



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



Centro de Ciencias Ambientales
EULA-CHILE

**EVALUACION DE ESTIGMASTEROL CONTENIDO EN EFLUENTE DE
CELULOSA KRAFT A TRAVES DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO
BIOLÓGICO AEROBICO**

Habilitación presentada para optar al título de

Ingeniero Ambiental

Alumno: Juan Pablo Vergara Riffo

Profesor guía: Dra. Gladys Vidal Sáez

Profesor co-guía: Dra. Soledad Chamorro Rodríguez

CONCEPCION (Chile), 2013

Esta tesis ha sido realizada en el laboratorio de Biotecnología en Ingeniería Ambiental del Centro de Ciencias Ambientales EULA- CHILE de la Universidad de Concepción.

Profesores Integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. Gladys Vidal S.
Tutora Tesis
Centro EULA-CHILE
Universidad de Concepción

Dra. Soledad Chamorro R.
Co-Tutora Tesis
Centro EULA-CHILE
Universidad de Concepción

Dra. Carolina Baeza F.
Evaluador interno
Centro EULA-CHILE
Universidad de Concepción

Dra. Patricia González S.
Evaluador Interno
Centro EULA-CHILE
Universidad de Concepción

Esta tesis está dedicada a mis amigos, por ser ellos los que con preocupación, amor y ternura me motivan a sortear las dificultades de la vida y a creer que mis sueños son lo más importante para ser feliz. A mi sobrino Juan Carlos por su paciencia, por su gran admiración, por enseñarme que sea como sea, pase lo que pase, este donde este, existe la inocencia de un niño que con una palabra cambia tu mundo. A mi sobrino Martín por ser esa personita que te mantiene con una sonrisa, con ganas de vivir, luchar y soñar cada vez más. . .

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero dar las gracias a las personas que me acompañaron en este camino y de quienes muchas veces me apoye en los momentos difíciles dándome su cariño y amistad, formando parte de mis sueños, de mis logros y alegrías.

A mi sobrino **Juanka**, por su cariño, admiración, inocencia, paciencia y comprensión. Por ser capaz de entender a su corta edad lo difícil, agotador y entretenido que es estudiar, por hacerme aterrizar cuando ya la máquina me estaba pasando la cuenta y por sus constantes enojos hacia mi computador cuando no podíamos jugar juntos. Gracias por ser mi mejor amigo y quien me inspira a ser mejor cada día.

Agradecer a mis hermanas simplemente por ser ellas, entre peleas, enojos, penas y alegrías, hemos estado ahí uno para el otro, de uno u otra forma y algún día en este mundo quedaremos solo los tres. Aunque no se los digo mucho las quiero mucho y junto al pollo son importantes para mí. Agradecer a mi hermanita chica por ser tan enojona y especial, pero ahora entiendes muchas cosas que antes no, porque ya eres parte de este juego llamado universidad y estoy orgulloso de lo fuerte que has sido. **Pau** recuerda que un buen profesional no es quien termina su carrera en los años lectivos, sino quien es capaz de enfrentar los problemas, pararse si se cae cuantas veces sea necesario y al salir de ella para enfrentar el mundo con la mirada en alto y decir este soy yo.

A mis compañeros de generación de quienes aprendí a disfrutar la universidad, aunque fue muy poco el tiempo que pase con ustedes los pequeños momentos, los terrenos, las discusiones, los carretes, las distintas actividades como grupo fueron la parte entretenida de esta experiencia.

Quiero agradecer a la persona que con penas, alegrías, peleas, reconciliaciones, horas en vela, horas de comidas y risas fue capaz de soportarme, entenderme y apoyarme incondicionalmente, **Babu** eres sin duda una de la personas que mas apporto a que este camino haya llegado a su fin, gracias por tu amistad, por tu

cariño y por las interminables conversaciones, la confianza y todo lo que hemos vivido durante estos 5 años juntos y por los siguientes muchos años que seguiremos siendo amigos.

Fabiola, gracias por ser mi peor mejor amiga y estar conmigo en cada locura, en miles de horas pegados al celu, por motivarme cuando ya no tenía ganas, ser como una mama más que una amiga, te quiero mucho y eres uno de los pilares que tengo en esta vida.

Lore y Exe, mis doblemente colegas. Los quiero mucho, me siento súper orgulloso de ustedes, gracias por las millones horas de estudios, ya han pasado casi 8 años de que comenzamos una historia como Químicos Analistas y ahora vamos por ser Ingenieros Ambientales, éxito en lo que les queda y quien sabe donde nos volveremos a encontrar en un futuro no muy lejano.

Agradecer a la **Vane** por ser la más regia del EULA y por la paciencia a mi estresada vida amiga te quiero, a la **Cami** por su alegría y buena onda, **Liszy** prima perdida gracias por tu “confía”, por el apoyo y las constantes motivaciones, al **Edu** por ser tan estresado como yo, por las horas de intensos estudios, por su confianza y admiración, se que tu también llegarás muy alto cabro chico.

Agradecer a todos y cada uno de los que hicieron mi estadía por la carrera una excelente experiencia llena de alegrías y risas. **Mariel, Jennie, Romo, Churra, Niki, Chica, Chela, Katy, Dany, Polo, Tito, Mota, Tome, Vivi, May, Pauci, Mane, Caro, etc.** Gracias por los distintos momentos vividos juntos.

Agradecer en especial a la familia de la Mariel, por su confianza, hospitalidad y cariños. **Roberto Paredes**, gracias por no ser solo el papá de una amiga, sino por ser tú también un gran amigo, un apoyo, un papa. Gracias por tu cariño, por tus consejos y por tus aquí estoy cuando lo necesites, te quiero mucho y eres parte importante también de esto, por tu admiración y motivación, por tu empuje a que todo va a mejorar, te doy gracias y aquí también estaré yo para cuando lo necesites.

Agradecer a los profesores que fueron quienes hicieron gran parte del trabajo, y quienes sin duda me tuvieron mucha paciencia, **Profe Paula** gracias por ser como una amiga, por sus consejos, por su tiempo y su constante preocupación, sus enseñanzas y la enorme paciencia, sin duda creo que aprendí mucho con usted y estoy feliz de haber sido su alumno. **Profe Paty** fueron muy pocas las clases juntos, pero sin duda usted siempre vio lo mejor de mí y me brindó su apoyo, cariño y preocupación, gracias por las conversaciones, consejos y los caramelos que tomaba de su oficina. **Profe Caro**, me cae tan bien, que ya ni sabía si era mi profe o éramos amigos, gracias por su enorme pero enorme paciencia, por su apoyo en cada locura que se me ocurría para terminar esta tesis y sus consejos.

Sin duda hay que no puedo dejar de agradecerle a la **tía Andrea** su cariño, es como la mamá de todos, es quien sin duda mejor nos conoce en el EULA, gracias por su ayuda, por su paciencia y hacer que todo fuera más fácil. Dar gracias a los **tíos auxiliares**, por su buena onda, por el café, por los favores, por ser tan aperraos, por su alegría en las mañanas y por tener siempre algo bueno que rescatar y buena palabras para cada uno de los que formamos parte de esta familia.

Finalmente dar gracias al grupo que me acogió durante este periodo de tesis, **Dra. Chamorro** gracias muchas gracias por todo y cada una de las conversaciones, por el cariño, la confianza y amistad, sin duda este trabajo te lo debo a ti a cada reto, a cada exigencia, a las ganas de hacer un buen trabajo, y por enseñarme de tus experiencias y conocimientos, te quiero mucho y me siento muy feliz de que tu hayas sido mi mamá científica, eres una gran mujer, la más linda del mundo con un gran corazón, fuerza y full apasionada con tu trabajo, sin duda serás una excelente madre pero la Anto tiene prohibido estudiar ciencias eso lo tenemos claro. **Mayra** gracias por tu amistad, por tu apoyo en este trabajo, por ser tan chora y alegre, gracias por tu paciencia y conversaciones y las risas que teníamos en la oficina por falta de concentración, **Maria Elisa** gracias por brindarme tu cariños y amistad en el momento que necesite esa mano que te sostuviera, no olvidare tus palabras y admiro tu fuerza, admiro la gran mujer que eres y sé que tu

mama está muy feliz y orgullosa de ti, por lo que eres, por lo que sueñas y por tus logros, muchas gracias por todo. **Dany** yo sé que me extrañas todos los días, te quiero mucho, gracias por tu buena onda, por tu cariño por ser tan linda y seguir el juego de mis locuras. **María José**, gracias por tu colaboración en este trabajo, también eres parte de este logro y fue muy bacán compartir esta experiencia después de haber sido compañeros y casi ni haber compartido, pero me hace feliz que la vida de vueltas y nos hayamos reencontrado así. **Babet** gracias por ser 100% Europea y entender mi humor poco común y ser tan alegre como eres, yo creo que algo de Europeo tengo que tener porque nos entendemos de maravilla y es lo que se usa, me encantas y mucho éxito en tus planes ya nos veremos por otras tierras no Chilenas. Al resto del grupo **Roció, Cata, Ale, Pablina, Marce, Pato, Cristian, Daniel, Guillermo, Fran**, agradecer su buena onda y compañerismo, les deseo mucho éxito en sus planes y bendiciones en su vida un abrazo para cada uno.

Agradecer a la **Dra. Gladys Vidal**, por permitirme desarrollar mi Seminario de investigación y Tesis con ella, por su confianza en mi trabajo, por su colaboración y guía para llevar a cabo este trabajo. Gracias por sus palabras y consejos siempre con cariño y de la mejor forma, fue un placer trabajar con usted y llegar a este momento y hacer de mi persona un Ingeniero Ambiental interdisciplinario.

Simplemente decir que me siento afortunado de haber compartido un par de años de mi vida en el EULA con personas que fueron parte de una linda familia y darles las gracias por formar parte de ella.

NOMENCLATURA

AL	Laguna aireada	
AS	Lodos activados	
DBO₅	Demanda Biológica de Oxígeno	(mg/L)
DQO	Demanda Química de Oxígeno	(mg/L)
F/M	Relación Alimento – Microorganismo	(gDQO/gSSV)
GC – FID	Cromatografía acoplada a detector ionización de llama	
IVL	Índice Volumétrico Lodo	(mLSS/mgSSV h)
Kow	Coeficiente de partición octanol – agua	
MeOH	Metanol	
SS	Sólidos Sedimentables	(mL/h)
SST	Sólidos Suspendedos Totales	(mg/L)
SSV	Sólidos Suspendedos Volátiles	(mg/L)
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico	(h)
VCO	Velocidad de Carga Orgánica	(gDQO/Ld)

INDICE GENERAL	Pag.
AGRADECIMIENTOS	4
NOMENCLATURA.....	8
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCION.....	16
1.1 Celulosa en Chile	20
1.2 Proceso productivo de la celulosa Kraft	24
1.3 Caracterización de la madera y su uso como materia prima en la obtención de celulosa Kraft	26
1.4 Características de grupos específicos de extraíbles, presentes en efluentes de celulosa Kraft	28
1.5 Sistemas de tratamientos	32
1.6 Biomasa (Formación de biopelícula)	34
1.7 Técnicas analíticas para identificación de estigmasterol.....	36
2. HIPOTESIS	37
3. OBJETIVOS	37
3.1 General	37
3.2 Específicos	37
4. METODOLOGIA.....	38
4.1 Efluente.....	38
4.2 Reactor de Lecho Movil MBBR.....	38
4.3 Operación del sistema MBBR.....	38
4.4 Biomasa	39
4.5 Caracterización de estigmasterol por GC – FID	39

4.6	Caracterización parámetros operacionales y eficiencia	40
5.	RESULTADOS.....	41
5.1	Caracterización fisicoquímica del influente.....	41
5.2	Caracterización del inóculo	42
5.3	Comportamiento operacional del sistema.....	43
5.4	Caracterización físico química del efluente de celulosa Kraft	44
5.5	Parámetros de eficiencia del reactor	46
5.6	Evolución de la biomasa bacteriana.	47
5.7	Determinación de estigmasterol a través de CG-FID	50
6.	DISCUSION.....	53
6.1	Caracterización físico química del efluente	54
6.2	Sistema MBBR	55
6.2.1	Parámetros operacionales, eficiencia de eliminación de materia orgánica y compuestos específicos presente en efluente de celulosa Kraft	55
6.2.2	Evolución de la Biomasa durante la operación del reactor.....	57
6.3	Evaluación presencia de estigmasterol	58
	CONCLUSIONES	61
	REFERENCIAS.....	62

INDICE FIGURAS		Pag.
Figura 1.	Proceso productivo celulosa Kraft	24
Figura 2.	Fitoesteroles presentes en la madera	29
Figura 3.	Estructura química del estigmasterol	30
Figura 4.	Diseño reactor MBBR	38
Figura 5.	Evolución del pH de influente (■), pH de efluente (■) y oxígeno disuelto (▲) durante el periodo de operación del reactor	44
Figura 6.	Eficiencia de eliminación de DQO (■) y DBO ₅ (■) durante el periodo de operación	47
Figura 7.	Relación entre IVL y relación alimento / microorganismo	48
Figura 8.	Microorganismos bioindicadores presentes en el sistema	49
Figura 9.	Curva adición estándar entrada reactor	51

INDICE TABLAS		Pag.
Tabla 1.	Producción de celulosa a nivel mundial 2009	20
Tabla 2.	Plantas de celulosa Kraft operantes en Chile: tipo de proceso, tratamiento y cuerpo receptor efluente	23
Tabla 3.	Componentes de la madera presentes en las materias primas más usadas por la industria de celulosa Kraft	27
Tabla 4.	Principales constituyentes de los extractivos presentes en especies de pino y eucalipto	28
Tabla 5.	Propiedades físico químicas del estigmasterol	31
Tabla 6.	Características físico química del influente de celulosa Kraft	41
Tabla 7.	Caracterización del inculo	42
Tabla 8.	Operación del reactor	43
Tabla 9.	Caracterización físico química del efluente de celulosa Kraft	45
Tabla 10.	Porcentaje de eliminación de compuestos específicos	46
Tabla 11.	Datos de cromatografías	50

RESUMEN

Fitosteroles presentes en la composición de la madera (grupo de los extraíbles), han sido ampliamente investigados en el ámbito científico por ser moléculas precursoras del colesterol y contar con un potencial biológico para modular rutas metabólicas de variados organismos. Específicamente, estigmasterol se encuentra como uno de los principales compuestos que podría tener un alto impacto en los ecosistemas debido a que es capaz de aumentar en más de 300%, posterior a sistemas de tratamientos biológicos aplicados en las industrias de celulosa Kraft. Actualmente, sistemas basados en el crecimiento de biomasa adherida (Movil Bed Biofilm Reactor: MBBR) han sido utilizados con éxito durante la última década en este tipo de industrias. Sin embargo, de estos sistemas, existe poca evidencia sobre la eliminación y/o degradación de compuestos específicos, tales como estigmasterol. Asociado a esto, se ha promovido un creciente interés por el desarrollo de múltiples métodos analíticos, incluyendo cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (CG-FID), para la detección de compuestos específicos presente en los efluentes de celulosa Kraft. Este trabajo evalúa la eficiencia de eliminación de estigmasterol contenido en un efluente de celulosa Kraft a través de un sistema de tratamiento biológico (MBBR). Para esto los objetivos planteados fueron i) Evaluar la eficiencia de eliminación de estigmasterol contenido en un efluente de celulosa Kraft a través de un sistema de tratamiento biológico (MBBR), ii) Identificar el estigmasterol en efluente de celulosa Kraft mediante técnica analítica de cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama. Los resultados evidencian que sistemas basados en biomasa adherida como MBBR, es eficiente en degradar la materia orgánica, (Demanda Biológica de Oxígeno > 90 %; Demanda Química de Oxígeno > 60%), sin embargo, no elimina compuestos específicos como el color y fenoles totales entre otros. Se observa que el influente posee una concentración de 33,3 µg/L promedio de estigmasterol. Sin embargo, en la salida no fue posible detectar la señal de este compuesto, lo que sugiere que la efectiva eliminación, degradación o transformación de este compuesto estaría dada por las condiciones operacionales del tratamiento biológico. A su vez, la estabilidad del lodo, se evidenció mediante índice

volumétrico del lodo (IVL) a la relación alimento microorganismo (F/M), de acuerdo a esto, la biomasa presenta características de lodo floculento, esto se relaciona con la presencia de microorganismos indicadores de estabilidad del lodo, nematodos, rotíferos y ciliados sésiles entre otros.

ABSTRACT

Phytosterols present in the composition of wood (extraibles group), have been widely investigated in the scientific field being cholesterol precursor molecules and have a biological potential to modulate metabolic pathways of various organisms. Specifically, stigmasterol is one of the main compounds that could have a high impact on ecosystems because it is able to increase by more than 300%, after biological treatment systems applied in Kraft pulp mills. Currently, systems based on biomass attached (Movil Bed Biofilm Reactor: MBBR) have been used successfully over the last decade in these industries. However, in these systems, there is poor evidence on the elimination, degradation on specific compounds, such as stigmasterol. Associated with this has been promoted a growing interest in the development of multiple analytical methods, including gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) for the detection of specific compounds present in Kraft mill effluents. This study evaluates the efficiency of removal of stigmasterol contained in a Kraft pulp mill effluent through a biological treatment system (MBBR). For this, the goals of this work were i) Evaluate the removal efficiency of stigmasterol contained in Kraft pulp effluent through a biological treatment system (MBBR), ii) Identify stigmasterol in Kraft pulp effluent by gas chromatography with detection flame ionization analytical technique. The results show that systems based on biomass as MBBR, is efficient in degrading organic matter (biological oxygen demand > 90% Chemical Oxygen Demand > 60%), however, does not eliminate specific compounds as color, total phenols, etc. Shows that the influent present a of 33.3 µg / L of stigmasterol. However, the effluent was not possible to detect the signal of this compound, which suggests that the effective elimination degradation or transformation of the stigmasterol would be given by the operating conditions of biological treatment. In turn, the sludge stability was evidenced by the sludge volume index (SVI) to the microorganism feed ratio (F / M), according, the shows that sludge present characteristics to sludge flocculent mainly this relates to the presence of microorganisms mud stability indicators , nematodes, rotifers and ciliates sessile among others.

1. INTRODUCCION

En las últimas décadas, el sector forestal ha presentado un gran desarrollo, alcanzando una notable competitividad en el ámbito internacional. Alrededor del 35% de la producción forestal Chilena se emplea en la industria de celulosa Kraft blanqueada, con una producción de 4,79 millones de toneladas de pulpa anual (Chiang et al., 2010).

Actualmente la madera utilizada en el proceso de celulosa Kraft a nivel nacional, se basa principalmente en dos especies, *Pinus radiata* y *Eucaliptus globulus*. Estas especies presentan diferencias en su composición de extraíbles, Presentando el pino mayor cantidad de ácidos resínicos (0,26%) que *E. globulus*, mientras que este último mayor concentración en esteroides (0,49%). Estas diferencias van a influir en la composición y calidad de los efluentes finales.

La producción de celulosa en el país, se encuentra concentrado en dos grandes empresas las que corresponden a Compañía Manufacturera de Papeles y Cartones (CMPC S.A.) y Empresas Arauco y Constitución S.A., las cuales hasta el año 2007, tenían una producción de 2,3 millones de toneladas y 2,6 millones de toneladas al año, respectivamente (ATCP, 2011).

Una de las principales regiones que sustenta la producción de celulosa Kraft blanqueada, es la región del Biobío. En particular, la cuenca del Río Biobío sustenta el 41% de la producción total, y es en éste ecosistema acuático dónde se han evidenciado alteraciones biológicas en peces, habitantes de las cercanías de las descargas de la industria de celulosa Kraft (Orrego et al., 2005; 2006; Chiang et al., 2010).

Estas industrias han invertido fuertemente en poder disminuir el impacto ambiental desde el origen. Los primeros cambios realizados en la etapa de blanqueamiento, fue la sustitución de cloro elemental por libre de cloro elemental (ECF) y totalmente libre de cloro elemental (TCF), procesos que han reducido la producción de compuestos organoclorados en más de un 90% al medio ambiente.

Por otro lado, dentro del proceso del vertido de efluentes, se han implementado sistemas de tratamientos para la eliminación de sólidos suspendidos, estos son eliminados a través de tratamientos primarios (Thompson et al., 2001), mientras que la materia orgánica en el efluente, medida como DBO_5 y DQO, es eliminada a través de sistemas biológicos, denominados tratamientos secundarios. Existen también otros sistemas de tratamiento dependiendo de la sensibilidad de los ecosistemas receptores, algunas industrias, han implementado tratamientos terciarios de tipo físico-químico para eliminar compuestos específicos que producen color (Vidal et al., 2007).

Específicamente los sistemas de tipo secundario son basados en: Lagunas aireadas, lodos activados y actualmente, reactores de lecho móvil (Movil Bed Biofilm Reactor: MBBR), los cuales han sido utilizados con éxito durante la última década (Villamar et al., 2009). El sistema MBBR, ha proporcionando un tratamiento estable, compacto y muy eficiente para eliminar la materia orgánica (Odegaard et al., 2000). Sin embargo, a pesar de la tecnología introducida tanto en el proceso de fabricación de la pulpa, como en los sistemas de tratamientos, aún se observan alteraciones en la fauna expuesta a las aguas residuales de este tipo de industrias (Chamorro et al., 2010). Al mismo tiempo, la evaluación de los efectos de los efluentes de celulosa Kraft ha sido difícil, debido a la variada gama de enfoques utilizados, la diversidad de especies utilizadas, las diferentes condiciones experimentales y el nivel de organización biológica en el que las respuestas han sido evaluadas.

A pesar de que las industrias de celulosa Kraft, han implementado sistemas de tratamiento biológico y físico-químico, existen pocas evidencias si estos sistemas son realmente efectivos en la eliminación de compuestos que pueden ser potencialmente activos al medio ambiente. Estos compuestos pertenecen a la fracción de extractivos de la madera y quedan liberados en la etapa de digestión, siendo arrastrados en las aguas de lavado de la pulpa. Es a estos compuestos que se le ha asociado, la capacidad de interferir principalmente en el metabolismo

de variados organismos acuáticos, habitante de las descargas de celulosa (Chamorro et al., 2013)

Estos compuestos incluyen lignanos, alcoholes triterpenos, ácidos resínicos, esteroides y estilbenos (Mellanen et al., 1996; Chamorro et al., 2009). Sin embargo, aun no existe con claridad el efecto producido, y la potencialidad en el medio acuático. Además, investigaciones en este ámbito aseveran que puede haber compuestos disruptores endocrinos (CDE) adicionales en los efluentes, que aún no se han caracterizado (Fernández et al., 2007). En general, estos compuestos se encuentran en concentraciones tan pequeñas que pueden resultar prácticamente inocuas a corto plazo, pero ser extremadamente peligrosas para la flora y fauna a largo plazo (Baer et al., 2009).

Dentro de los compuestos extraíbles de la madera, existen ciertos metabolitos que han sido foco de investigación, debido a la atribuible toxicidad de los efluentes finales. Entre estos tenemos a los fitoesteroides (0,49%) (Landman et al., 2006; Xavier et al., 2009), que se encuentran tanto en pino como en eucalipto. Específicamente los fitoesteroides, presentan una estructura química semejante al colesterol, común a todos los esteroides denominado ciclo pentano – per hidrofenantreno y una cadena lateral, que los diferencia entre sí (Guang Guo et al., 2002). Debido a esta característica es que estos compuestos pueden interactuar con los receptores hormonales de los organismos, provocando respuestas erróneas en el metabolismo de variados organismos. Un fitosterol en especial, estigmasterol se encuentra como uno de los principales compuestos que podría tener alto impacto en los ecosistemas, debido a que es el segundo más relevante en concentración (69 µg/L). Después del β-sitosterol (1200 µg/L) presente en efluentes de celulosa Kraft (Chamorro et al., 2009). Además, este compuesto ha sido foco de investigación por acumularse en sistemas de tratamientos biológicos basados en biomasa libre (Cook et al., 1997; Chamorro et al., 2005; Xavier et al., 2009). Sin embargo, existe poca evidencia si hay una eliminación parcial o total o más bien acumulación en sistemas de tratamientos biológicos con biomasa adherida.

Conocer la mayoría de componentes contenidos en efluentes de celulosa Kraft, nos permite hacer una perspectiva del potencial biológico que podría tener este tipo de vertido hacia el medio ambiente. Para ello, es que se hace indispensable poder utilizar técnicas analíticas tales como (cromatográficas e Infrarrojo), que permita la mayor identificación de compuestos presente en los efluentes (Fernández et al., 2007), obteniendo de esta forma la relación compuesto concentración. Debido a esto, el objetivo que plantea esta investigación es evaluar la presencia de estigmasterol contenida en efluentes de celulosa Kraft a través de un sistema de tratamiento biológico, determinado mediante la técnica de cromatografía de gas con detector de ionización de llama (CG – FID).

1.1 Celulosa en Chile

La producción de celulosa a nivel mundial cuenta con un ranking de países productores, de los cuales Estados Unidos, produce la mayor cantidad con un total de 48,3 millones de toneladas anuales, mientras que Alemania produce 2,5 millones de toneladas anuales. Cabe destacar que existen dos países latinoamericanos insertos dentro de este ranking, Brasil en un tercer lugar y Chile con el lugar número diez, siendo la producción de éstos de 13,3 y 5,0 millones de toneladas respectivamente hasta el año 2009.

Tabla 1. Producción de Celulosa a nivel mundial 2009

País	Miles de toneladas/año
EUA	48,329
China	20,813
Canadá	17,079
Brasil	13,315
Suecia	11,460
Finlandia	9,003
Japón	8,506
Rusia	7,235
Indonesia	5,971
Chile	5,000
India	3,803
Alemania	2,542
Resto del Mundo	24,898
TOTAL	117,957

Fuente: BRACELPA, (2011)

En Chile, la industria de celulosa, está comandada por dos grandes empresas, una de ellas es la Compañía Manufacturera de Papeles y Cartones (CMPC), mientras que la otra es Celulosa Arauco y Constitución (CELCO), las cuales distribuyen a lo largo del país, 9 plantas operantes de dicha industria, como se observa en el Tabla 2 (Vidal et al., 2007; Chiang et al., 2010). Específicamente, están localizadas entre la Región del Maule (VII) y de la Araucanía (IX), destacándose la Región del Biobío (VIII), con una producción nacional entre un 41% del total (Xavier, 2006; Belmonte et al., 2006; Chiang et al., 2010).

En Chile, esta industria utiliza como materia prima *Pinus radiata* (fibra larga) y *Eucalyptus globulus* (fibra corta), siendo, la producción de celulosa, la base de la actividad forestal a nivel nacional, representando una actividad económica del 3% del producto interno bruto (PIB) (Venegas, 2003). Sin embargo, se ha ido incrementando la producción de celulosa de fibra corta, debido fundamentalmente al rápido crecimiento que presenta el eucalipto. Este tipo de plantaciones forestales demoran la mitad del tiempo que el pino en alcanzar la madurez (Videla et al., 2003).

Desde 1970 hasta el año 2009, el crecimiento en la producción de celulosa varió de 325,5 a 4992 miles de toneladas generadas en el país (pulpa mecánica y química). Desde 1970 hasta 1989, la generación de pulpa es solo mecánica y varía de 325,5 miles de toneladas a 840,8 miles de toneladas. Ya en el año 1990, el país comienza a producir pulpa química, que en conjunto con la pulpa mecánica, genera en el primer año de funcionamiento 804,1 miles de toneladas hasta llegar a los 4229 miles de toneladas para el año 2009 (INFOR, 2011). En el año 2006, se observa un aumento considerable en la producción, esto por la puesta en marcha de la celulosa Arauco Nueva Aldea, la cual en el primer año de operación, produjo 856 miles de toneladas de celulosa, superando ampliamente al mayor productor de ese momento CMPC – Santa fé II que producía 780 miles de toneladas anuales (ATCP, 2011). Esta producción se encuentra estrechamente relacionada con la ubicación estratégica de las plantas de producción, concentrándose en la zona centro sur y sur del país, es decir, entre la Región del

Maule y la Región de los Lagos, lo que optimiza los costos de transporte de materia prima y la menor distancia hacia los puertos de embarques para su posterior exportación (Luraschi, 2007).

Tabla 2. Plantas de celulosa Kraft operantes en Chile: Tipo de proceso, tratamiento y cuerpo receptor

Planta	Región	Empresa	Proceso	Tipo de Celulosa	Producción (miles ton/año)	Tratamientos de efluentes	Cuerpo Receptor
Constitución Laja	VII	CELCO	Kraft/SB	UKP	350	TP:CL; TS: LA	Pacífico
	VIII	CMPC	Kraft/ECF	BSKP-UKP	340	TP:CL;TS:MBBR+LO	Río Biobío
Arauco I	VIII	CELCO	Kraft/ECF	BSKP-BEKP	260	TP:CL; TS: LA	Pacífico
Santa Fé	VIII	CMPC	Kraft/ECF	BEKP	1160	TP:CL;TS:MBBR+LO	Río Biobío
Pacífico	IX	CMPC	Kraft/ECF	BSKP	500	TP:CL; TS: LA	Río Biobío
Arauco II	VIII	CELCO	Kraft/ECf	BSKP-BEKP	495	TP:CL; TS: LA	Pacífico
Licancel	VII	CELCO	Kraft/ECF	BSKP	145	TP:CL; TS: LA	Río Mataquito
Valdivia	XIV	CELCO	Kraft/ECF	BSKP-BEKP	685	TP:CL;TS:LO;TT:DAF	Río Cruces
Nueva Aldea	VIII	CELCO	Kraft/ECF	BSKP-BEKP	856	TP:CL;TS:LO;TT:DAF	Río Itata

Fuente: Vidal et al. (2007); Chiang et al. (2010). SB: Sin Blanqueo; ECF: Elementary Chlorine Free; TP: Tratamiento Primario; CL: Clarificador Gravitacional; TS: Tratamiento Secundario; LO: Lodos Activados; LA: Lagunas Aireadas; MBBR: Movil Bed Biofilm Reactor; TT: Tratamiento Terciario; DAF: Flotación por aire disuelto; UKP: Unbleached Kraft Pulp; BSKP: Bleached Softwood Kraft Pulp; BEKP: Bleached Eucalyptus Kraft Pulp.

1.2 Proceso productivo de la celulosa Kraft

El proceso de producción de la celulosa Kraft consta de varias etapas, las que corresponden a preparación de la madera, pulpaje o digestión, lavado y deslignificación, blanqueo, hasta llegar a la disposición final.

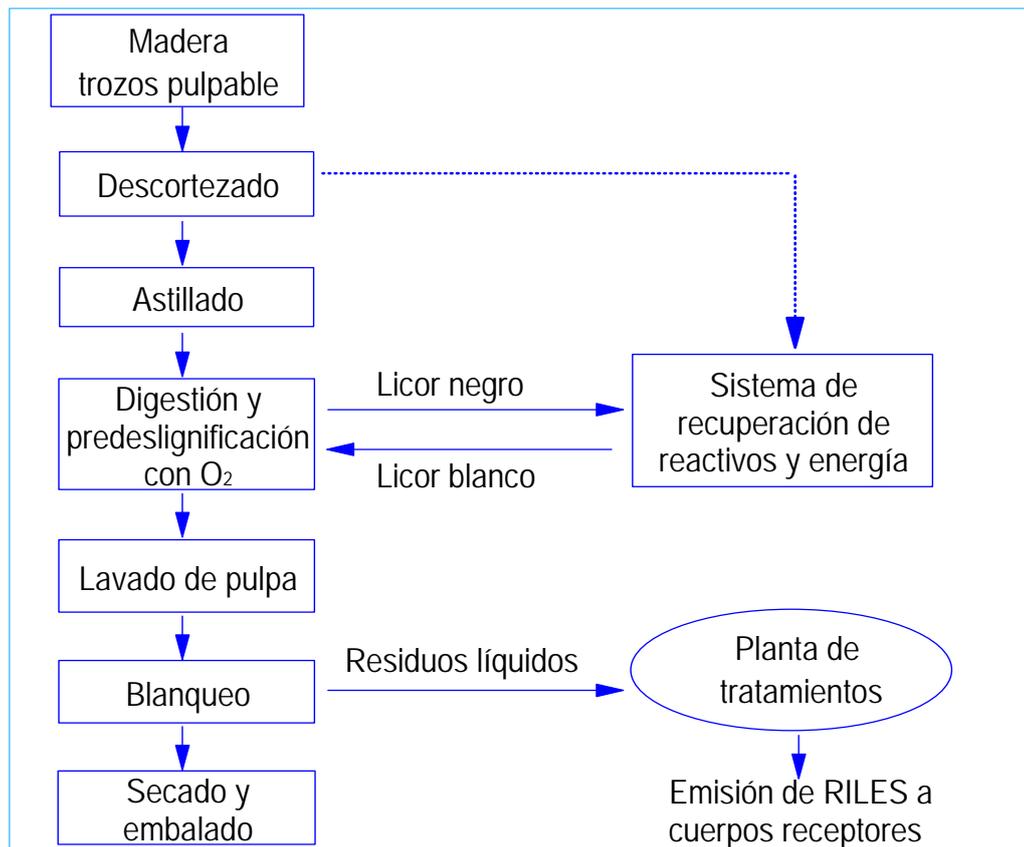


Figura 1. Proceso Productivo de Celulosa Kraft

Preparación de la madera, el proceso de preparación de la madera, abarca desde el momento en que la materia prima llega a la industria, donde se acopia en canchas (ARAUCO, 2010), para ser luego transformada físicamente en donde los rollizos se descortezan y posteriormente se astillan (Davis, 2000).

Pulpaje o digestión de la madera, la etapa de digestión de madera, corresponde a la cocción de las astillas en el digestor, en presencia de licor blanco. Esta operación se lleva cabo entre los 160° C - 180° C y a presión, lo que permite disolver gran parte de la lignina que une a las fibras de la madera (Zaror, 2002).

De este proceso, se genera licor negro (licor blanco y lignina removida) el cual debe ser tratado para su recirculación al proceso, lo que recibe el nombre de recuperación química, en donde se generan residuos inorgánicos, (Zambrano, 2007).

La recuperación química se lleva a cabo dirigiendo el licor negro proveniente del digestor a los evaporadores, proceso en el cual se evapora el agua, concentrando así el licor negro inicial, posteriormente éste es enviado a la caldera de recuperación en donde la materia orgánica es quemada, transformándose así en licor verde (mezcla de sulfuro de sodio y carbonato de sodio). El licor verde obtenido es llevado a un proceso de caustificación, lugar en donde se adiciona cal, transformando este licor verde en licor blanco, reacción que consiste en transformar el carbonato de sodio contenido en el licor verde a hidróxido de sodio presente en el licor blanco y así ser devuelto al proceso de digestión (Arauco, 2010).

Lavado y deslignificación, el lavado de la pulpa cruda tiene como objetivo la remoción de fibras que no fueron removidas en la etapa de digestión, por lo cual se hace ingresar agua al sistema generando así un residuo líquido que contiene agua y restos de lignina. Posteriormente, se realiza la deslignificación, en esta etapa se agrega en algunos casos oxígeno con el mismo objetivo anterior, disminuir la lignina presente antes de pasar a la etapa blanqueo, ya que la presencia de ésta se encuentra directamente relacionada con la cantidad de agentes químicos a utilizar en la etapa de blanqueo. Posteriormente, el flujo producido es conducido a la recuperación química por poseer los mismos componentes pero en menor concentración (Arauco, 2010; Davis, 2000).

Blanqueo, la etapa de blanqueo corresponde a la adición de químicos y/o agentes oxidantes para eliminar de forma completa y definitiva la lignina que no pudo ser removida durante todas las etapas anteriores, actualmente en el país se utiliza dióxido de cloro (ClO_2) (Zaror, 2002), produciéndose efluentes que son dirigidos a la planta de tratamiento, en donde son tratados para su posterior vertido.

Secado y disposición final, en esta última etapa y final del proceso, la pulpa ya blanqueada es secada mediante la adición de vapor, para su posterior embalado en correas con dimensiones específicas, almacenado y venta. Sin embargo, se debe mencionar, que la generación de energía utilizada durante el proceso productivo, es producida mediante generadores y gracias a los vapores provenientes de la caldera de biomasa, lugar donde se procede a la incineración de residuos orgánicos, como las cortezas y la mezcla de lodos de tratamiento de efluentes, los cuales en su reducción forman cenizas. Actualmente éstas se disponen en vertederos.

Generación de residuos industriales líquidos (RILES), con respecto a los residuos líquidos vertidos a cuerpos de agua por la industria de celulosa Kraft, estos se caracterizan por presentar un contenido de carga orgánica, debido a fragmentos de compuestos lignínicos, compuestos azufrados, compuestos extractivos, etc., que son difíciles de degradar. Para determinar la calidad del agua y las alteraciones ambientales que causan estos residuos, se han establecidos ciertos parámetros como son los indicadores físicos (color, turbidez, conductividad eléctrica y temperatura), indicadores químicos (pH, potencial óxido-reducción y dureza) e indicadores de la contaminación orgánica (COT: Carbono Orgánico Total; DBO₅: Demanda Biológica de Oxígeno; DQO: Demanda Química de Oxígeno, etc.). Este sector industrial genera tres tipos de alteraciones en el agua (físico, químico y biológico).

1.3 Caracterización de la madera y su uso como materia prima en la obtención de celulosa Kraft

En Chile, las principales especies de árboles usadas en la producción de celulosa son el *Pinus radiata*, el *Eucalipto globulus*, los que se encuentran en abundancia en las plantaciones, ubicadas principalmente desde la VII a la X Región (CERTFOR, 2005).

La variabilidad de las especies de árboles no sólo está dada por sus diferencias morfológicas, tiempo de maduración ó lugar de procedencia, sino también por su composición química, especialmente de los extractivos, los cuales son

responsables del color y olor de la madera. Las composiciones promedio, de la madera son: celulosa (43%), hemicelulosa (25%), lignina (28%) y en menor extensión los extractivos de madera (4%) (Belmonte et al., 2006). No obstante, estos valores pueden variar según el tipo de madera, presentando diferencias fundamentalmente en su composición química.

En los extractivos, también se pueden observar diferencias según la dureza de la madera, en el caso de las maderas blandas (MB), como el pino, presentan mayor cantidad de extractivos (0,5- 7,0%) que las maderas duras (MD), como es el caso del eucalipto (0,2-3,5%). Además, las maderas blandas son ricas en ácidos resínicos (8,9%), mientras que en las maderas duras abundan los fitoesteroles (0,49%). Sin embargo, ambos tipos de materia prima presentan tanto ácidos resínicos como fitoesteroles (Mellanen et al., 1996; Kostamo and Kukkonen, 2003).

Tabla 3. Componentes de la madera presentes en las materias primas más usadas por la industria de celulosa Kraft.

Componentes de la madera	Eucalipto (%)	Pino (%)
Celulosa	42-46 ¹	43-50 ¹
Hemicelulosa	35 ¹	25 ¹
Lignina	17-26 ¹	25-31 ¹
Compuestos extraíbles	0,2-3,5 ²	0,5-7,0 ²

Fuentes: 1. Oñate, (2006); 2. La Fleur, (1996).

Tabla 4. Principales constituyentes de los extractivos presentes en especies de Pino y Eucalipto.

Constituyentes de la fracción lipofílica de la madera	Pino (mg/g madera)	Eucalipto (mg/g madera)
Ácidos grasos	4	0,28
Ácidos resínicos	8,9	N.E.
Esteroles (*)	0,2	0,49
Ceras	1,6	0,06
Ésteres de esteroides	1,2	0,52
Triglicéridos	7,3	0,13

Fuente: Oñate, (2006). N.E: No Estudiado. (*) El valor dado corresponde solo a la concentración de β -sitosterol.

1.4 Características de grupos específicos de extraíbles, presentes en efluentes de celulosa Kraft

Dentro de los compuestos extraíbles de la madera, existen ciertos metabolitos que han sido foco de investigación, debido a la atribuible toxicidad de los efluentes finales. Entre estos tenemos a los ácidos resínicos, encontrados principalmente en pino (8,9%) en tanto que, en maderas de eucalipto son los fitoesteroides (0,49%) (Landman et al., 2006).

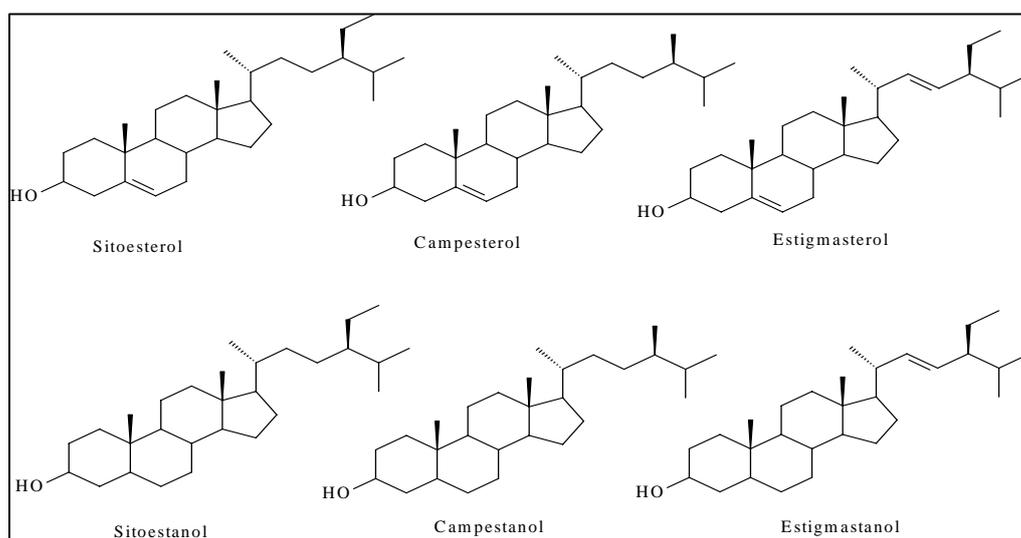
El rol fundamental de los ácidos resínicos en la madera, es que actúa como mecanismo de defensa, protegiendo la madera contra el ataque de insectos, o microorganismos y químicamente pertenece al grupo de los terpenos (Sjöström, 1993).

El comportamiento de los ácidos resínicos en sistemas de tratamientos secundarios, presentan diferencias, es así que en tratamientos anaeróbicos dichos compuestos son muy tóxicos para las bacterias metanogénicas presentes en concentraciones sobre 40 mg/L y 89 mg/L, respectivamente, ocasionan la inhibición en un 50% de la actividad metanogénica, por lo cual para que ocurra

una biodegradación de los ácidos resínicos deben estar a concentraciones inferiores a 100 mg/L en el efluente (McCarthy et al., 1990).

Por otra parte, los fitoesteros presentan una estructura química semejante al colesterol, que es común a todos los esteroides, (ciclopentanoperhidrofenantreno) y una cadena lateral, que los diferencia entre sí. Los fitoesteros cumplen una función similar a la del colesterol en el cuerpo humano, es decir, participan en las rutas endocrinas y tienen importancia en la formación y mantención de las membranas celulares (Guang-Guo et al., 2002; Fernández et al., 2003).

En general se puede decir que estos compuestos son apolares, insolubles en agua y altamente lipofílicos con valores de coeficiente octanol/agua (Kow) mayor a 6 (Hewitt et al., 2000; Guzmán et al., 2007). Si bien, existen distintos fitoesteros detectables en los efluentes de pulpa de celulosa, el β -sitoesterol es el compuesto presente en mayor cantidad (>50%), y el que ha sido objeto de mayor investigación. Además del β -sitostesterol, se han detectado también, campesterol, estigmasterol, estigmastanol, campestanol, β -sitoestanol (Hewitt et al., 1996; Cook et al., 1997; Kukkonen et al., 1999; Jenkins et al., 2001; Van den Heuvel et al., 2002).



Fuente: Chamorro et al. (2011)

Figura 2. Fitoesteros presentes en la madera

Específicamente el estigmasterol ha sido un compuesto donde existen pocas evidencias o información sobre su distribución o eficiencia en sistemas de tratamiento. Estudios realizados en efluentes de celulosa Kraft han encontrado estigmasterol en concentraciones de 1,69- 69 $\mu\text{g/L}$ (Jeng and Kao, 2002), siendo el segundo compuesto más abundante e importante dentro de los esteroides. Además, propiedades físico-químicas del estigmasterol, como el valor de $\log K_{ow}$ (10,20) nos indica que es un compuesto hidrofóbico, por lo cual se mantiene en el efluente como un coloide en suspensión, posee un peso molecular de 412,7 g/mol, lo que la hace una molécula pequeña, de fácil ingreso a los tejidos adiposos donde se puede adherir con facilidad y bioacumularse dentro de los organismos y un punto de ebullición (140°C) lo que la hace resistente y de difícil eliminación. Lo anterior descrito muestra las características que hacen persistente a este esteroide en el medio ambiente (Xavier et al., 2009).

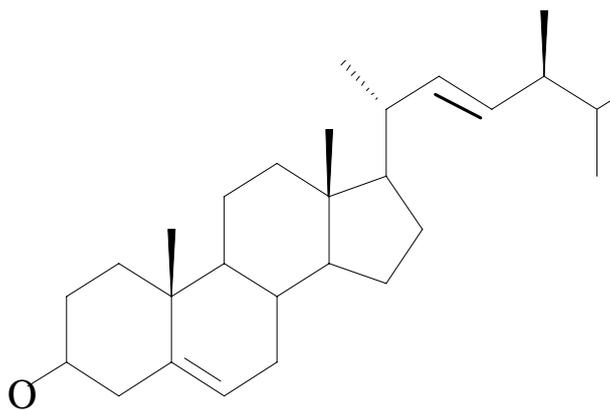


Figura 3. Estructura química del estigmasterol

Tabla 5. Propiedades físico químicas del estigmasterol

Parámetro	Estigmasterol	Cita
Nombre IUPAC	3 β -Hidroxi-24 etil-5,22-colestadieno	1
Numero CAS	83 - 48 - 7	1
Formula empírica	C ₂₉ H ₄₈ O	1
Masa molecular (g/mol)	412,7	1
punto de fusión (°C)	139 - 142	1
Log Kow	10,2	2,3
Poco soluble en	acetona, etanol, metanol, hexano	1
Soluble en	cloroformo	1
DQO teórico (g DQO/g)	3,1	
% fitoesteroles totales	9,27 \pm 2,91	4,5,6

Fuente: 1) Merck, 2000. 2) Fang et al., 2003. 3) Rugutt and Rugutt, 2002. 4) Mellanen et al., 1999. 5) van den Heuvel et al., 2002. 6) Khan and Hall, 2003.

Investigadores, han demostrado que los sistemas de tratamiento actuales, influyen fuertemente en la degradación de estos compuestos extraíbles, Vidal et al. (2007), demostró que en las zonas anóxicas, los compuestos intermedios de la biodegradación de ácidos resínicos pueden producir acumulación. Por otra parte, Kostamo and Kukkonen. (2003), han demostrado que más del 41% de los esteroides se reducen o se transforman en otros compuestos. Además, en general, menos del 5% de los ácidos resínicos y más del 31% de los esteroides se eliminaron en sistemas de lodos activados (SA). Por otro lado, Khan and Hall. (2003), y Kostamo et al. (2004), han obtenido porcentajes de fitosterol adsorbidos a partir de 30 a 70% en la biomasa de sistemas en base a lodo activo y lagunas aireadas (AL). Cook et al. (1997), trabajó con 5 plantas de celulosa Kraft donde el proceso de blanqueo era ECF, encontrando una reducción de fitosteroides tanto para SA y LA, sin embargo, en el caso de estigmasterol aumento entre 192% y 367% en sistema de lodos activados. Una explicación para este aumento del compuesto, es que en este tipo de sistemas existen microorganismos que

favorecen la transformación química o biológica del precursor de estigmasterol en condiciones aerobias (Cook et al., 1997).

1.5 Sistemas de tratamientos

La industria de celulosa Kraft, se ha desarrollado aceleradamente durante las últimas décadas, y es a este tipo de industria que se le ha relacionado con la generación de grandes cantidades de aguas residuales. Debido a esto, la industria de celulosa Kraft, ha invertido fuertemente en sistemas de tratamientos en sus vertidos líquidos residuales. Para ello, procesos físico-químicos y biológicos son empleados para eliminación de sólidos suspendidos (Thompson et al., 2001) y materia orgánica respectivamente (Chamorro, 2005).

Dentro de los sistemas aeróbicos o secundarios, existen sistemas de tratamiento con biomasa libre y biomasa adherida, dentro de los primeros se encuentran las lagunas aireadas, implementadas por la facilidad de operación y una relativa eficiencia de eliminación de materia orgánica biodegradable (60%) (Chamorro et al., 2005), sin embargo, debido a la concentración de la biomasa, este tipo de tratamiento involucra grandes extensiones de terreno y elevado tiempo de retención hidráulica. Una alternativa al sistema de lagunas, lo constituyen los lodos activados, el cual posee eficiencias similares de eliminación de DBO₅ (85 a 95%), de igual forma la eliminación de DQO no sobrepasa el 60%, debido principalmente a presencia de ligninas de elevado peso molecular y a compuestos fenólicos clorados de difícil degradación (Xavier et al., 2005).

De manera general, las plantas de tratamiento de efluentes de celulosa Kraft, consiguen atender los valores de vertimientos correspondientes a la materia orgánica biodegradable medida como DBO₅. Sin embargo, los valores de color resultan más difíciles de cumplir. Por otro lado, los procesos biológicos generalmente no remueven elementos recalcitrantes y consiguen bajas reducciones de DQO y/o Carbono Orgánico Disuelto (COD), inclusive, en la mayoría de los casos, altas concentraciones de estos compuestos biorefractarios pueden inhibir el rendimiento y ser tóxicos con diversas consecuencias y efectos negativos a los ecosistemas acuáticos (Raj et al., 2005; Pokhrel and Viraragharan,

2004). De esta forma, los efluentes industriales que poseen compuestos recalcitrantes presentan un desafío para los sistemas de tratamientos biológicos (Freire et al., 2000).

Los sistemas de tratamiento biológico aeróbico permiten reducir la carga orgánica biodegradable, DBO₅, y los niveles de toxicidad, generalmente provenientes de las etapas de pulpado y blanqueo, utilizando para ello microorganismos en un medio aireado. De este tipo de sistemas encontramos las lagunas aireadas, lodos activados y sistemas con aplicación de carriers ó soportes móviles.

Lagunas aireadas, las lagunas aireadas (LA) son utilizadas en Chile como tratamiento secundario de efluentes de celulosa Kraft. Dicho tratamiento biológico es capaz de remover la materia orgánica y la toxicidad, corresponden a las primeras tecnologías utilizadas en el mundo basadas en procesos biológicos. Es definida como un estanque donde el efluente lo atraviesa continuamente y donde es suministrado oxígeno en base a la difusión de aireadores artificiales que permiten la transferencia del oxígeno y a su vez mantener en suspensión el contenido de este sistema (Ramalho, 1983). Esta clase de tratamiento tiene la ventaja de disminuir la DQO entre un 40-70%, pero tiene la desventaja, de requerir de grandes superficies de terreno, como también de una elevada cantidad energía para mantener el proceso, a su vez, este sistema produce biomasa la cual debe ser extraída cada cierto tiempo para ser depositadas en rellenos autorizados.

Lodos activados, los sistemas de lodos activados remueven la DBO₅ en un 65 a 99% (Field et al., 1989; Vidal, 2001), de igual forma la eliminación de DQO no sobrepasa el 60%, debido principalmente a presencia de ligninas de elevado peso molecular y a compuestos fenólicos clorados de difícil degradación (Xavier et al., 2005). En general, son reactores más compactos, de mayor flexibilidad de operación y con cortos tiempos de retención hidráulico (Xavier, 2006). Sin embargo, uno de los problemas son las desestabilizaciones del sistema, por ingresos de tóxicos y/o pick de cargas orgánicas en el sistema, generándose bacterias filamentosas y posterior bulking en el sistema (Pozo, 2010).

Movil Bed Biofilm Reactor (MBBR), actualmente una alternativa para el tratamiento biológico de aguas residuales de efluentes de celulosa, son los sistemas que utilizan biopelículas como forma de crecimiento de microorganismos (Rusten and Neu, 1999; Chen et al., 2000). Este sistema es capaz de degradar contaminantes orgánicos y nutrientes en los efluentes de aguas residuales. Consisten en reactores con mezcla completa suministrada por difusores de aire que introducen burbujas al sistema desde el fondo del reactor. En el tanque se introducen soportes especialmente diseñados para una gran área superficial y adherencia que sirven como base al crecimiento de los microorganismos. La turbulencia generada por las burbujas de aire permite que los soportes se encuentren en movimiento continuo junto con el líquido y que aumente la probabilidad de contacto entre los microorganismos adheridos a ellas y los contaminantes del agua residual. El sistema MBBR ha proporcionando un tratamiento estable, compacto y muy eficiente para eliminar la materia orgánica (Odegaard et al., 2000).

Implementación sistema MBBR en Chile: en la actualidad, las industrias de celulosa Kraft, han implementados dentro de sus tratamientos los sistemas de tipo MBBR, presentan una mayor eficiencia en la eliminación de DBO₅ (85-99%) y DQO (24-85%) a tiempos de retención hidráulica menor a dos horas (Duplaa et al., 2006; Runsten, 2006; Plattes et al., 2006). En este tipo de sistemas, el porcentaje de soporte usado como relleno puede variar hasta un máximo del 70% del volumen total y manteniéndose en movimiento por efecto de la aireación (Chang et al., 2005). Sin embargo, como desventajas, se pueden considerar los altos aportes de oxígeno requeridos para agitación (5-8 mgO₂/L) (Esoy et al., 1998), costos del relleno y ausencia de control sobre la purga de lodos (Malmqvist et al., 2006).

1.6 Biomasa (Formación de biopelícula)

Las biopelículas son comunidades microbianas sésil formadas por células que están irreversiblemente adheridas a una superficie, interfase o unas a otras y embebidas en una matriz de sustancias extracelulares poliméricas producidas por ellas mismas, y que exhiben un fenotipo alterado con respecto a la velocidad de crecimiento y transcripción de genes (Costerton et al., 1995). En definitiva, es una

capa de células procariotas y eucariotas adheridas a una superficie y embebidas en una matriz orgánica (Lasa et al., 2005).

Etapas en la formación de la biopelícula

- Acondicionamiento de la superficie por adsorción de materia orgánica.
- Transporte de células y nutrientes al sitio de adherencia.
- Inicio del proceso de adhesión bacteriana, todavía reversible, por atracción electrostática.
- Crecimiento celular, colonización y adhesión irreversible.
- Alta actividad metabólica y liberación de células localizadas en la periferia.

La formación de la biopelícula se mantiene unido a través de la excreción microbiana de diversas sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que actúan como una matriz gelatinosa que rodea las células. Además de esto, una de las características más interesantes de MBBR es la importancia de la suspensión individual, por lo que el reactor no es exclusivamente un biofilm o un sistema de suspensión de fase, sino más bien un híbrido.

Las especies filamentosas, que son más usuales de encontrar en una biopelícula son: *Zooglea sp*, *Sphaerotilus sp* y *Beggiatoa sp*, con la ventaja de que no se generan los problemas registrados en lodos activados. *Beggiatoa sp* es una filamentosas que no produce "bulking", debido a que es capaz de resistir altas carga de materia orgánica y desestabilizaciones en el sistema.

Particularmente, un sistema de biopelícula se diferencia de un sistema de biomasa libre, por una mayor presencia de hongos concentrados en la parte superficial de la película biológica. Especies como *Fusarium sp* y *Geotrichum sp* son las especies más comunes debido a su capacidad de adherirse fuertemente a superficies (Winkler, 1995).

1.7 Técnicas analíticas para identificación de estigmasterol

La complejidad en la composición química e identificación de compuestos microcontaminantes en los efluentes de celulosa Kraft tratados, han despertado un creciente interés por el desarrollo de múltiples métodos analíticos, incluyendo cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), ionización química de presión atmosférica (APCI), cromatografía gaseosa con detección de espectrometría de masa (CG-MS) y cromatografía líquida con espectrometría de masa (LCMS) (Ternes et al., 2001; Céspedes et al., 2004). Estas técnicas analíticas proporcionan una excelente sensibilidad y precisión en la determinación de la concentración de compuestos presentes en efluentes de celulosa (Stehmann et al., 2004). Una de las más exitosas para detectar compuestos en mezclas complejas lo determina la CG-MS (Fernández et al., 2007), ya que se presenta como una técnica de gran alcance, obteniéndose resultados con límites de detección menores a los 2 µg/L, es selectiva y sensible (Latorre et al., 2003; Conceição et al., 2002). Sin embargo, la gran limitante de las técnicas cromatográficas es la necesidad de tener los patrones correspondientes a los compuestos que se desean identificar (Nakada et al., 2005).

Cromatografía de gas con detector ionización de llama (CG-FID), es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito, su única función es la de transportar el analito a través de la columna. La detección se basa en la conductividad eléctrica de los gases. A temperatura y presión normales, los gases se comportan como aislantes, pero si en su interior existen átomos o moléculas cargadas eléctricamente, o electrones libres, se produce un incremento en la conductividad, esto hace que el detector sea particularmente adecuado para el análisis de compuestos orgánicos contaminados con agua, azufre u óxidos de nitrógeno. Su sensibilidad es más elevada que la del detector de conductividad térmica (TCD), por otro lado su límite de detección corresponde a $\approx 10^{-12}$ g/mL y presenta un gran intervalo lineal (10^7).

2. HIPOTESIS

Existe eliminación de estigmasterol contenido en efluente de celulosa Kraft cuando es sometido a un sistema de tratamiento biológico aeróbico.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar eficiencia de eliminación de estigmasterol contenida en efluentes de celulosa Kraft a través de un sistema de tratamiento biológico, determinado mediante CG – FID.

3.2 Específicos

3.2.1. Evaluar la eficiencia de eliminación de estigmasterol contenido en un efluente de celulosa Kraft a través de un sistema de tratamiento biológico (MBBR).

3.2.2. Identificar el estigmasterol en efluente de celulosa Kraft mediante técnica analítica de cromatografía gaseosa.

4. METODOLOGIA

4.1 Efluente

Se utilizó un efluente de celulosa Kraft, proveniente de una planta local basada en materia prima de *Pinus radiata* con sistema ECF de blanqueo. La toma del efluente, se realizó después del tratamiento primario de la planta. Los efluentes fueron almacenados en bidones de 20L y refrigerados a 4°C en oscuridad.

4.2 Reactor de Lecho Móvil MBBR

Se utilizó un bioreactor de lecho móvil (MBBR). Con un volumen útil de 0,840L, para el relleno se utilizó 100 soportes de polietileno (AMB1) con una densidad y superficie específica de 98kg/m³ y 850 m²/m³, respectivamente.

4.3 Operación del sistema MBBR

El sistema MBBR (Figura 4) fue operado por un periodo de 145 días a 19 ± 3°C, con pH de 7,2 ± 2 y a una concentración de oxígeno disuelto entre 4 – 8 mg/L mediante un difusor de oxígeno. La operación del sistema MBBR consistió en operar un Tiempo de Retención Hidráulico (TRH) de 2 días. El sistema MBBR fué alimentado con efluente de *Pinus radiata* suplementado con nutrientes en la proporción de DBO₅:N:P de 100:5:1.

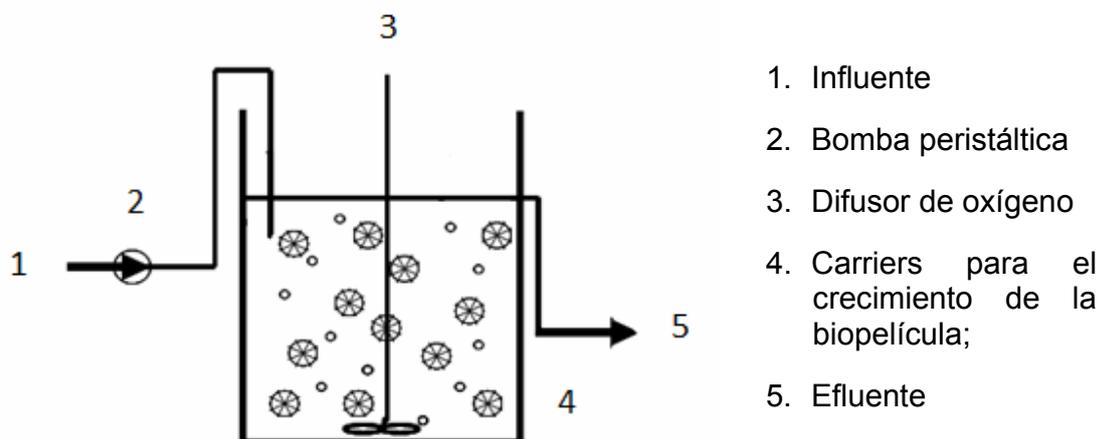


Figura 4. Diseño de reactor MBBR

4.4 Biomasa

La biomasa empleada en este estudio, se obtuvo de lodo de una planta de tratamiento de aguas servidas. La biomasa se transportó en bidones de 5L, almacenada y refrigerada a 4°C. Se determinó la concentración de la biomasa mediante la determinación del peso seco a través de SST (Sólidos Suspendidos Totales) y SSV (Sólidos Suspendidos Volátiles) con el fin de inocular 5 gSSV/L en el reactor. La determinación de la actividad específica de la biomasa se realizó midiendo la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo a una temperatura determinada. Con esta técnica se determinó la actividad heterótrofa de la biomasa. Empleando un sistema de monitorización de oxígeno biológico (BOM, Modelo YSI 5300).

Observaciones de los microorganismos presente en el sistema fueron realizados mediante microscopio óptico acoplado a una cámara Nikon coolpix 3500 a un aumento de 400X.

4.5 Caracterización de estigmasterol por GC – FID

La técnica de extracción en fase sólida (SPE) con columnas de fase inversa C-18 (no polares), se utilizó para preconcentrar compuestos orgánicos derivados de las plantas de tratamiento de celulosa Kraft y posterior uso en CG-FID. Para ello, se filtraron 100 mL de la muestra de efluente a través de membrana Whatman micro fibra de vidrio (tipo GF / C: 4,7 cm de diámetro y 0,45 µm de retención de partículas). Después de eso, la muestra se extrajo por medio de la SPE utilizando cartuchos de fase inversa Accubond® ODS C-18, previamente acondicionados con dos volúmenes de agua Milli-Q - metanol, un volumen de acetato de etilo. Los ensayos se realizaron bajo vacío a 4 mL/min. (2 columnas fueron preparadas para cada muestra).

La composición de los efluentes se analizaron de uno de los cartuchos previamente eluido con dos volúmenes de metanol (12 mL), y se preconcentró por medio de nitrógeno suave corriente a 2 mL para su posterior análisis mediante la técnica de cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (CG-FID).

Las condiciones de operación fueron: Horno temperatura inicial de 150° C, aumentando a 10°C/min a temperatura final de 280°C. Temperatura del inyector 250°C, temperatura del detector 280°C, flujo de gas nitrógeno 2,0 mL/min. Detector tipo FID, flujo de hidrógeno 40,0 mL/min, flujo de aire 450,0 mL/min, flujo combinado 30,0 mL/min. Columna modelo Agilent 19091s-433 HP-MS 5% fenil – metil - siloxano, longitud 30 m, diámetro interno 0,5 µm.

La cuantificación de estigmasterol en las muestras de efluente de celulosa Kraft se realizó a través de la técnica de cuantificación de adición de estándar. Para ello se seleccionaron tres puntos de muestra correspondientes a la primera, quinta y novena semana de operación del reactor bajo óptimas condiciones tanto a la entrada y a la salida del mismo, se prepararon para su cuantificación tomando una del triplicado como muestra y las otras dos como puntos de adición estándar las cuales se recargaron con concentraciones de 1000 µg/L y 2000 µg/L respectivamente.

4.6 Caracterización parámetros operacionales y eficiencia

Se realizó una caracterización físico-química del efluente en los distintos tiempos de retención hidráulicos, mediante DQO (Demanda Química de Oxígeno), DBO₅ (Demanda Biológica de Oxígeno soluble a los 5 días) y fenoles totales de acuerdo con estándar methods (APHA – AWWA – WPCF, 1985). Nitrógeno total (NT), fósforo total (FT) mediante kit espectrocuant NOVA-60 de Merck. Se determinó la medición del color mediante longitud de onda de A400nm, lignina mediante UV280nm y compuestos aromáticos UV254nm – ácido lignosulfónico UV346nm según Çeçen, (2003). Todas la muestras fueron filtradas por membranas Wathman 0.45µm y medidas en un termo - espectrofotómetro Génesis 10 UV Unicam.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización fisicoquímica del influente

La Tabla 6, muestra los resultados obtenidos de la caracterización realizada al influente obtenido de la industria de celulosa Kraft.

Tabla 6. Caracterización físico química del influente de celulosa Kraft

Parámetro	Unidad	Rango		Promedio*
		Min.	Max.	
pH		7,38	7,41	7,40 ± 0,01
DQO (T)	mg/L	1114,20	1187,10	1145,57 ± 24,64
DQO (S)	mg/L	686,90	746,40	720,18 ± 30,22
DBO ₅	mg/L	300,00	326,26	313,13 ± 18,57
Aromático UV 254 nm	abs	4,20	4,26	4,23 ± 0,04
Lignina UV 272 nm	abs	3,40	3,44	3,42 ± 0,03
Lignina UV 280 nm	abs	2,98	3,04	3,01 ± 0,04
Acido Lignosulfónico UV 346 nm	abs	0,62	0,68	0,65 ± 0,04
Color (UV 440 nm, p H 9)	abs	0,10	0,11	0,11 ± 0,00
Fenoles totales UV 215nm	mg/L	188,40	193,60	191,00 ± 3,68
Fósforo total	mg/L	0,90	1,20	1,05 ± 0,21
Nitrógeno total	mg/L	3,21	3,38	3,30 ± 0,12
Sulfato	mg/L	128,70	129,01	128,86 ± 0,22
SST	g SST/L	1,30	1,34	1,32 ± 0,03
SSV	g SSV/L	0,53	0,55	0,54 ± 0,01

*Valores promedio 6 determinaciones, DQO: Demanda Química de Oxígeno, DBO₅: Demanda Biológica de Oxígeno, SST: Sólidos Suspendidos Totales, SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles.

Se observa que los valores referidos en la tabla corresponden a un efluente sin tratamiento biológico, esto dado por la alta concentración de materia orgánica medida como demanda química de oxígeno total y soluble (1145,6 mg/L y 720,2 mg/L respectivamente). Además de la demanda biológica de oxígeno (313,1 mg/L). Por otro lado, valores de fenoles totales (191,0 mg/L), indican que este influente presenta materia prima en base a pino (Diez et al., 2002).

5.2 Caracterización del inóculo

Se caracterizó la biomasa presente en lodos correspondiente a 5,21 gSSV/L la Ttabla 7, presenta la actividad heterotrófica del lodo a inocular encontrándose una velocidad de consumo de oxígeno de 0,08 mgO₂/L·d con una actividad heterotrófica específica de 0,22 mgO₂/gSSV·d.

Tabla 7. Caracterización del inóculo

Parámetro	Unidad	Inóculo
pH		6,90
SST	g/L	6,38
SSV	g/L	5,21
SSV/SST		0,75
Velocidad consumo de oxígeno	mg O ₂ /L· d	0,08
Actividad heterotrófica	mg O ₂ /g SSV ·d	0,22

SST: Sólidos suspendidos totales; SSV: Sólidos suspendidos volátiles

La Tabla 7 presenta las condiciones biológicas del lodo, mediante la velocidad de consumo de oxígeno, se observa que esta se presenta en condiciones óptimas de transferencia de oxígeno para la activación u/o formación de la biopelícula en el reactor. La actividad heterotrófica, por su parte, demuestra el estado de renovación de los microorganismos, se observa que este está por encima de la velocidad de consumo, siendo óptima para la formación de la biopelícula a generarse dentro del reactor.

5.3 Comportamiento operacional del sistema

Tabla 8. Operación del reactor MBBR

Parámetro	Unidad			
Relación de nutrientes	DBO ₅ : N : P	100: 5: 1		
Periodo	d	1	-	145
TRH	d	1,94	±	0,11
Caudal	L/d	0,421	±	0,021
DBO ₅ /DQO influente		0,452	±	0,209
DBO ₅ /DQO efluente		0,143	±	0,074
VCO - Volumétrica	KgDQO/m ³ ·d	0,343	±	0,001
VCO - Volumétrica	Kg DBO ₅ /m ³ ·d	0,155	±	0,004

TRH: Tiempo Retención Hidráulica; DBO₅: Demanda Biológica de Oxígeno; DQO: Demanda Química de Oxígeno; VCO: Velocidad Carga Orgánica.

La Tabla 8 muestra la evolución del TRH, la razón DQO/DBO₅ indicando la biodegradabilidad del efluente presentando un valor de 0,452 y 0,143 para influente y efluente respectivamente, VCO volumétrica MBBR en el tiempo. Por un lado, se pudo observar que alimentando el sistema con influentes provenientes de *Pinus radiata* para un TRH de 2 d, se obtuvo VCO de 0,155 ± 0,004 kgDBO₅/m³·d y de 0,343 ± 0,001 kgDQO/m³·d.

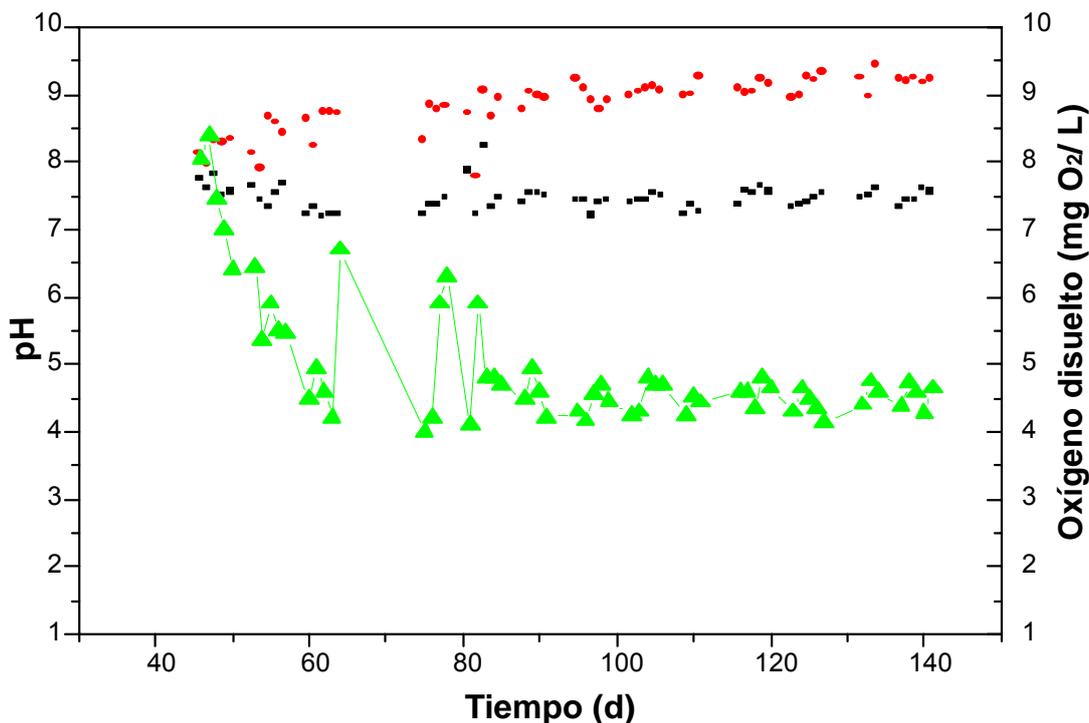


Figura 5. Evolución del pH de influente (■), pH de efluente (■) y oxígeno disuelto (▲) durante el periodo de operación del reactor.

Como se observa en la Figura 5, el pH del influente se mantuvo durante todo el periodo en un promedio de $7,44 \pm 0,18$. Mientras que para el efluente, el pH se mantuvo durante todo el periodo en un promedio de $8,82 \pm 0,39$. Ya que existe degradación de microorganismos y/o células vegetales que generan un aumento del pH (Ramalho, 1983). La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en un promedio de $4,97 \pm 0,98$ (mg O₂/L), con el fin de generar la mezcla completa.

5.4 Caracterización físico química del efluente de celulosa Kraft

Los resultados de la caracterización físico química del efluente (Tabla 9), mostraron rangos de variabilidad de pH, que evidencian la movilidad de este parámetro dentro de la operación de estos reactores. Por otro lado se evidencia color, este fenómeno atribuido a la presencia de lignina (2,45) y ácido lignosulfónico (0,40).

Tabla 9. Caracterización físico química del efluente de celulosa Kraft

Parámetro	Unidad	Rango		Promedio*
		Min.	Max.	
pH		7,75	9,20	8,82 ± 0,39
DQO (S)	mg/L	244,40	310,24	276,86 ± 32,38
DBO ₅	mg/L	31,71	48,35	39,52 ± 8,83
Aromático UV 254 nm	abs	2,32	3,54	3,03 ± 0,86
Lignina UV 272 nm	abs	1,84	2,76	2,45 ± 0,65
Lignina UV 280 nm	abs	1,60	2,46	2,13 ± 0,61
Acido lignosulfónico UV 346 nm	abs	0,16	0,60	0,40 ± 0,31
Color (UV 440 nm, p H 9)	abs	0,10	0,15	0,12 ± 0,03
Fenoles totales UV 215nm	mg/L	146,33	149,58	144,14 ± 2,30

*Valores promedio 9 determinaciones, DQO: Demanda Química de Oxígeno, DBO₅: Demanda Biológica de Oxígeno.

Se observa una variación en la concentración de materia orgánica (Tabla 9) medida como demanda química de oxígeno soluble (310 - 244 mgO₂/L). Además de la demanda biológica de oxígeno (48 - 31 mg/L). Por otro lado, valores de fenoles totales (144,14 mg/L), indican que este influente presenta eliminación de compuestos específicos al ser sometidos al sistema de tratamiento biológico del tipo MBBR.

5.5 Parámetros de eficiencia del reactor

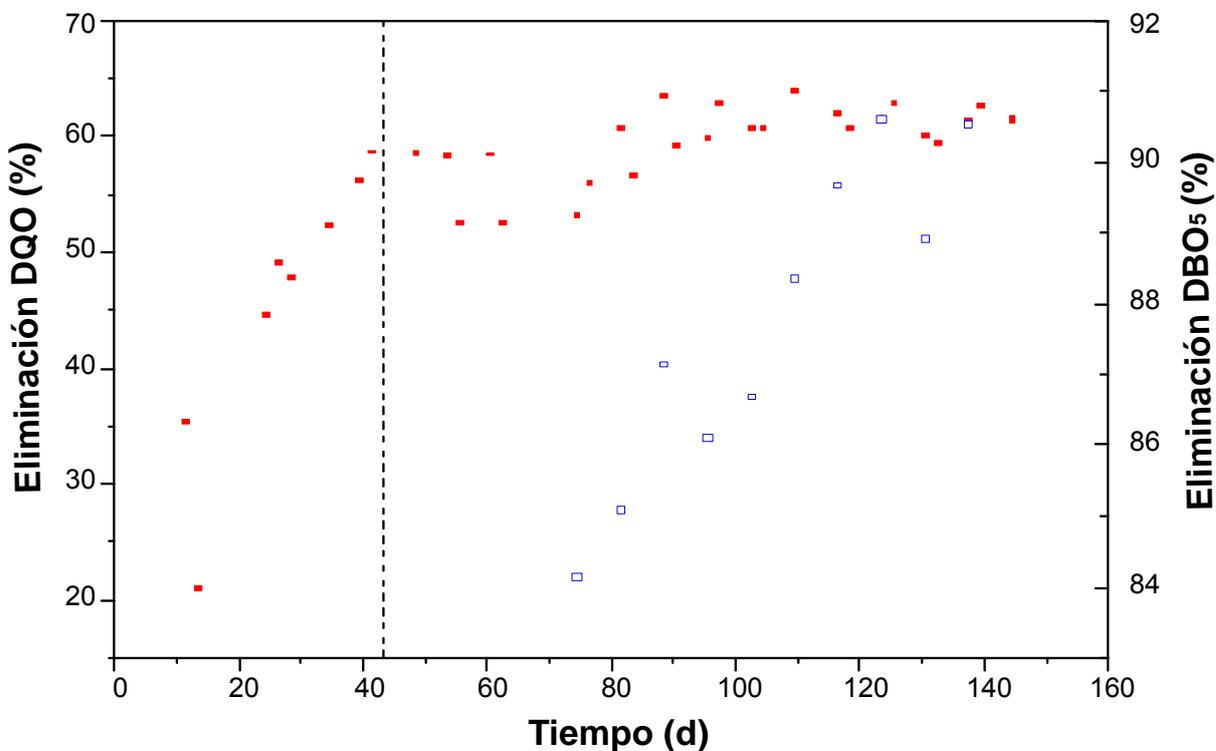


Figura 6. Eficiencia de eliminación de DQO (■) y DBO₅ (□) durante el periodo de operación.

La Figura 6, muestra la eficiencia de eliminación de carga orgánica obtenida durante la operación del reactor en términos de DQO y DBO₅. Se observan valores de eliminación de DQO y DBO₅, de 59,49% y 87,27% en promedio respectivamente.

Se observa una fase de 40 días de periodo crítico, en donde existen valores de 55% de eliminación de DQO, posterior a los 40 días, se trabaja con un efluente distinto, observando un cambio en la cantidad de materia orgánica, evidenciando una eliminación de DQO y DBO₅ en 63,3% y 90,5% respectivamente.

Tabla 10. Porcentajes de eliminación de compuestos específicos

Parámetro	Unidad	Eliminación (%)
Aromático UV 254 nm	Abs.	22,1
Lignina UV 272 nm	Abs.	19,1
Lignina UV 280 nm	Abs.	20,5
Acido lignosulfónico UV 346 nm	Abs.	26,5
Color UV 440	Abs.	18,9
Fenoles totales UV 215 nm	mg/L	19,3

Durante la operación, se evidencio la directa relación que guardó la eficiencia de eliminación de compuestos fenólicos totales con la eliminación de color. La Tabla 8, muestra una eficiencia de eliminación de compuestos fenólicos totales del orden de 19,3% que estuvieron directamente relacionadas a deficiencias en la eliminación de color del orden de 18,9%.

La Figura 6, muestra la eficiencia de eliminación de carga orgánica obtenida durante la operación del reactor en términos de DQO y DBO₅. Se observan valores de eliminación de DQO y DBO₅, de 59,49% y 87,27% en promedio respectivamente.

Se observa una fase de 40 días de periodo crítico, en donde existen valores de 55% de eliminación de DQO, posterior a los 40 días, se trabaja con un efluente distinto, observando un cambio en la cantidad de materia orgánica, evidenciando una eliminación de DQO y DBO₅ en 63,3% y 90,5% respectivamente.

5.6 Evolución de la biomasa bacteriana.

Para evaluar tanto la capacidad de sedimentación del lodo como la calidad de este, se relacionó el índice volumétrico del lodo (IVL) a la relación alimento microorganismo (F/M) (Figura 7). De esta forma se realiza una estimación del tipo de lodo presente en el reactor pudiendo ser de tipo: disperso, floculento o lodo

inflado (bulking). La biomasa mantuvo características de lodo floculento principalmente, durante todo el periodo de operación.

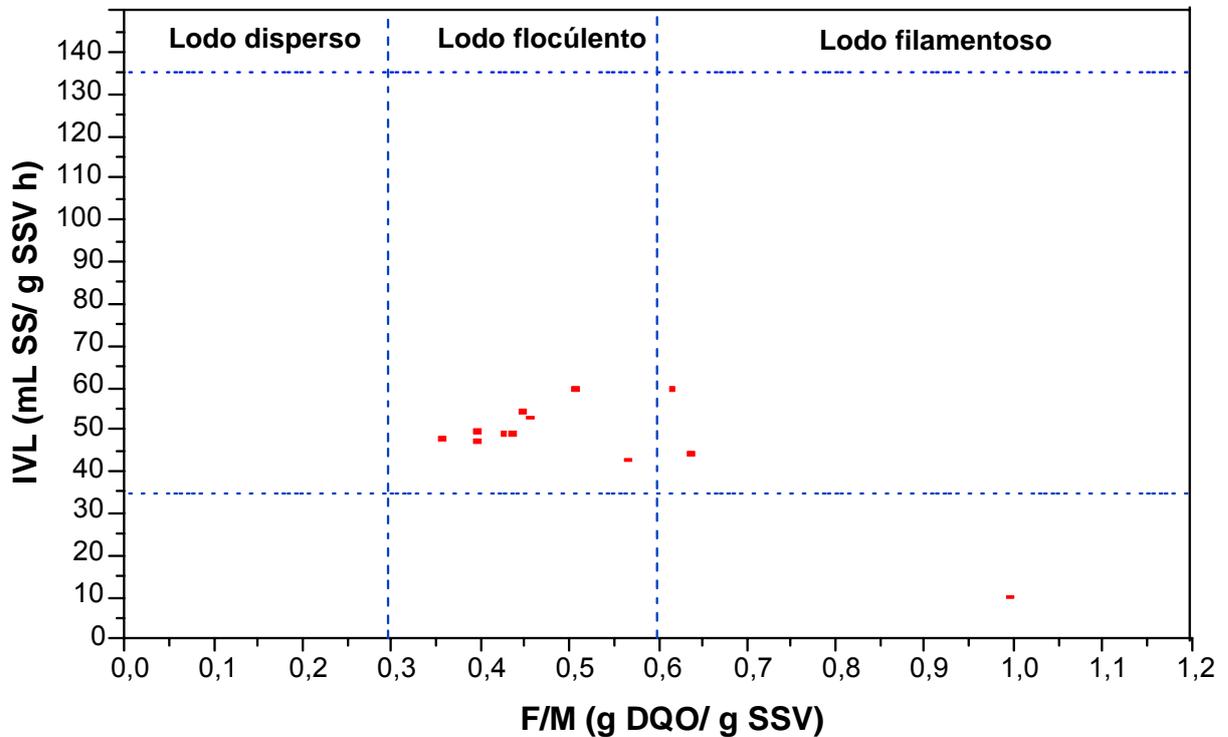


Figura 7. Relación entre IVL y relación Alimento/Microorganismo

Además, se caracterizó microscópicamente el tipo de microorganismos presentes en el reactor ya que el tipo de microorganismos presentes corresponden a un indicador de calidad de operación y manejo del sistema. Mediante microscopia óptica se observó el tipo de microorganismos presentes en el lodo.

La Figura 8, muestra algunos de los microorganismos observados a través de microscopia óptica donde (A) corresponde a un nematodo, por otro lado, (B), (E) e (I) corresponden a ciliados fijos que se encuentran unidos al floculo. (D) y (G) son ciliados libres nadadores y (C), (F) y (H) corresponden a rotíferos.

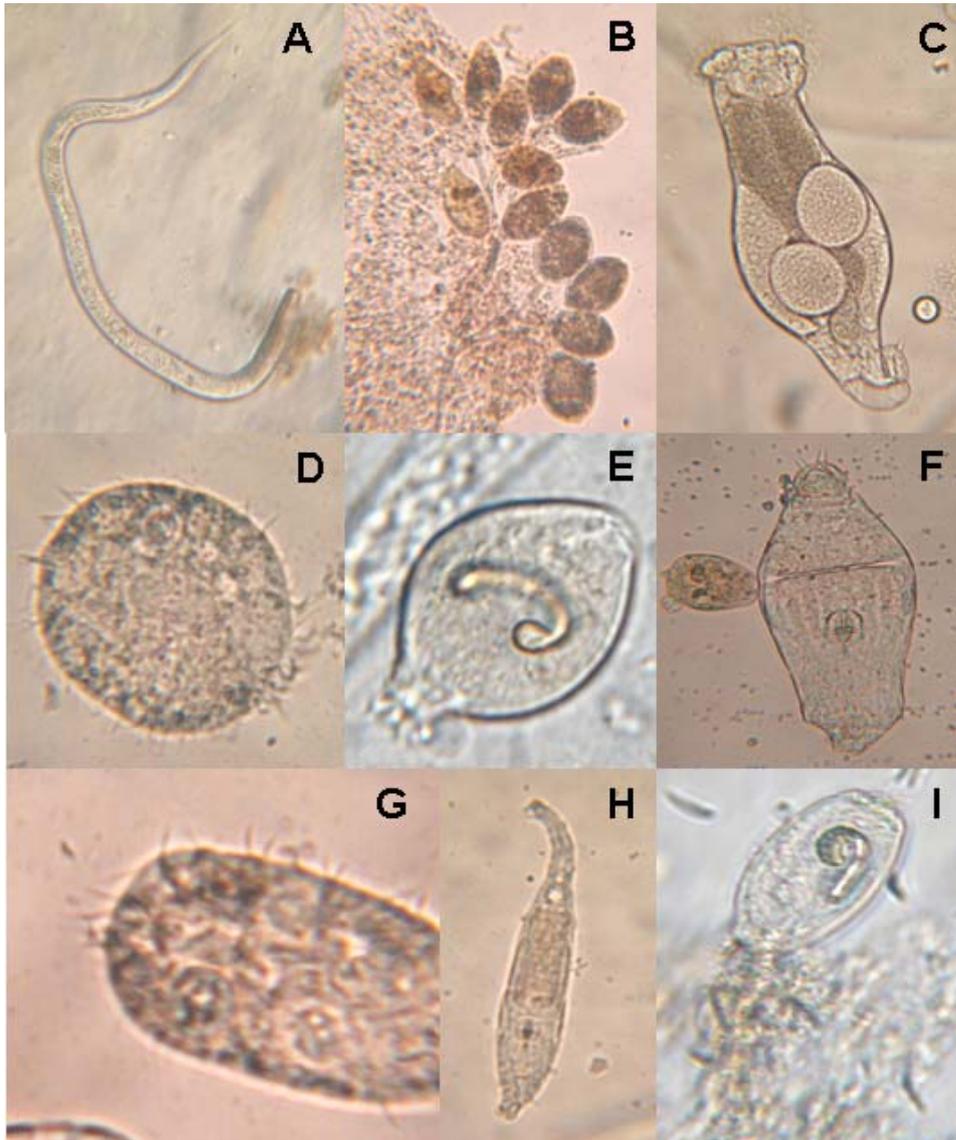


Figura 8. Microorganismos bioindicadores presentes en el sistema

5.7 Determinación de estigmasterol a través de CG-FID

Tabla 11. Datos de cromatografías

Muestra	Fecha	Tiempo retención min	Adición estándar (µg/L)	Área (pA*S)	Concentración calculada (µg/L)
E1		30,88	0	106,83	20,56 ± 0,05
E1 Std 1	30-08-12	30,88	1000	235,90	
E1 Std 2		30,88	2000	381,96	
E5		30,87	0	60,03	29,15 ± 0,05
E5 Std 1	05-10-12	30,88	1000	182,65	
E5 Std 2		30,89	2000	285,54	
E9		30,86	0	29,73	51,58 ± 0,05
E9 Std 1	30-11-12	30,90	1000	348,52	
E9 Std 2		30,92	2000	581,87	
S1		< N.D	0	0,00	N.C
S1 Std 1	30-08-12	30,87	1000	136,20	
S1 Std 2		30,89	2000	150,32	
S5		< N.D	0	0,00	N.C
S5 Std 1	05-10-12	30,87	1000	96,02	
S5 Std 2		30,90	2000	450,40	
S9		< N.D	0	0,00	N.C
S9 Std 1	30-11-12	30,88	1000	150,12	
S9 Std 2		30,88	2000	202,24	

E: Entrada; S: Salida; Std: Estándar; N.D: No Determinado; N.C: No Cuantificado; pA*S: Área del pico*segundo.

La Tabla 11, muestra los datos obtenidos a través de las cromatografías realizadas en el laboratorio de cromatografía a gas con detector de ionización de llama en el departamento de Fotoquímica de la facultad de ciencias Biológicas y Oceanografía de la universidad de Concepción.

Con respecto al tiempo de retención del estigmasterol bajo las condiciones de operación, este presenta un error inferior al 0,5% por lo cual se acepta y confirma

bajo la medición de los estándares que los picos encontrados corresponden a estigmasterol.

Para la cuantificación de estigmasterol en las muestras de efluentes de celulosa Kraft tanto a la entrada y salida del reactor fueron extrapoladas de la curva de adición estándar. Obteniéndose concentraciones de 20,56; 29,15; 51,58 $\mu\text{g/L}$ a la entrada del reactor respectivamente, por otra parte a la salida del reactor no se pudo cuantificar la concentración de estigmasterol debido a que no fue posible detectar alguna señal en la muestra. Estimándose que bajo las condiciones de operación en el reactor este es capaz de eliminar, degradar o transformar por completo al estigmasterol.

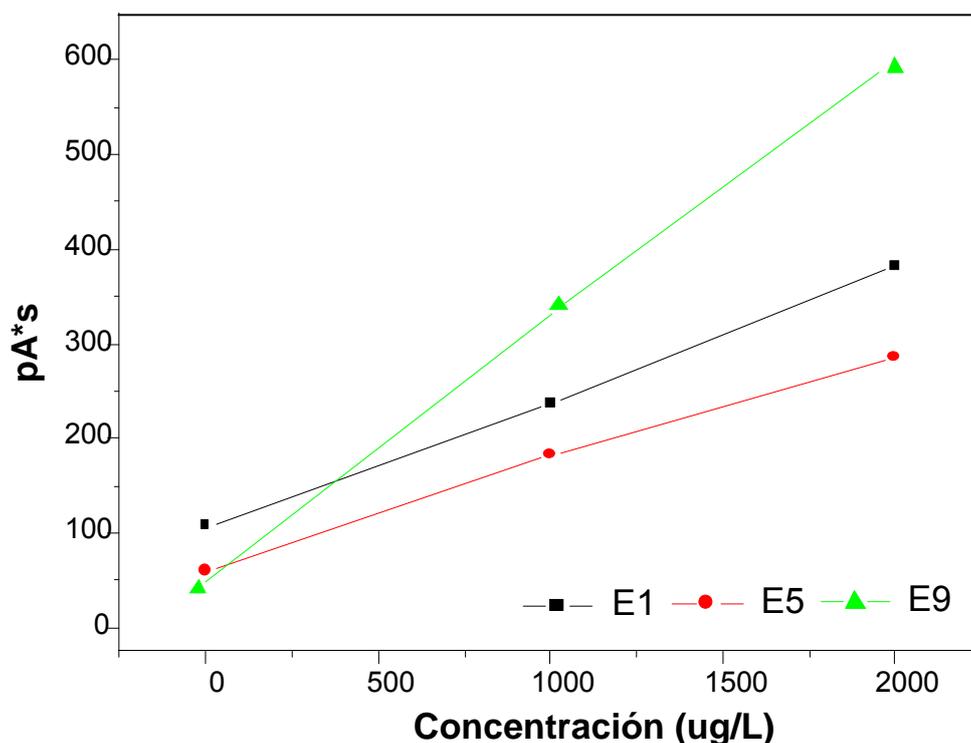


Figura 9. Curva Adición Estándar Entrada reactor.

Para poder evaluar el efecto de la matriz con respecto a la determinación y cuantificación del estigmasterol en la muestra se hace necesario realizar un cuantificación de las mismas muestras a través de curva de calibración y comparar

los resultados obtenidos, sin embargo, se puede apreciar en los resultados que el estigmasterol a lo largo del tiempo sufre cambios debido a su ruta metabólica aumentando su concentración.

6. DISCUSION

En las últimas dos décadas, la actividad destinada a la producción de celulosa, ha adquirido una creciente importancia socioeconómica y ambiental (Pokhrel and Viraraghavan, 2009). En Chile, y específicamente, en la Región del Biobío, la celulosa Kraft ha impulsado una creciente participación en los mercados globales, generando un importante eje de desarrollo económico (Orrego et al., 2010). A través de los años, esta industria ha desarrollado cambios en el proceso productivo implementando tecnologías de tratamiento secundario para la degradación de la materia orgánica. Para este fin, las tecnologías disponibles, son de tipo biológica aeróbicas (Rosa et al., 2010). Dentro de ellas se puede considerar sistemas de biomasa libre, tales como lagunas aireadas y sistemas de biomasa inmovilizada (MBBR: Movil Bed Biofilm Reactor) (Ferrai et al., 2010). Sin embargo, a pesar de la implementación de este tipo de tecnologías biológicas secundarias, se ha demostrado por un lado, que existe una alta fracción de compuestos aromáticos recalcitrantes y por otro, efectos de alteraciones endocrinas en organismos habitantes en las cercanías a las descargas. Podría ser factible que este tipo de tecnologías no tengan la capacidad de eliminación completa de extractivos de la madera (fitosteroles, entre otros) y por ello, existe la presencia de un potencial endocrino en los efluentes tratados (Orrego et al., 2005; 2010; Meriläinen et al., 2006; Popesku et al., 2010). En este sentido, se conoce que los fitosteroles se encuentran en concentraciones entre 0,37-34 mg/L a pesar de tener un tratamiento secundario biológico (Chamorro et al., 2010). Dentro de los fitosteroles, el estigmasterol es uno de los compuestos que podría tener un alto impacto en los ecosistemas debido a que es capaz de aumentar en más de 300%, posterior a sistemas de tratamientos biológicos aplicados en las industrias de celulosa Kraft. Sin embargo, de estos sistemas MBBR, existe poca evidencia sobre la eliminación y/o degradación de compuestos específicos, tales como estigmasterol. En este sentido, esta tesis se enfocó principalmente en establecer si el sistema de tratamiento secundario basado en biomasa adherida (MBBR) es eficiente en la reducción de materia orgánica y compuestos

específicos, además de la eliminación de compuestos extraíbles, específicamente estigmasterol. Por otro lado, observar el desarrollo y estabilidad del sistema a través de parámetros de la biomasa.

6.1 Caracterización físico química del efluente

La caracterización físico-química del influente de celulosa Kraft se presenta en la Tabla 6, se observa una concentración de materia orgánica de 720,2 mg/L y 313,1 mg/L para DQO y DBO₅ respectivamente, donde la DBO₅ corresponde a compuestos fácilmente biodegradables tales como carbohidratos y ácidos orgánicos (Diez et al., 2002). En general, estos valores coinciden con los obtenidos por otros investigadores con rangos de 540 – 2120 mg/L y 250 – 490 mg/L, para DQO y DBO₅ respectivamente (Villamar et al., 2009; Pozo et al., 2011). En el caso de fenoles totales se registraron concentraciones entre 188,4 – 193,6 mg/L, estos valores se encuentran en rangos inferiores a los presentados por Villamar et al. (2009), y Chamorro et al. (2010), los cuales presentan un rango entre 240 – 720 mg/L.

En términos de biodegradabilidad, se determinó la relación DBO₅/DQO, indicando un valor de 0,43, esto evidencia que el influente de celulosa Kaft no es totalmente biodegradable, indicando una alta presencia de compuestos recalcitrantes. Estos compuestos podrían corresponder a aromáticos de alto peso molecular, tales como lignina y sus derivados (Diez et al., 2002; Villamar et al., 2009). Por otro lado, la determinación de nutrientes, específicamente nitrógeno total (NT) y fósforo total (FT) se observan en concentraciones de 3,30 mg/L y 1,05 mg/L, respectivamente, obteniendo una relación de nutrientes inferior a la relación óptima de DBO₅:N:F 100:5:1, recomendada por Diez et al. (2002), para una óptima eliminación de materia orgánica.

6.2 Sistema MBBR

6.2.1 Parámetros operacionales, eficiencia de eliminación de materia orgánica y compuestos específicos presente en efluente de celulosa Kraft

Los sistemas secundarios implementados en las industrias de celulosa en Chile, han sufrido una evolución desde la década de los 90', con el objetivo de resolver el problema de las grandes extensiones de terreno utilizada por las lagunas aeróbicas y su elevado tiempo de retención hidráulico, los problemas de "bulking" y pérdida de lodo ante cambios bruscos en las características del efluente (pH, temperatura, carga orgánica, entre otros) que son frecuentes en este tipo de efluentes (Chamorro, 2011). Sistemas en base a biopelículas como MBBR, son más compactas que los sistemas de biomasa libre y las eficiencias de tratamiento son menos dependientes de las características de separación del lodo (Ødegaard et al., 2000). La Tabla 8, resume algunas de las características operacionales presente en el sistema MBBR. Durante todo el periodo de operación el tiempo de retención hidráulico se mantuvo alrededor de los 2 días, mientras que la carga orgánica presenta valores de $0,343 \pm 0,001 \text{ KgDQO/m}^3 \cdot \text{d}$, operando bajo las condiciones óptimas de nutrientes 100:5:1. La concentración de oxígeno disuelto (O.D) se mantuvo en el rango $4,97 \pm 0,98 \text{ mgO}_2/\text{L}$, en relación a esto, se ha visto que la concentración efectiva para que existe degradación de materia orgánica en sistemas MBBR corresponde a un promedio superior a los $3 \text{ mgO}_2/\text{L}$ de manera de asegurar la mezcla completa del reactor e intercambio de oxígeno en la biopelícula. Por otro lado, el pH óptimo para el mantenimiento de la mayoría de los microorganismos es en el rango de la neutralidad (Runsten et al., 2006), de acuerdo a esto, los valores presentados en el sistema MBBR corresponde a $7,44 \pm 0,18$. En cuanto al pH de salida, se produjo un aumento llegando a valores de $8,82 \pm 0,39$ en este sentido, Diez et al. (2002), evaluó la eficiencia de eliminación de materia orgánica a diferentes pH (4, 7 y 10) obteniendo una actividad óptima de los microorganismos a pH 7, ya que ante cambios bruscos de pH estos son inhibidos produciendo una pérdida de actividad biológica.

Como se mencionó anteriormente, estos sistemas MBBR, han sido implementados hace aproximadamente dos décadas (Runsten et al., 1999), y la mayoría de los estudios sobre este tipo de tecnología han sido para evaluar la eficiencia asociada a la reducción del tiempo de retención hidráulico, remoción de materia orgánica en base a demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO₅) y nutrientes. Por esta razón, en esta investigación se evalúa además la eficiencia de eliminación de compuestos específicos como lo son el color, lignina y compuestos aromáticos entre otros. La eficiencia en la degradación de materia orgánica, presentada por sistemas MBBR es presentada en la Figura 6. Se observa que estos sistemas son robustos en la eliminación de materia orgánica, presentando valores máximos de eliminación para la DQO de 63,23%, mientras que para la DBO₅ es de 90,55%, estos valores son similares a las encontradas por Villamar et al. (2009). Se evidencia que los sistemas de tratamientos secundarios implementados en Chile, incluyendo MBBR, son eficientes en la degradación de la materia orgánica y conjuntamente con esto, han reducido considerablemente el impacto ambiental agudo de los efluentes de celulosa (Kostamo and Kukkonen, 2003). El porcentaje de eliminación en términos de DQO, presente en sistemas MBBR, son similares a los observados por los sistemas de biomasa libre, en todos estos sistemas se presenta una fracción recalcitrante imposible de eliminar, esto debido principalmente a presencia de ligninas de elevado peso molecular y a compuestos fenólicos clorados de difícil degradación (Diez et al., 2002). En este sentido, compuestos específicos como lignina y color no evidenciaron ninguna reducción importante en sistema MBBR (Tabla 10). La degradación de fenoles alcanzo un máximo valor de 22,8% y esta baja eficiencia de eliminación se relaciona directamente con la del color (18,9%), autores como Milestone et al. (2004), relacionan el aumento de color al efecto de polimerización de compuestos fenólicos de bajo peso molecular generados por los residuos de la lignina. Estos autores demostraron que efluentes de la industria de celulosa Kraft tratados, pueden incrementar su color 45 veces más en sistemas de tratamiento secundario.

6.2.2 Evolución de la Biomasa durante la operación del reactor.

En general, en los procesos biológicos los microorganismos se encuentran mezclados con el agua residual a tratar. Sin embargo, en sistemas MBBR la biomasa es inmovilizada en soportes inertes, permaneciendo estática mientras que el líquido a tratar fluye a través del sistema. Estos procesos presentan varias ventajas como una mayor concentración de biomasa en el reactor, mayor actividad metabólica, mejor resistencia a la toxicidad y mejores características de sedimentabilidad del lodo, entre otras (Cohen 2001). La alta relación superficie-volumen del medio de soporte en estos reactores ofrece la posibilidad de una significativa reducción del volumen del reactor comparado con los sistemas de biomasa suspendida (Homada y Al-Ghuain, 1998). La actividad heterotrófica de la biomasa bacteriana es fundamental para evaluar la biodegradación de en efluentes de celulosa Kraft, la cual puede verse disminuida por condiciones desfavorables y por la presencia de compuestos específicos que podrían causar una inhibición en los sistemas biológicos (Fall et al., 2006). En relación a esto, La respirometría es una herramienta útil para evaluar la actividad heterotrófica de la biomasa, esta se basa en la determinación e interpretación de la velocidad de utilización del oxígeno, y permite conocer la tasa de consumo de sustrato y el rendimiento bacteriano (Pozo, 2011). Mediante la respirometría es posible determinar el oxígeno empleado para respiración endógena, que es el oxígeno empleado por las bacterias exclusivamente para su crecimiento (Fall et al., 2006). La condición del inóculo empleado en el sistema MBBR, se determinó mediante respirometría, estos valores son observados en la Tabla 7, se observa que los valores concuerdan con los presentados por Vidal et al. (2004), refiriendo que en sistemas aeróbicos de tratamientos de efluentes se presentan valores que varían entre 0,07 hasta 0,42 $\text{gO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{d}$. por otro lado el IVL se relaciona a la sedimentabilidad de lodo y su relación a la concentración de SSV en el MBBR en este sentido este parámetro se encuentra en un rango óptimo entre 35 – 135 $\text{mLSS}/\text{gSSV}\cdot\text{h}$, valores superiores a estos, son indicadores de presencia de bacterias filamentosas (Ramalho, 1996). La Figura 7, muestra el IVL, el cual a una

VCO de $0,343 \pm 0,001$ Kg DQO/m³ ·d y TRH 48h muestran características de lodo floculento en un rango de 0,35 – 0,56 gDQO/gSSV y 42 – 60 mL SS/gSSV·h. Por otro lado, la relación F/M indica requerimientos nutricionales de los microorganismos. Esta debe encontrarse en el rango 0,30 – 0,60 gDQO/gSSV (Ramalho., 1996). Los resultados obtenidos (Figura 7) demuestran que la evolución de la biomasa fue óptima. Estudios previos realizados por Villamar et al. (2009), obtuvieron biomasa de características floculentas con VCO de 0,14 KgDBO₅/m³·d, 0,25 KgDBO₅/m³·d y 1,09 KgDBO₅/m³·d y relación de nutrientes 100:5:1 y 100:1:1. por otro lado, Jarpa et al. (2012), obtuvo un lodo de características floculentas a una VCO de 2,36 KgDBO₅/m³·d y 2,99 KgDBO₅/m³·d.

6.3 Evaluación presencia de estigmasterol

Investigaciones realizadas con fitoesteroles, han sido enfocados principalmente con β -sitosterol, debido a esto, existen pocos trabajos realizados con estigmasterol y campesterol entre otros. En general el comportamiento de los compuestos extractivos de la madera está influenciado por las propiedades fisicoquímicas que éstos presentan (Jiang et al., 2005). Los fitosteroles en general son insolubles en agua y altamente lipofílicos ($\log Kow > 9$) es decir, tiene una gran tendencia a unirse a las matrices lipídicas, lo cual les permite bioacumularse (Hewitt et al., 2000) debido a esta principal característica es que la evaluación de estigmasterol se llevo a cabo a través de la técnica analítica de cromatografía de gas con detector de ionización de llama y cuantificada a través del método por Adición estándar, este tiene la ventaja de que sólo se necesita, medir las áreas de los picos de interés. Es un requisito que cada vez se inyecte la misma cantidad de muestra. Los estándares necesarios deben analizarse bajo las mismas condiciones de operación que la muestra.

En este sentido, esta tesis se enfocó en establecer si sistemas de tratamientos secundarios del tipo MBBR eran eficientes en la reducción de compuestos extraíbles, específicamente estigmasterol. En este trabajo se obtuvieron concentraciones de 20,56; 29,15; 51,58 $\mu\text{g/L}$ en el influente de celulosa Kraft. En

este sentido, el estigmasterol estaba presente en los influentes sin tratamiento a una concentración esperada para las industrias que procesan *Pinus radiata* con blanqueo ECF (0,021 hasta 3,4 mg/L) (Strömberg et al., 1996; Cook et al., 1997; Van den Heuvel et al., 2002; Kostamo et al., 2004). Se observa que sistemas en base a Laguna aeróbica son eficientes en la degradación de estigmasterol a la velocidad máxima de carga, por el contrario a bajas velocidades de carga se produce un aumento de este compuesto en un 27-30% respectivamente. Este fenómeno de aumento de concentración de estigmasterol, ha sido mencionado por Cook et al. (1997), donde evidencia que podría incrementarse hasta un 300% en un sistema de L.A. Este aumento y posterior reducción de estigmasterol en estos sistemas biológicos evidencian que la eliminación o degradación de estos compuestos están estrechamente relacionadas con variables operacionales del reactor, tal como el tiempo de retención hidráulico. Por otro lado, Xavier et al. (2009), observa que los fitoesteroles pueden ser removidos del efluente en porcentajes cercanos al 100%, principalmente por la adsorción en lagunas aireadas. Con esto se infiere que el contenido de fitosterol o en este caso específico, estigmasterol en un sistema de tratamiento biológico del tipo MBBR con un TRH de 2d es capaz de remover de forma análoga a L.A el 100% del compuesto, esto queda evidenciado en la presente tesis, debido a que en la salida del reactor no se pudo cuantificar la concentración de estigmasterol por que no fue posible detectar alguna señal en la inyección de las muestras.

Chamorro et al. (2010), realizó un balance de masa con los principales grupos identificados en influente, biomasa y efluente de salida mediante CG-MS. Este fue un punto importante dentro de su investigación, pues otorgó una herramienta para poder inferir cuales serían los compuestos activos dentro del efluente. Este balance mostró la generación de esteroides, fenoles y triterpenos en TRH. De 2 y 0,5 d. Estos resultados sugieren que un sistema MBBR aeróbico no es capaz de degradar compuestos como los esteroides (Kostamo et al., 2004). Esto coincide a lo observado por Gunnerson et al. (2009), quien evidencia mediante análisis

cromatográficos (CG-MS) que MBBR es eficiente en reducir compuestos esteroideos, lo que avala el resultado obtenido en esta investigación, evidenciando la eliminación de estigmasterol en un 100% de la fase líquida del efluente, por lo cual se hace necesario para futuras investigaciones realizar la determinación analítica (CG-FID) a la biopelícula y biomasa de reactor.

Estudios sobre la tecnología MBBR en general, han sido para evaluar la eficiencia asociada a la reducción del tiempo de retención hidráulico, remoción de materia orgánica en base a demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO_5) y nutrientes. Por esta razón, se profundizó el estudio de estos sistemas en cuanto a la caracterización de compuestos específicos, como estigmasterol y su eliminación mediante MBBR.

CONCLUSIONES

Sistema en base a biomasa adherida como MBBR, presentan una eficiencia de reducción de materia orgánica con valores máximos de 63,23% y 90,55% para DQO y DBO₅ respectivamente. Por otro lado, estos sistemas no son eficientes para eliminar completamente compuestos específicos como los que producen color, fenoles totales entre otros.

Compuestos extraíbles de la madera, como estigmasterol, está presente en influentes de celulosa Kraft en una concentración de 20 – 52 µg/L.

Existe total eliminación de estigmasterol en el efluente mediante un sistema de tratamiento del tipo MBBR a un tiempo de retención hidráulica de 2 días y una velocidad de carga orgánica de $0,343 \pm 0,001$ Kg DQO/m³·d.

REFERENCIAS

- American Public Health Association (APHA). (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater, 16 th ed. APHA, WCPF, AWWA, Washington DC. USA (1985).
- ATCP. (2011). Producción de pulpa (2006-2007). Adquirido desde: <http://www.atcp.cl/PDFs/ProdPulpa2006.pdf>.
- Arauco (2010). Manual de manejo vigente.
- Baer, K.N., McCoolle, M.D. and Overturf, M.D. (2009). Modulation of sex ratios in *Daphnia magna* following multigenerational exposure to sewage treatment plant effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1545-1550.
- Belmonte, M., Calderón, M., Chamorro, S. Videla, S. y Vidal G. (2006). Gestión ambiental de la industria de celulosa en Chile. XXX Congreso de la Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS). Punta del Este (Uruguay), 27-30 Noviembre.
- CERTFOR, (2005). Reporte de Auditoria CMPC Celulosa S. A.-SGS Chile-Ltda. www.sgs.cl
- Çeçen, F. (2003). The use of uv-vis measurements in the determination of biological treatability of pulp bleaching effluents. Seventh. international water association symposium on forest industry wastewaters. Seattle (USA), 1-4 June.
- Chang, W., Hua, W. and Qian, Y. (2005). Influence of carrier concentration on the performance and microbial characteristic of a suspend carrier biofilm reactor. *Process Biochemistry*, 40, 2992-3001.

- Chamorro, S., Xavier, C. and Vidal, G. (2005). Behaviour of aromatic compounds contained in the Kraft mill effluents measurements by UV–Vis Biotechnology Progress, 21, 1567–1571.
- Chamorro, S. (2005). Eliminación de fitoesteroles a través de una laguna aireada y evaluación toxicológica mediante *Daphnia magna*. Tesis presentada en la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas para optar al grado de Biólogo, Universidad de Concepción- Chile, 73pp.
- Chamorro, S., Xavier, C. and Vidal, G. (2005). Behavior of aromatic compounds contained in Kraft mill effluents treated by aerated lagoon. Biotechnology Progress, 21, 1567-1571.
- Chamorro, S., Monsalvez, E., Hernández, V., Becerra, J., Mondaca, M., Piña, B. and Vidal, G. (2010). Detection of estrogenic activity from Kraft mill effluents by Yeast Estrogen Screen. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 84(2), 165-169.
- Chen, J.J., McCarty, D., Slack, D. and Rundle, H. (2000). Full scale studies of a simplified aerated filter (BAF) for organics and nitrogen removal. Water Science and Technology, 41(4-5) 1-4.
- Chiang, G., Munkittrick, K., Orrego, R. and Barra, R. (2010). Monitoring of the environmental effects of pulp mill discharges in Chilean Rivers: Lessons learned and challenges. Water Quality Research Journal Canadian, 45(2), TBD-TBD.
- Conceição, E., do Carmo. M. and Bastos, E. (2002). Solid phase extraction applied to chlorinated phenolics present in the effluent from a pulp mill. Journal of Separation Science, 25, 356–360.

- Cook, D.L., LaFleur, L., Parrish, A., Jones, J. and Hoy, D. (1997). Characterization of plant sterols from 22 US pulp and paper mills. *Water Science and Technology*, 35, 297- 303.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z. and Caldwell, D.E. (1995). Microbial Biofilms, *Annual Review of Microbiology*, 49, 711 – 745.
- Davis, W. T. (2000). *Air Pollution Engineering Manual*, Second Edition. Canadá: John Wiley and Sons. 856 pp.
- Diez, M.C., Castillo, G., Aguilar, L., Vidal, G. and Mora, M.L. (2002). Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus radiata* Kraft mill wastewater. *Bioresource Technology*, 83, 131- 138.
- Duplaa, M., Comeaub, Y., Parentc, S., Villemurd, R. and Jolicoeura, M. (2006). Design optimization of a self-cleaning moving-bed bioreactor for seawater denitrification. *Water Research*, 40, 249 – 258.
- Esøy, A., Ødegaard, H., Hagh, M., Risla, F. and Bentzen, G. (1998). Upgrading wastewater plants by the use of biofilm carriers, oxygen addition and pre-treatment in the sewer network. *Water Science and Technology*, 37(9), 159-166.
- Ferrai, M., Guglielmi, G. and Andreottola, G. (2010). Modeling respirometric tests for the assessment of kinetic and stoichiometric parameters on MBBR biofilm for municipal wastewater treatment. *Environmental Modeling & Software*, 25, 626–632.
- Fernández, M., Ikonomu, M. and Buchanan, I. (2007). An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewater. *Science of the Total Environment*, 373, 250-269.
- Field, L., Kortekaas, S. and Lettinga, G. (1989). The tannin theory of methanogenic toxicity. *Biological Waste*, 29, 241–262.

- Freire, R.S., Pelegrine, R., Kubota, L.F. and Duran, N. (2000). Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, 23, 504-511.
- Guang-Guo, Y., Kookana, R.S. and Ru, Y. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environmental International*, 28, 545-551.
- Guzmán, C. y Zambrano, H. (2007). Compuestos disruptores endocrinos y su participación en la programación del eje reproductivo. *Revista de Investigación Clínica*, 59(1), 73-81.
- Hewitt, L. M., Carey, J.H., Dixon, D.G. and Munkittrick K.R. (1996). Examination of bleached Kraft mill effluent fraction for potential inducers of mixed function oxygenase activity in rainbow trout. In: *Environ Fate a Effects of Pulp a Paper Mill Effluent*, M. R., Servos, K. R. Munkittrick, J. H. Carey, G. J. Van der Kraak (Eds.), St Lucie Press, Delray Press, FL., 79-94.
- Hewitt, L.M., Parrot, J.L., Weells, K.L., Calp, M.K., Biddiscombe, S., McMaster, M.E, Munkittrick, K.R. and van der Kraak, G. (2000). Characteristics of ligands for the Ah receptor in hepatic tissues of fish exposed to bleached Kraft mill effluent. *Environmental Science and Technology*, 34, 4327-4334.
- INFOR. (2011). Producción de celulosa 1979-2009. Adquirido desde: http://www.infor.cl/archivos/series_estadisticas/Produccion_y_Consumo/produccion4.pdf
- Jeng, W.L. and Kao, S.J. (2002). Lipids in suspended matter from the human-disturbed Lanyangriver, northeastern Taiwan. *Environmental Geology*, 43, 138-144.

- Jenkins, R., Angus, R., McNatt, H., Howell, W., Kemppainen, J., Kirk, M. and Wilson, E. (2001). Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1325-1331.
- Jiang, J.Q., Yin, Q., Zhou, J.L. and Pearce, P. (2005). Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters. *Chemosphere*. 61, 544–550.
- Khan, Z.M. and Hall, E.R. (2003). Occurrence and removal of plant sterol in pulp and paper mill effluents. *Journal Environmental Engineering and science*, 2, 17-16.
- Kostamo, A. and Kukkonen, J.V. (2003). Removal of acids and sterols from pulp mill effluents by activated treatment. *Water Research*, 37, 2813-2820.
- Kostamo, A., Holmbom, B. and Kukkonen, J.V.K. (2004). Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at Kraft pulp mill and mechanical pulp mills. *Water Research*, 37, 972-982.
- Kukkonen J.V.K., Punta E., Koponen P., Paranko J., Leppänen H., Holopainen I.J. and Hyvärinen H. (1999). Biomarker responses by crucian carp (*Carassius carassius*) living in a pond of secondary treated pulp mill effluent. *Water Science and Technology*, 40, 123- 130.
- LaFleur, L.E., (1996). Sources of pulping and bleaching derived chemical in effluents. In: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, M.R. Servos, K.R. Munkittrick, J.H. Carey, G.J. van der Kraak, (Eds.), St Lucie Press, Delray Press, FL., 21- 31 pp.
- Latorre, A., Rigol, A., Lacorte, S. and Barceló, D. (2003). Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass

spectrometry for the determination of fatty and resin acids in paper mill process water. *Journal Chromatography A*, 991, 205-215.

- Landman, M., Van den Heuvel, M., Finley, M., Bannon, H. and Ling, N. (2006). Combined effects of pulp and paper effluent, dehydroabietic acid, and hypoxia on swimming performance, metabolism, and hematology of rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 314–322.
- Lasa, I., Pozo, J.L., Penadés J.R. and Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos en infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28 (2), 153-298.
- Malmqvist, A., Welander, T. and Olsson, L.E. (2006). Long term experience with the nutrient limited BAS process for treatment of forest industry wastewater. 8° Simposio de IWA en Efluentes de la Industria Forestal, Victoria- Espíritu Santo (Brasil).
- McCarthy, P.J., Kennedy, K.J. and Droste, R.L. (1990). Role of resinic acid in the anaerobic toxicity of chemithermomechanical pulp wastewater. *Water Research*, 24, 1401- 1405.
- Mellanen, P., Petänen, T., Lehtimäke, J., Mäketä, S., Bylund, G., Holmbom, B., Mannila, E., Oikari, A. and Santti, R. (1996). Wood-derived estrogens: Studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 136, 381-388.
- Milestone, C.B. Fulthorpe, R.R. and Tuthridge, T.R. (2004). The formation of color during biological treatment of pulp and paper process. *Water Science and Technology*, 50(3), 87-94.
- Nakada, N., Okayasu, Y., Yasojima, M., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y. and Tanaka, H. (2005). Fate of estrogenic compounds and estrogenic activity in wastewater treatment process. *Technology*, 4, 298-304.

- Odegaard, H., Gisvold, B. and Strickland, J. (2000). The influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process. *Water Science and Technology*, 41, 383-391.
- Oñate, E. (2006). Evaluación de la genotoxicidad de fitoesteroles presentes en efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada. Seminario de título, presentado para optar al grado de Químico Marino. Facultad de Ciencias, de la Universidad Católica de la Santísima Concepción. 87 pp.
- Orrego, R., Moraga, G, Gonzales, M., Gavilán J., Valenzuela, A., Burgos, A. and Barra, R. (2005). Reproductive, physiological and biochemical response in juvenile female rainbow trout exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1935-1943.
- Orrego, R., Burgos, A., Moraga, G., Inzunza, B., Gonzales, M., Valenzuela, A., Barra, R. and Gavilán J. (2006). Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): biomarker responses along a pollution gradient in the Biobío river, Chile. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(9), 2280-2287.
- Orrego, R., Guchardi, J., Krause, R. and Holdway, D. (2010). Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 99, 160–167.
- Plattes, M., Henry, E., Schosseler, P.M. and Weidenhaupt, V. (2006). Modelling and dynamic simulation of a moving bed bioreactor for the treatment of municipal wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 61–68
- Pokhrel, D. and Viraraghavan, T. (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater- a review. *Science Total of Environment*, 333, 37-58.

- Popesku, J., Tan, E., Martel, P., Kovacs, G., Rowan-Carroll, A., Williams, A., Yauk, C. and Trudeau, V. (2010). Gene expression profiling of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) neuroendocrine brain in response to pulp and paper mill effluents. *Aquatic toxicology*, 99(3), 379-388.
- Pozo, G. (2010). Optimización de la operación de un reactor aerobico de biopelícula bacteriana inmovilizada: incidencia de los nutrientes en la biosíntesis de polihidroxialcanoato (PHA) como producto del tratamiento de efluentes de celulosa Kraft. Tesis presentada para optar al grado de Magister en. Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad de Concepción 84 pp.
- Raj, C.B.C and Quen, H.L. (2005). Advanced oxidation process for wastewater treatment: Optimization of UV/H₂O₂ process through statistical technique. *Chemical Engineering Science*, 60, 5305-5311.
- Ramalho (1996). Introduction to wastewater treatment process ed. Academic press.
- Rosa, R., Moreira-Santos, M., Lopes, I., Silva, L., Rebola, J., Mendonça, E., Picado, A. and Ribeiro, R. (2010). Comparison of a test battery for assessing the toxicity of a bleached-Kraft pulp mill effluent before and after secondary treatment implementation. *Environmental Monitoring and Assessment*, 161(1-4), 439-451.
- Rusten, B. and Neu, K. (1999). Moving-bed biofilm reactor move into the small-flow treatment arena. *Water Environment and Technology*, 67(1), 125-132.
- Rusten, B. (2006). Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacultural engineering*, 34, 322-331.

- Sjoström E. (1993). Extractives. In: Wood Chemistry, fundamentals and applications. Second edition, Academic Press. 92-107 pp.
- Stehmann, A., Meesters, R. J. W. and Schröder, F. (2004). Mass spectrometric analytical methods for the determination of endocrine disrupting chemicals (EDCs). *Water Science and Technology*, 50(5), 165–171.
- Strömberg, L., Mörck, R., de Souza, F. and Dahlman, O. (1996). Effects of internal process changes and external treatment on effluent chemistry. In: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, M. R. Servos, K. R. Munkittrick, J. H. Carey, G. J. Van der Kraak, (Eds.), St Lucie Press, Delray Press, FL, 3-19 pp.
- Ternes, T.A., Andersen, H. and Gilbert, D. (2001). Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, 74(14), 3498-3504.
- Thompson, G., Swain, J. K. and Forster, M. (2001). The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Technology*, 77, 275-286.
- Van den Heuvel, M.R., Ellis, R J., Tremblay, L.A. and Stuthridge, T.R. (2002). Exposure of reproductive maturing rainbow trout to a New Zealand pulp and paper mill effluent. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 51, 65-75.
- Venegas, V. (2003). Estudio sobre mecanismos de financiamiento para un manejo forestal sostenible en América del Sur, Fase I – Cono sur, adquirido desde: <http://www.fao.org/forestry/120040b3496daa1af45a847ec59cc3ea4f415c.pdf>. 42 pp.

- Vidal, G. (1999). Revisión bibliográfica sobre los compuestos orgánicos producidos en la industria de la pasta y el papel: Incidencia en la toxicidad y biodegradabilidad anaerobia de sus efluentes. *Afinidad*, 481, 152,159
- Vidal, G., Videla, S. and Diez, M.C. (2001). Molecular weight distribution of *Pinus radiata* Kraft mill wastewater treated by anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 77, 183– 191.
- Vidal, G., Belmonte, M., Calderón, M. y Chamorro, S. (2007). Significativos avances ambientales registra en Chile la industria de celulosa Kraft blanqueada. *Induambiente*, 15(87), 6-30.
- Videla, S., Navarrete, P. and Vidal, G. (2003). Environmental issue of the Chilean forest industry. In: Conference Proceedings- 7th International Water Association Symposium on Forest Industry Wastewaters, Seattle-Washington, PL 20.
- Vignate, P. y Martínez R.I. (2006). *Tecnología de la madera*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 678 pp.
- Villamar, C., Jarpa, M., Decap, J. and Vidal, G. (2009). Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of Kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globules* as raw material. *Water Science and Technology*, 59(3), 507-514.
- Winkler, M. (1995). *Tratamiento biológico de aguas de desecho*. Cuarta Edición. Editorial Limusa, México DC, México. pp: 325.
- Xavier, C., Chamorro, S. and Vidal, G. (2005). Chronic effects of Kraft mill effluents and endocrine active chemicals on *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75, 670–676.
- Xavier, C. (2006). Influencia de la tecnología de tratamiento en la eliminación de fitoesteroles contenidos en efluentes de celulosa Kraft y en

la toxicidad de estos compuestos en organismos acuáticos, y de genotoxicidad en organismos bacterianos. Tesis doctoral, Universidad de Concepción, Centro EULA-CHILE, 165 pp.

- Xavier, C.R., Mosquera-Corral, A., Becerra, J., Hernandez, V. and G. Vidal. (2009). Activated sludge versus aerated lagoon treatment of Kraft mill effluents containing β -sitosterol and stigmasterol. *Journal of Environmental Science and Health part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 44(4) 327-335.
- Zambrano, M., Parodi, V., Baeza, J. and Vidal, G. (2007). Acid Soils' pH and Nutrient Improvement when Amended with Inorganic Solid Wastes from Kraft Mill. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 52(2): 1088–1091.
- Zambrano, M., Freer, J., Baeza, J., Villarroel, M. and Vidal, G. (2007). Using a second-order polynomial model to determine the optimum dregs/bark ratop for industrial-biosolid composting: the initial conditioning stage, *Waste Management & Research*, 25: 319 – 326.
- Zaror, C. (2002). *Introducción a la Ingeniería Ambiental para la industria de procesos*. Concepción: Universidad de Concepción. 613 pp.

