Aceptado).
4. Xavier, C. R., Oñate, E., Mondaca, M. A., and Vidal, G. 2006. Kraft pulp mill effluent treated by activated sludge and aerated lagoon genotoxicity assess. 6° Fate and effects of pulp and paper mill effluents. Vitoria-Espírito Santo (Brasil), 9 al 12 de Abril (Enviado).

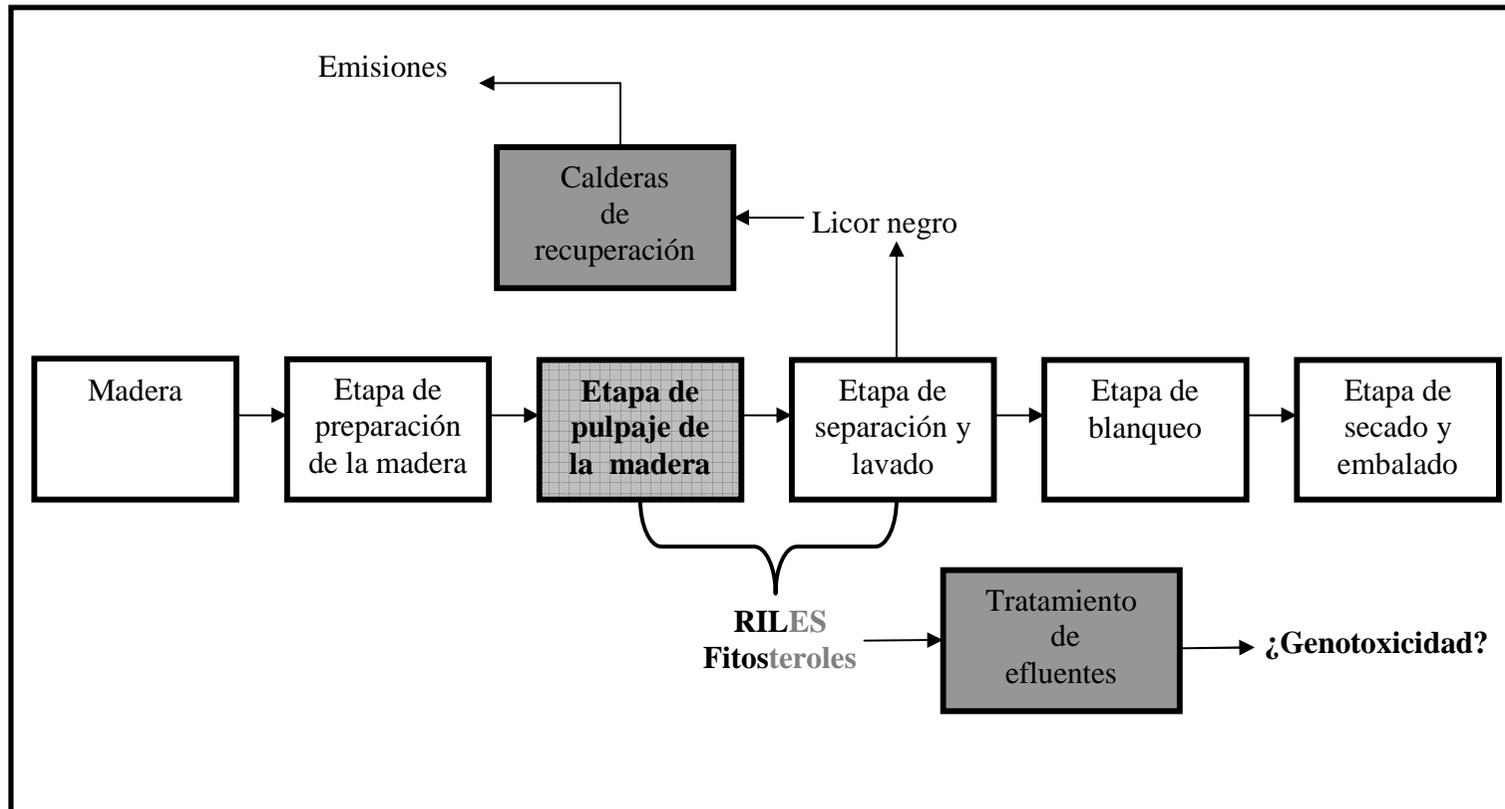


Figura 2-3. Proceso productivo y generación de residuos líquidos en la etapa de pulpage de la industria de celulosa Kraft.