



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION  
Facultad de Ciencias Ambientales



# Evaluación de la toxicidad de efluentes de celulosa kraft expuestos a derrames de licor negro

**LAURA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**  
Ingeniería Química

Tutor: Dra. Gladys Vidal Sáez

Concepción, 10 de Abril 2015

**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.**  
**Directora Tesis**  
**Facultad de Ciencias Ambientales**  
**Centro EULA-CHILE**  
**Universidad de Concepción**

-----  
**Dra. Ana Carolina Baeza**  
**Jefe Carrera Ing. Ambiental**  
**Facultad de Ciencias Ambientales**  
**Centro EULA-CHILE**  
**Universidad de Concepción**

-----  
**Dra. Patricia González**  
**Facultad de Ciencias Ambientales**  
**Centro EULA-CHILE**  
**Universidad de Concepción**  
-----

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis agradecimientos a quienes permitieron y facilitaron el desarrollo de esta Tesis. A la Dra. Gladys Vidal, por su confianza, orientación y motivación constante, tanto en el ámbito profesional como personal. A todos los miembros del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental (GIBA), por su disposición y cariño, en especial a la Dra. Soledad Chamorro, por su paciencia y dulzura, y potencial indiscutible. Al equipo del Laboratorio de Bioensayos del Centro de Ciencias Ambientales EULA-CHILE, por su cooperación y amabilidad.

A la Universidad de Concepción (Chile) y a la Universidad de Valladolid (España), y a todos aquellos colaboradores, que han permitido la realización de un intercambio tan enriquecedor como este.

A mis padres y hermano, por su amor incondicional.

A mi compañera de aventuras, mi amiga Laura López; y personas importantes de mi vida, gracias a todos ellos.

## **INDICE**

<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Antecedentes generales</b>	<b>14</b>
<b>1.2 La industria de celulosa</b>	<b>15</b>
1.2.1 Proceso productivo de la industria de celulosa kraft	16
1.2.2 Residuos líquidos de la industria de celulosa kraft	18
1.2.3 Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa kraft	21
<b>1.3 Sistema de lodos activados</b>	<b>23</b>
1.3.1 Parámetros operacionales	24
1.3.2 Microbiología del lodo activado	27
1.3.3 Ingreso de tóxicos a un sistema de lodos activados	30
<b>1.4 Toxicidad en efluentes de celulosa</b>	<b>32</b>
1.4.1 Técnicas para la evaluación de la toxicidad en efluentes de celulosa	35
<b>2. HIPOTESIS</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo general	37
3.2 Objetivos específicos	37
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Influyente</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Sistema de lodos activados</b>	<b>38</b>
4.2.1 Inóculo	38
4.2.2 Reactor	38
4.2.3 Operación	39
<b>4.3 Técnicas analíticas</b>	<b>41</b>
4.3.1 Parámetros fisicoquímicos	41
4.3.2 Determinación de IVL	42
4.3.3 Determinación de la actividad heterótrofa de la biomasa	42
4.3.4 Observación microscópica de la biomasa	43

<b>4.4 Determinación de la toxicidad</b>	<b>43</b>
4.4.1 Bioensayo con <i>Daphnia magna</i>	43
4.4.2 Ensayo de mutagenicidad: Test de Ames	46
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Caracterización fisicoquímica del influente</b>	<b>47</b>
<b>5.2 Caracterización del inóculo</b>	<b>50</b>
<b>5.3 Operación del sistema de lodos activados</b>	<b>50</b>
<b>5.4 Eficiencias de eliminación de materia orgánica, color y compuestos específicos.</b>	<b>55</b>
<b>5.5 Evolución del IVL</b>	<b>58</b>
<b>5.6 Evolución de la actividad heterótrofa de la biomasa</b>	<b>59</b>
<b>5.7 Microbiología del lodo</b>	<b>62</b>
<b>5.8 Toxicidad</b>	<b>64</b>
5.8.1 Bioensayo con <i>Daphnia magna</i>	64
5.8.2 Ensayo de mutagenicidad: Test de Ames	68
<b>6. DISCUSION</b>	<b>72</b>
<b>6.1 Influyente de celulosa e inóculo: Parámetros fisicoquímicos</b>	<b>72</b>
<b>6.2 Performance del reactor</b>	<b>74</b>
<b>6.3 Evolución de la actividad de la biomasa</b>	<b>75</b>
<b>6.4 Microbiología del lodo</b>	<b>77</b>
<b>6.5 Bioensayos de toxicidad con <i>Daphnia magna</i></b>	<b>79</b>
<b>6.6 Test de mutagenicidad: Test de Ames</b>	<b>82</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>85</b>
<b>LINKOGRAFIA</b>	<b>98</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>99</b>
ANEXO I. Deformaciones del organismo de ensayo <i>Daphnia magna</i> , para cada shock tóxico.	<b>99</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso productivo industria de celulosa kraft	18
<b>Figura 2.</b> Sistema convencional de lodos activados	23
<b>Figura 3.</b> Red trófica formada por los microorganismos del ecosistema del proceso de lodos activados	29
<b>Figura 4.</b> Reactor de lodos activados	39
<b>Figura 5.</b> Determinación experimental de IVL	42
<b>Figura 6.</b> <i>Daphnia magna</i>	44
<b>Figura 7.</b> Cultivos de <i>Daphnia magna</i> del Laboratorio de Bioensayos del Centro de Ciencias Ambientales EULA-CHILE y del Laboratorio de Ficología, Universidad de Concepción, utilizados en los ensayos.	44
<b>Figura 8.</b> Ensayo de toxicidad aguda 48h con <i>Daphnia magna</i> a diferentes grados de dilución para S4.	45
<b>Figura 9.</b> Componentes del Muta-ChromoPlate kit y reactivos, y placa de control de esterilidad o blanco.	46
<b>Figura 10.</b> Variación de DQO y CE en los shocks aplicados	49
<b>Figura 11.</b> Evolución de la VCO en el reactor	51
<b>Figura 12.</b> Evolución de la Temperatura (T) y Oxígeno Disuelto (OD) en el reactor	52
<b>Figura 13.</b> Evolución del pH en influente y efluente	53
<b>Figura 14.</b> Concentración de SST y SSV en el reactor	54
<b>Figura 15.</b> Evolución de las eficiencias de eliminación de DQO y DBO <sub>5</sub> en el reactor	55

- Figura 16.** Eficiencia de eliminación de color (●), lignina (UV 280 nm) (○), lignina (UV 272 nm) (▼), ácidos lignosulfónicos (△), compuestos aromáticos (■) y fenoles totales (□) en el reactor. 57
- Figura 17.** Relación entre IVL y relación A/M 58
- Figura 18.** Evolución de la actividad heterótrofa de la biomasa en el reactor 60
- Figura 19.** Evolución de la actividad heterótrofa en el reactor durante shocks tóxicos, S1 (●), S2 (○), S3 (▼), y S4 (△). 61
- Figura 20.** Microorganismos observados en el reactor en condición de operación normal. A: Flóculo; B, C y E: Ciliados fijos; D: Rotífero; F: Flagelado; G: Ciliado móvil; H e I: Ciliados suctores. 62
- Figura 21.** Alteraciones del sistema observadas durante Shock 4. J: Estructura externa de amebas, sin organismo; K: Ciliado fijo sin pedúnculo (lodo poco compacto); L y M: Acumulación de alimento en ciliados fijos. 63
- Figura 22.** Placas test mutagenicidad. A: Blanco (control de esterilidad); B: Background (indicativo de la tasa de mutación inversa natural); C: Control positivo (con material mutagénico estándar incluido en el kit). 68
- Figura 23.** Placas correspondientes a S1 24 horas, S1 48 horas, S2 24 horas, S2 48 horas, S3 24 horas, S3 48 horas, S4 24 horas, S4 48 horas. 69
- Figura 24.** Evaluación de la inducción de mutación en el tiempo. Blanco (●); Background (○), Control positivo (▼), S1 24h (△), S1 48h (■), S2 24h (□), S2 48h (◆), S3 24h (◇), S3 48h (▲), S4 24h (▽) y S4 48h (-●-). 71

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Constituyentes de la madera en <i>E. globulus</i> y <i>P. Radiata</i>	16
<b>Tabla 2.</b> Composición del licor negro	20
<b>Tabla 3.</b> Características del licor negro	21
<b>Tabla 4.</b> Caracterización efluente secundario celulosa kraft	22
<b>Tabla 5.</b> Efectos observados a partir de shocks tóxicos aplicados a sistemas de tratamiento biológico aeróbico	31
<b>Tabla 6.</b> Alteraciones observadas sobre diferentes especies por la exposición de efluentes o compuestos específicos de la industria de celulosa kraft	34
<b>Tabla 7.</b> Características de los shocks tóxicos aplicados	40
<b>Tabla 8.</b> Caracterización fisicoquímica del influente	47
<b>Tabla 9.</b> Caracterización del influente utilizado en la condición de shock tóxico	48
<b>Tabla 10.</b> Caracterización del inóculo	50
<b>Tabla 11.</b> Resultados del ensayo de toxicidad con <i>Daphnia magna</i> en términos de LC <sub>50</sub> y porcentaje de deformidad	66
<b>Tabla 12.</b> Longitud total del cuerpo, abdomen y relación de tasa alométrica en <i>Daphnia magna</i>	67
<b>Tabla 13.</b> Resultados ensayos Muta-ChromoPlate	70

## NOMENCLATURA

<b>A/M</b>	Razón Alimento – Microorganismos	$\text{gDBO}_5/\text{gSSV}\cdot\text{d}$
<b>CE</b>	Conductividad Eléctrica	$\mu\text{S}$
<b>DBO<sub>5</sub></b>	Demanda Biológica de Oxígeno	$\text{mg/L}$
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxígeno	$\text{mg/L}$
<b>IVL</b>	Índice Volumétrico del Lodo	$\text{mg/L}$
<b>NT</b>	Nitrógeno Total	$\text{mg/L}$
<b>PT</b>	Fósforo Total	$\text{mg/L}$
<b>OD</b>	Oxígeno Disuelto	$\text{mg/L}$
<b>SST</b>	Sólidos Suspendidos Totales	$\text{g/L}$
<b>SSV</b>	Sólidos Suspendidos Volátiles	$\text{g/L}$
<b>SSVLM</b>	Sólidos Suspendidos Volátiles del Licor de Mezcla	$\text{g/L}$
<b>TRH</b>	Tiempo de Retención Hidráulico	$\text{d}$
<b>VCO</b>	Velocidad de Carga Orgánica	$(\text{kgDQO}/\text{m}^3\cdot\text{d})/$ $(\text{kgDBO}_5/\text{m}^3\cdot\text{d})$
<b>VUO</b>	Velocidad de Utilización de Oxígeno	$\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$

## RESUMEN

La industria de celulosa kraft se considera un importante colaborador de descargas de contaminantes, que provocan impactos adversos en los ecosistemas acuáticos receptores. Sus efluentes se caracterizan por tener materia orgánica, y ser de carácter mutagénico, genotóxico, e incluso citotóxico. Se han implementado tecnologías de tratamientos secundarios de tipo biológico aerobio para la degradación de la materia orgánica y eliminación del color presente en estos efluentes, siendo los sistemas de lodos activados una de las técnicas más utilizadas. Los parámetros físicoquímicos, tales como demanda química de oxígeno, velocidad de carga orgánica y temperatura, entre otros, no permiten identificar si el potencial toxicológico es remediado después de los tratamientos. Por ello, se deben combinar con ensayos de toxicidad sobre organismos vivos.

El objetivo de este estudio fue determinar la toxicidad de un efluente de celulosa kraft tratado con un sistema de lodos activados, en condición de operación normal y de shock tóxico, mediante el ingreso en el sistema de diferentes concentraciones de licor negro (2, 4, 10 y 30 mL licor/L efluente) proveniente del proceso productivo.

Se obtuvo una eficiencia de eliminación de materia orgánica para la condición normal de 56%, que disminuyó de 65 a 20% desde la aplicación del shock 1 al 4, resultado evidenciado por un descenso en la actividad heterótrofa de la biomasa tras la aplicación de cada shock. No obstante, se observó una recuperación del sistema tras shock 4, manifestando cierta capacidad de adaptación de las bacterias del sistema.

Se evaluó la toxicidad letal ( $LC_{50}$ ) y subletal (deformidad en el organismo) mediante *D. magna*, expuesta a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5 y 6,25% para cada shock. Los resultados evidencian que el efluente no presenta toxicidad aguda ( $LC_{50}$ ), en ninguno de los shocks tóxicos, sin embargo, presenta alteraciones principalmente en el rostrum y espina caudal. Shock 1 evidencia un 10 % de deformidad en la espina caudal para el 50 y 100% y un 20% sobre el rostrum para el 50%. Shock 2, presenta un 20 % de deformidad en espina caudal a 25 y 50%. Shock 3 sólo evidencia alteraciones al 25% con 20% espina caudal y 30% rostrum, y shock 4 presenta alteraciones en todas las concentraciones con un 30% en la espina caudal en 12,5, 25, 50, 100% y

20% de deformidad en el rostrum al 50%. Además se evaluó el potencial mutagénico a través del Muta-ChromoPlate kit, basado en el test de Ames. Se evidencia mutagenicidad con un 99,9% de significancia en los efluentes con menor concentración de licor negro (2 y 4 mL licor/L efluente), y citotoxicidad para las concentraciones más elevadas (10 y 30 mL/L efluente).

Se comprueba así, que los sistemas de tratamientos secundarios convencionales no logran eliminar el potencial mutagénico generado en el proceso de la celulosa, pero sí una disminución considerable de la carga orgánica presente.

## ABSTRACT

Bleached kraft pulp industry is considered a major contributor to discharges of pollutants that cause negative impacts to aquatic ecosystems receptors. Kraft pulp mills are characterized by a high load of organic matter, potentially mutagenic, genotoxic, and even cytotoxic. Secondary biological wastewater treatment technologies have been implemented, such as aerobic activated sludge systems to degrading organic matter and removing its color. Physicochemical parameters, including as chemical oxygen demand, specific oxygen uptake rate and temperature, among others, do not identify whether the toxicological potential is solved after treatments. Therefore, it should be combined with toxicity tests on organisms.

The present study evaluates kraft pulp mill effluent toxicity, treated with activated sludge system in normal operation and toxic condition, by different black liquor concentrations into the system (2, 4, 10 and 30 mL liquor/L effluent) from the production process.

Removal efficiency of organic matter for the normal condition was 56%, which decreased by 65-20% since the implementation of shock 1 to 4, a result evidenced by a drop in the heterotrophic biomass activity after applying each shock. However, a system recovery was observed following shock 4, showing up from the bacteria some ability to adapt in there.

Lethal toxicity (LC<sub>50</sub>) and sublethal toxicity (body deformities) by *D. magna*, exposed to concentrations of 100, 50, 25, 12.5 and 6.25% for each shock, was evaluated. The results indicate that the effluent has no acute toxicity (LC<sub>50</sub>), none of the toxic shocks; however, presents disturbances mainly in the rostrum and apical spine. Shock 1 evidence 10% apical spine deformity at 50 and 100% and 20% rostrum deformity at 50%. Shock 2 presents a 20% apical spine deformity at 25 and 50%. Shock 3 only evidence alterations at 25% with 20% apical spine anomalies and 30% rostrum, and shock 4 shows changes in all concentrations with 30% apical spine at 12.5, 25, 50, 100% and 20% rostrum deformity at 50%. Mutagenic potential was evaluated by Muta-ChromoPlate kit, based on the Ames test. 99.9% mutagenicity level was evidenced in the effluents with lower concentration of black liquor (2 and 4 mL liquor/ L effluent), and cytotoxicity effects to higher ones (10 and 30 mL liquor/ L effluent).

It is verified that conventional secondary treatment systems do not remove the mutagenic potential generated in the kraft pulp process, although a significant decrease of this organic load is proved.

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1 Antecedentes generales**

La eliminación de aguas residuales no tratadas proveniente de los procesos industriales puede producir impactos ambientales negativos en los cursos de agua receptores, en función de los contaminantes que dichos efluentes contengan (Thompson *et al.*, 2001). Alteraciones en determinados parámetros, tales como sólidos suspendidos, materia orgánica, temperatura y nutrientes, son un claro indicativo de contaminación (Chamorro *et al.*, 2013).

Existe una gran variedad de opciones tecnológicas para tratar las aguas residuales, que pueden involucrar tratamientos físicos, químicos o biológicos. El tipo de tratamiento y gestión de los residuos depende, entre otros factores, de las características y peligrosidad de los mismos, así como la posibilidad de recuperación, de reutilización o de reciclado (Belmonte *et al.*, 2006). Actualmente, una de las tecnologías más utilizadas para el tratamiento de residuos líquidos son los procesos biológicos aeróbicos. Entre ellos, destacan los sistemas de lodos activados (WEF, 2008), basados en la oxidación de la materia orgánica por parte de los microorganismos (Ramalho, 1996).

La industria de la celulosa es considerada como un gran consumidor de recursos naturales (madera y agua) y energía, siendo un colaborador significativo de descargas de contaminantes que provocan impactos adversos en los ecosistemas acuáticos (Latorre *et al.*, 2005). Estos impactos son complejos debido a la acción combinada de: 1) aspectos físicos como el olor, color o la turbidez; 2) sustancias tóxicas potenciales, ya sean procedentes de la madera (ácidos resínicos, ácidos grasos, lignina y sus derivados, esteroides entre otros) o generados en el proceso, compuestos clorados, compuestos de azufrados, y 3) la eutrofización, provocada por niveles de nutrientes tales como fósforo y nitrógeno.

Estos efluentes se caracterizan por un alto contenido en compuestos orgánicos tóxicos e incluso inhibitorios, algunos de ellos con carácter mutagénico y genotóxico, e incluso citotóxico (Costa *et al.*, 2008). El análisis de estas mezclas incluye técnicas cuali-cuantitativas para conocer su composición, así como estudios en organismos modelo para establecer su toxicidad, resultando

necesario el estudio de la dinámica de los contaminantes en los sistemas biológicos (Belmonte *et al.*, 2006).

## **1.2 La industria de celulosa**

La industria de celulosa es en la actualidad, uno de los sectores industriales más importantes en el mundo, debido principalmente al crecimiento sostenido de la demanda de papel, producto del cual es materia prima (Altesor, 2008). De las 13 millones de hectáreas de plantaciones forestales que existen en el mundo para abastecer la producción de celulosa, el 80% se encuentra en América del Sur y Asia, y está previsto que aumenten hasta 17,3 millones de hectáreas en 2020 (FAO, 2007). Anualmente se transan en el mundo aproximadamente 48 millones de toneladas métricas de celulosa, en el que Chile tiene una participación del 6%, siendo el cuarto mayor exportador, después de Brasil, Canadá y Estados Unidos (Arauco, 2013).

La industria de celulosa en Chile es la base del sector forestal, que se ha consolidado como uno de los pilares fundamentales del crecimiento económico del país y como motor de las exportaciones nacionales, abarcando un 35% del total de productos forestales (ATCP, 2012). Según reportes de Resource Information Systems Inc. (RISI), la producción mundial de celulosa en 2013 totalizó cerca de 179 millones de toneladas métricas, estableciendo a Chile en la décima posición, con el 3,1%. Gracias a las condiciones favorables que ofrece el mercado internacional y las ventajas competitivas que el país presenta, la producción de celulosa por parte de la industria chilena se ha duplicado entre el año 2000 y 2013, como producto de continuas y cuantiosas inversiones en nuevas plantas y ampliaciones de capacidad industrial (Chiang *et al.*, 2010).

Actualmente, Chile se encuentra en condiciones de producir casi 6 millones de toneladas de celulosa al año. La Compañía Manufacturera de Papeles y Cartones (CMPC S.A.) controla casi 3 millones de toneladas, seguida muy de cerca por Empresas Arauco y Constitución S.A., con 2,87 millones de toneladas (Arauco, 2013; CMPC, 2014). Las principales especies utilizadas como materia prima, *Pinus radiata* y *Eucaliptus globulus*, han logrado una buena adaptación a las condiciones de clima y suelo (Luraschi, 2007), estableciendo la zona centro sur del país como punto de concentración de esta industria.

### 1.2.1 Proceso productivo de la industria de celulosa kraft

El proceso kraft es el más utilizado para la elaboración de celulosa (Bierman, 1996; Pokhrel and Viraraghavan, 2004). Se basa en la separación de las fibras de celulosa de los demás componentes de la madera, principalmente de la lignina y hemicelulosas, a través de la utilización de sulfuro (Chamorro *et al.*, 2005).

La variabilidad entre *Pinus radiata* (celulosa blanqueada de fibra larga; BSKP) y *Eucalyptus globulus* (celulosa blanqueada de fibra corta; BEKP) (Luraschi, 2007), no sólo se debe a las diferencias morfológicas sino también a su composición química. La Tabla 1, muestra los componentes de la madera constituida principalmente de celulosa, hemicelulosa, lignina y compuestos extractivos de la madera, entre los que se encuentran ácidos grasos, ácidos resínicos y fitoesteroles, entre otros (LaFleur, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 2010; Del Río *et al.*, 2000). Estos compuestos son importantes debido a las propiedades físico-químicas que presentan, siendo responsables del color, olor y protección de la madera (Diez *et al.*, 2002). Se ha determinado que *P. radiata*, presenta un mayor porcentaje de extractivos de la madera (0,5 – 7,0%), en comparación a *E. globulus* (0,2 – 3,2%) (Lafleur, 1996).

**Tabla 1.** Constituyentes de la madera en *E. globulus* y *P. radiata*.

<b>Constituyente madera</b>	<b><i>Eucalyptus globulus</i> (%)</b>	<b><i>Pinus radiata</i> (%)</b>	<b>Referencia</b>
Celulosa	43,0-50,0	42,0-46,0	1-2
Hemicelulosa	25	35	1-2
Lignina	25,0-31,0	17,0-26,0	1-2
Compuestos extractivos	0,2-3,2	0,5-7,0	
Ácidos grasos	14,0-27,7*	4,0*	3-4
Ácidos resínicos	N.D.	8,9*	3-4
Ceras	2,8-5,8*	1,6*	3-4
Triglicéridos	6,7-13,2*	7,3*	3-4
Fitoesteroles	1,2*	32-51,7*	3-4

\*: mg/100 g madera; (1) LaFleur (1996); (2) Rosa *et al.* (2010); (3) Gutiérrez *et al.* (1998); (4) Del Río *et al.* (2000).

La industria de celulosa kraft blanqueada, basa su producción en dos principales procesos, pulpaje y blanqueo. Se inicia, tal y como se observa en la Figura 1, con una etapa previa de preparación de la madera, en la que ésta es descortezada y reducida a astillas (Arauco, 2013).

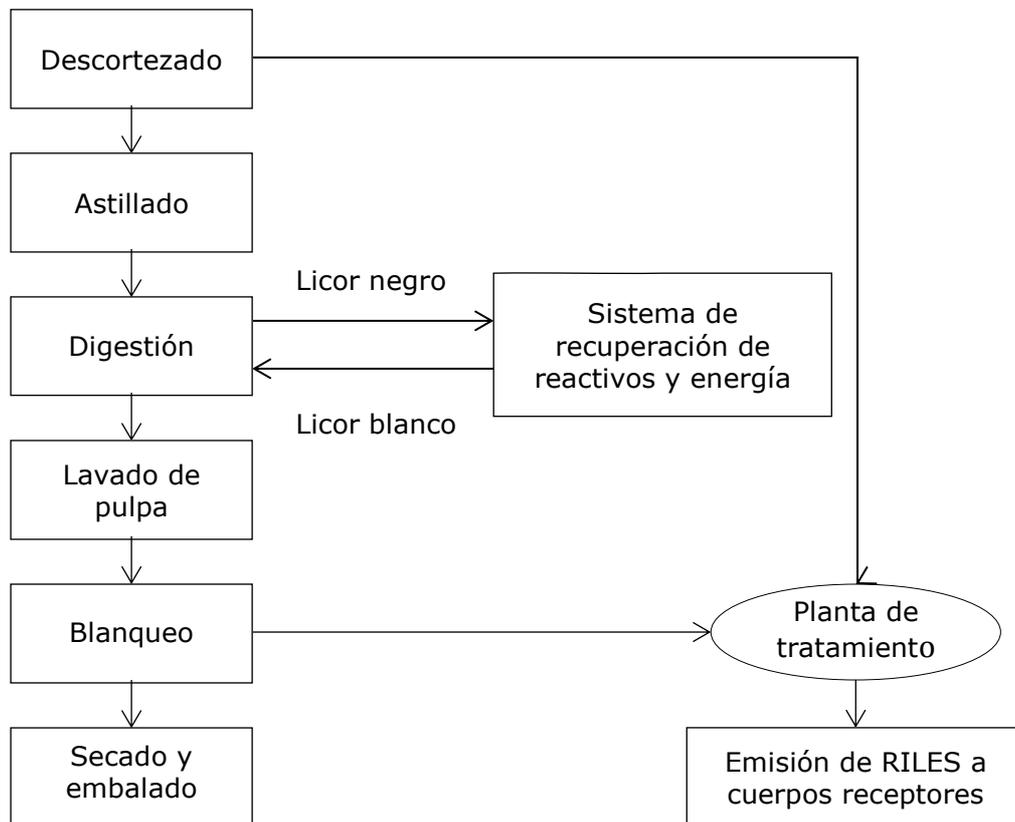
En la etapa de pulpaje o digestión, las astillas ingresan a un digestor continuo en el que son sometidas a cocción con licor blanco, compuesto por hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na<sub>2</sub>S), a un pH mayor a 12, bajo temperaturas controladas entre 160-180 °C, y presión, por un período entre 0,5-3 horas, lo que permite disolver la mayor parte de la lignina de las fibras de la madera (Bierman, 1996).

El licor blanco con la lignina disuelta, se convierte en una solución acuosa residual muy compleja, compuesta de material orgánico y reactivos sobrantes, conocida como licor negro. Este último, se concentra en una caldera recuperadora para ser procesado en el sistema de recuperación de productos químicos y energía (Oñate, 2006), generándose licor verde (sulfuro de sodio y carbonato de sodio) (Bajpai, 2013). El licor verde obtenido, es llevado a un proceso de caustificación, donde se recupera licor blanco, que es devuelto al proceso de digestión (Zaror, 2002).

Las fibras resultantes del proceso de digestión, son lavadas y filtradas denominándose celulosa cruda, ya que aún contiene lignina residual y taninos polimerizados, responsables de su coloración marrón. Es por ello que se requiere una etapa final de blanqueo (Gutiérrez *et al.*, 2006).

La etapa de blanqueo convencionalmente se realizaba con cloro elemental (Cl<sub>2</sub>). Sin embargo, investigaciones científicas evidenciaron la generación de compuestos organoclorados (Absorbable Organic Halogens; AOX) presentes en sus efluentes líquidos. Actualmente, se utilizan procesos libres de cloro total (TCF) o libres de cloro elemental (ECF), mediante secuencia de blanqueo en base a dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) como agente oxidante, en varias etapas sucesivas, que incluye etapas de extracción y lavados intermedios (Bajpai, 2013). Estos cambios han significado una reducción importante de componentes clorados (más de un 90% en relación con el proceso antiguo) (Odendahl *et al.*, 1990), los cuales han sido tradicionalmente considerados responsables del mayor porcentaje de toxicidad aguda de los efluentes (Campos, 2004).

La pulpa ya blanqueada contiene un alto contenido en agua (entre 98 y 99%), y es necesaria su eliminación por gravedad y vacío, formando una lámina continua uniforme, que se seca con aire caliente, se dimensiona y embala para su transporte y comercialización (Arauco, 2013).



**Figura 1.** Proceso productivo industria de celulosa kraft. RILES: Residuos Industriales Líquidos. Fuente: Adaptado de Luraschi (2007).

### 1.2.2 Residuos líquidos de la industria de celulosa kraft

La industria de celulosa kraft, debido a las características de su proceso productivo, hace un uso intensivo del agua, ocupando el tercer lugar a nivel mundial en cuanto a la extracción de agua dulce, por detrás de la minería y la industria química (Bajpai, 2013). Lo anterior, se evidencia en los elevados volúmenes de descarga de efluentes que posee, con un valor promedio de 45 m<sup>3</sup> por tonelada de producto elaborado, llegando incluso a alcanzar los 60 m<sup>3</sup> (Thompson *et al.*, 2001).

Esta industria ha sido durante años considerada como una de las principales fuentes de contaminación del medio ambiente, debido a su toxicidad atribuida principalmente a la fracción de compuestos extraíbles (Kovacs *et al.*, 1992), carga orgánica, sólidos en suspensión y color (Ali and Sreekrishnan, 2001). Debido a la composición de las maderas utilizadas como materia prima, los efluentes de la industria de celulosa Kraft son mezclas extremadamente complejas, con sustancias de alto y bajo peso molecular (Vidal *et al.*, 2001), encontrándose una variedad de contaminantes que en algunos casos son difíciles de detectar, caracterizar y por tanto, clasificar.

Durante el proceso de lavado, blanqueo y deslignificación, compuestos organoclorados (AOX), componentes de la madera, principalmente la lignina y derivados, ácidos resínicos y fitoesteroides, entre otros, quedan disueltos en el efluente (Belmonte *et al.*, 2006). Como resultado, el efluente de este proceso es de tonalidad marrón oscura, color derivado de los compuestos poliméricos cromóforos de la lignina (Bajpai, 2013).

Existen fuentes de emisión no habituales, como son derrames de componentes líquidos de la fase de digestión (Luraschi, 2007). Tal es el caso del licor negro, que es generado como agua residual, con aproximadamente 7 toneladas de licor negro por tonelada de pulpa producida. Contiene, tal y como se muestra en la Tabla 2, elementos del licor blanco utilizado en la cocción y la lignina disuelta, junto a otras sustancias propias de la madera que incluyen, ácidos carboxílicos, hemicelulosas (especialmente xilanos), metanol, entre otros componentes que le otorgan la característica de tóxico (Bierman, 1996).

**Tabla 2.** Composición del licor negro.

<b>Componentes</b>	<b>Peso seco (%)</b>
<b>Órganicos</b>	
Lignina	38
Ácidos sacarínicos (hemicelulosas)	23
Ácidos alifáticos (lignina y carbohidratos)	14
Ácidos grasos y resínicos (extractivos)	0,5
Polisacáridos (celulosa y hemicelulosas)	3,0
Total	79
<b>Inorgánicos</b>	
NaOH	2,4
NaHS	3,6
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> y K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	9,2
NaSO <sub>4</sub>	4,8
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O y Na <sub>2</sub> S	0,5
NaCl	0,5
Total	22

Fuente: Knowpulp. (2014).

Ha sido documentada la existencia de derrames de licor negro en plantas de celulosa que han llegado al sistema de tratamiento de efluentes y, considerando que las características de este residuo líquido, tal y como se indica en la Tabla 3, son distintas al efluente normal, su ingreso al sistema de tratamiento puede tener repercusiones en el proceso de depuración (Sandberg, 2009).

**Tabla 3.** Características del licor negro.

Parámetro	Unidad	Valor
Temperatura	°C	32
pH		11
CE	mho/cm	32,6
DQO	mg/L	28000
DBO	mg/L	9000
ST	mg/L	35000
SDT	mg/L	22500
SST	mg/L	12500
NTK	mg/L	310
Sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ )	mg/L	130
Fosfato ( $\text{PO}_4^{-2}$ )	mg/L	80,2
Cloruro ( $\text{Cl}^-$ )	mg/L	1533
AT (como $\text{CaCO}_3$ )	mg/L	8000
AGV	mg/L	975
Grasas y aceites	mg/L	3250

CE: Conductividad Eléctrica, DQO: Demanda Química de Oxígeno, DBO: Demanda Biológica de Oxígeno, ST: Sólidos Totales, SDT: Sólidos Disueltos Totales, SST: Sólidos Suspendidos Totales, NTK: Nitrógeno Total Kjeldahl, AT: Alcalinidad Total, AGV: Ácidos Grasos Volátiles. Fuente: Bishnoi *et al.* (2006).

### 1.2.3 Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa kraft

Debido a la composición de los efluentes del proceso productivo de celulosa kraft, y a su impacto en el medio ambiente, es necesario implementar sistemas de tratamiento de efluentes (Pokhrel and Viraraghavan, 2004). Generalmente, se utiliza en las plantas de celulosa kraft, un sistema de tratamiento primario, seguido de uno secundario de naturaleza biológica, y finalizando con un proceso terciario (Doble, 2005).

El objetivo del tratamiento primario es la eliminación de los sólidos suspendidos alcanzando eficiencias del 80–90% (Thompson *et al.*, 2001), con el empleo, comúnmente, de sedimentadores.

El tratamiento secundario es utilizado principalmente para la eliminación de materia orgánica contenida en el efluente (Chamorro *et al.*, 2005). Las tecnologías implementadas son de tipo biológica aeróbica, debido la presencia

de potenciales inhibidores de procesos anaeróbicos, tales como el sulfato (Rodrigues *et al.*, 2010). De esta manera, han sido utilizados sistemas en los que microorganismos degradan la materia orgánica en presencia de oxígeno, entregando un efluente de mejor calidad. Éstas pueden ser subdivididas, de acuerdo a la forma de operación, en sistemas de biomasa libre (los microorganismos se encuentran suspendidos en el líquido de mezcla del reactor) y adherida.

Dentro de los sistemas de biomasa libre, los lodos activados representan la alternativa más empleada, con eficiencias de eliminación de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>) de 65-99%, y eliminación de Demanda Química de Oxígeno (DQO) de hasta el 60%, pero sin sobrepasar dicho valor, debido principalmente a la 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 vertidos correspondientes, en relación a la materia orgánica biodegradable. Sin embargo, como se observa en la Tabla 4, debido al contenido de DQO residual, toxicidad y color, presentes en el efluente, es recomendada la aplicación de un tratamiento terciario, atendiendo a las características del ecosistema acuático receptor. Tratamientos terciarios son poco frecuentes en la actualidad, pero a medida que la legislación se vuelva más estricta, se pueden tornar habituales (Thompson *et al.*, 2001).

**Tabla 4.** Caracterización efluente secundario celulosa kraft.

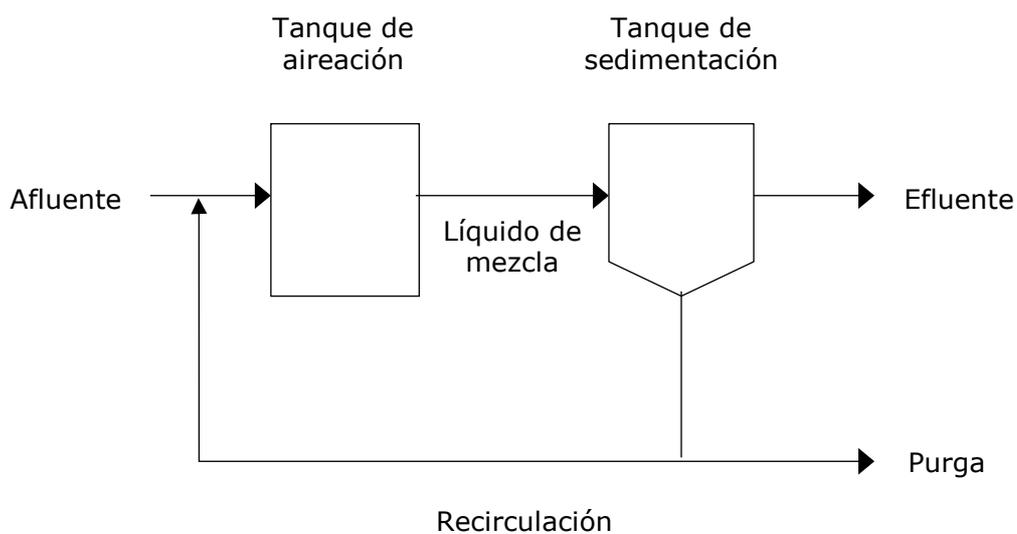
Parámetro	Unidad	Rango
pH		7,2-7,4
DBO <sub>5</sub>	mg/L	16,0-34,9
DQO	mg/L	202,9-213,7
Color (400 nm, pH 9)	Abs	0,2-1,0
Fenoles totales (215 nm)	mg/L	164,0-204,2
NT	mg/L	1,7-1,9
PT	mg/L	0,8-0,9

DBO<sub>5</sub>: Demanda Biológica de Oxígeno; DQO: Demanda Química de Oxígeno; NT: Nitrógeno Total; PT: Fósforo Total. Fuente: Chamorro *et al.* (2010); López *et al.* (2011).

### 1.3. Sistema de lodos activados

El tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados es actualmente el método más empleado para la depuración de efluentes, debido a que presenta resistencia a fluctuaciones en el caudal de entrada, carga orgánica y composición del influente (Metcalf y Eddy, 2003). En general, son reactores más compactos, con cortos tiempos de retención hidráulico (Xavier *et al.*, 2011), de mayor flexibilidad de operación a través de un control racional de la biomasa presente en el proceso, minimización de olores, y aplicación a un amplio rango de efluentes industriales (Metcalf y Eddy, 2003).

En general, el sistema se compone de dos partes, un tanque de aireación y uno de sedimentación, tal y como se observa en la Figura 2. El tanque de aireación contiene un licor de mezcla, formado por un conjunto de microorganismos. El ambiente aerobio en el reactor se consigue mediante el uso de aireadores mecánicos, que sirven, además, para mantener un sistema de mezcla completa. Los microorganismos estabilizan la materia orgánica mediante reacciones de oxidación biológica, y tras un periodo de tiempo determinado, el licor de mezcla se conduce hasta un tanque de sedimentación, donde los flóculos (unidad funcional del reactor) se separan por decantación del agua clarificada, que será vertida a un cauce. Una parte de las células sedimentadas se recircula para mantener en el reactor la concentración de células deseadas, mientras que la otra parte se purga del sistema (Metcalf and Eddy, 2003).



**Figura 2.** Sistema convencional de lodos activados.

### **1.3.1 Parámetros operacionales**

El proceso de lodos activados implica un sistema biológico de gran complejidad, que puede verse afectado por modificaciones en las condiciones ambientales. Se requiere, por tanto, un estrecho control sobre algunas variables operacionales del sistema de tratamiento, para garantizar una operación adecuada.

Se considera que parámetros como el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura, deben estar dentro de rangos determinados para la adecuada proliferación y desarrollo de los microorganismos. Además, existen condiciones de funcionamiento que inciden en la eficiencia del proceso, tales como el tiempo de residencia y las características del agua residual, incluyendo relación entre materia orgánica y nutrientes, la toxicidad, la cantidad de microorganismos presentes en el tanque de aireación y la tasa de recirculación, entre otros (WEF, 2008).

A continuación, se describen algunos parámetros operacionales esenciales para el control del sistema de lodos activados.

- **Temperatura**

La temperatura es uno de los parámetros más controversiales, debido a su alta influencia en el desarrollo de los microorganismos y en las reacciones químicas y velocidades de reacción. Incrementos importantes de temperatura afectan a la solubilidad del oxígeno en el licor de mezcla, provocando una disminución desde 14,74 mg/L a 0°C hasta 7,03 mg/L a 35°C. Además, produce un aumento en las velocidades de las reacciones químicas, consumiendo el oxígeno disuelto, llegando incluso a provocar un agotamiento de su concentración. Cabe destacar que, cualquier cambio brusco de temperatura, puede generar la mortalidad de gran parte de los microorganismos (Metcalf and Eddy, 2003; Ramalho, 1996).

- **pH**

La concentración del ión hidrogeno ( $H^+$ ) es un claro indicador de calidad del medio y afecta a la composición de la biocenosis de los lodos activados. El intervalo de pH tolerado por las bacterias es 4,0-9,5, existiendo un intervalo óptimo de operación de 6,5-7,5 (Ramalho, 1996). Con valores de pH inferiores a 6,5, se produce el crecimiento de hongos filamentosos en lugar de bacterias, mientras que un pH por encima de 8,5-9,0, inhibe la actividad bacteriana. Fluctuaciones repentinas del pH en el reactor, tienen como consecuencia, la muerte de microorganismos, lo que afectará de manera indirecta la eficiencia de eliminación de materia orgánica del proceso (Sandberg and Holby, 2008).

- **Oxígeno disuelto (OD)**

Una concentración de OD en el reactor es esencial para la correcta respiración de los microorganismos y oxidación de la materia orgánica. Este parámetro debe hallarse en concentraciones superiores a 2 mgO<sub>2</sub>/L, siendo este valor, el mínimo necesario para un desarrollo adecuado de la biomasa (Metcalf and Eddy, 2003; Ramalho, 1996). La relación cantidad de oxígeno/cantidad de alimento debe estar regulada y mantenerse estable. Una descompensación en un sentido o en otro, puede dar lugar a una aparición de organismos filamentosos que tienden a flotar en el decantador secundario, alterando totalmente la separación sólido-líquido y tendiendo a ser lavados con el efluente. Además, la agitación debe estar bien controlada, para que el oxígeno y el alimento se distribuyan de una manera homogénea.

- **Tiempo de retención hidráulico (TRH)**

Para que se pueda dar el proceso de oxidación biológica, es necesario que los microorganismos permanezcan un tiempo de contacto suficiente con la materia orgánica disuelta, siendo uno de los parámetros a considerar para una operación eficiente. Los sistemas convencionales presentan TRH entre 3-10 h, mientras que los de aireación extendida de 12-36 h (Metcalf and Eddy, 2003). Además, es un parámetro importante de diseño, puesto que en relación con el caudal a tratar y el tiempo que debe permanecer en el reactor, se calcula el volumen del mismo.

- **Velocidad de carga orgánica (VCO)**

La VCO se refiere a la cantidad de materia orgánica que ingresa al sistema, representándose como la alimentación de DBO<sub>5</sub> por unidad de volumen de reactor, expresada como (kgDBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d) (Zaror, 2002). La carga orgánica varía con la operación de la planta, tanto en flujo, como en concentración de material orgánico. Típicamente, los valores de diseño se encuentran entre 0,3-1,6 KgDBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d (Ramalho, 1996).

- **Concentración de la biomasa en el reactor**

La porción orgánica de los sólidos que se encuentran suspendidos en el reactor, está representada por los SSV (Sólidos Suspendidos Volátiles) del tanque de aireación, también denominados SSVLM (Sólidos Suspendidos Volátiles del Licor de Mezcla), que comprenden los microorganismos vivos, muertos y restos celulares. En un reactor convencional, los SSV tienen valores de concentración entre 1500-5000 mg/L (Metcalf and Eddy, 2003).

- **Relación alimento – microorganismos (A/M)**

La relación A/M hace referencia a la cantidad de materia orgánica alimentada, expresada como DBO<sub>5</sub> ó DQO por unidad de biomasa presente en el reactor, como kgSSV. Valores típicos se encuentran en el rango de 0,2-0,9 kgDBO<sub>5</sub>/kgSSV·d, siendo la relación óptima de 0,3-0,6 kgDBO<sub>5</sub>/kgSSV·d (Ramalho, 1996; Zaror, 2002). Este parámetro puede ser modificado desde la operación del sistema, ya que, la concentración de microorganismos puede ser rectificada aumentando o disminuyendo la purga de lodos (Metcalf and Eddy, 2003).

- **Relación materia orgánica y nutrientes**

El nitrógeno y el fósforo son nutrientes esenciales en el desarrollo de los microorganismos, siendo base para la síntesis de las proteínas (Metcalf and Eddy, 2003). Deben encontrarse en cantidades suficientes para un correcto crecimiento microbiano; de no ser así, el consumo de materia orgánica por parte de las bacterias se vería limitado. La relación óptima entre materia orgánica y nutrientes, expresada en unidad de masa como DBO<sub>5</sub>:N:P,

corresponde a 100:5:1 en los sistemas de lodos activados convencionales (Diez *et al.*, 2002).

- **Recirculación**

La recirculación de los microorganismos desde el sedimentador al tanque de aireación, permite mantener una concentración de biomasa constante en el reactor. Valores de recirculación varían en función del caudal de entrada, desde una fracción de 0,25 a 1,25 de éste (Metcalf and Eddy, 2003).

- **Edad del lodo**

Corresponde al tiempo promedio en que los microorganismos permanecen en el proceso de tratamiento. La edad del lodo puede variar de 4 - 15 d, en sistemas convencionales. Cabe destacar que un lodo antiguo estará caracterizado por un crecimiento disperso y tendrá como resultado una pobre sedimentación (Metcalf and Eddy, 2003).

- **Índice Volumétrico del Lodo (IVL)**

El IVL es un indicador macroscópico que permite evaluar las características de decantación del lodo. Corresponde al volumen en litros, que ocupa 1 gramo de sólidos en suspensión del licor de mezcla en peso seco, después de sedimentar por 30 minutos. Es un parámetro útil para determinar si se está produciendo un aumento de volumen del lodo, denominado lodo floculento o Bulking. Este fenómeno, se caracteriza por producir un IVL mayor a 100 mL/gSST, junto a la presencia excesiva de bacterias filamentosas (Sezgin, 1982). Los valores típicos de IVL para lodos con buenas características de sedimentación están dentro del intervalo de 35-150 mL/gSST (Ramalho, 1996).

### **1.3.2 Microbiología del lodo activado**

El sistema de lodos activados constituye un ecosistema artificial donde se desarrollan y proliferan los microorganismos en condiciones controladas y limitadas (Parody, 1997), lo que conlleva una competencia continua entre especies. Aquellos que son capaces de agruparse y formar flóculos, o los que se adhieren a estos, son retenidos en el sistema de lodos activados, por el

contrario, los que crecen libremente y de forma dispersa escapan del sistema con el efluente. Los flóculos constituyen una formación estable del proceso de fangos activados, ya que decantan y pueden ser recirculados sin ser evacuados con el efluente (Rius, 2003).

Desde un punto de vista metabólico, los microorganismos pueden dividirse en descomponedores, correspondientes a bacterias responsables de la biodegradación de los contaminantes presentes, y en consumidores, entre los que se encuentran protozoos y metazoos, que utilizan las bacterias y otras células microbianas como sustrato (Madoni, 1994; WEF, 2008).

A continuación, se describen los tipos de microorganismos mencionados, representativos de los lodos activados.

- **Bacterias**

Son el principal componente del ecosistema del lodo activado y el constituyente más abundantes del flóculo, correspondiendo a un 90-95% de la biomasa presente en el licor de mezcla. Son las responsables de la oxidación de la materia orgánica y de la transformación de los nutrientes. Además, producen polisacáridos y materiales poliméricos que ayudan en la en la floculación (Mas *et al.*, 2008).

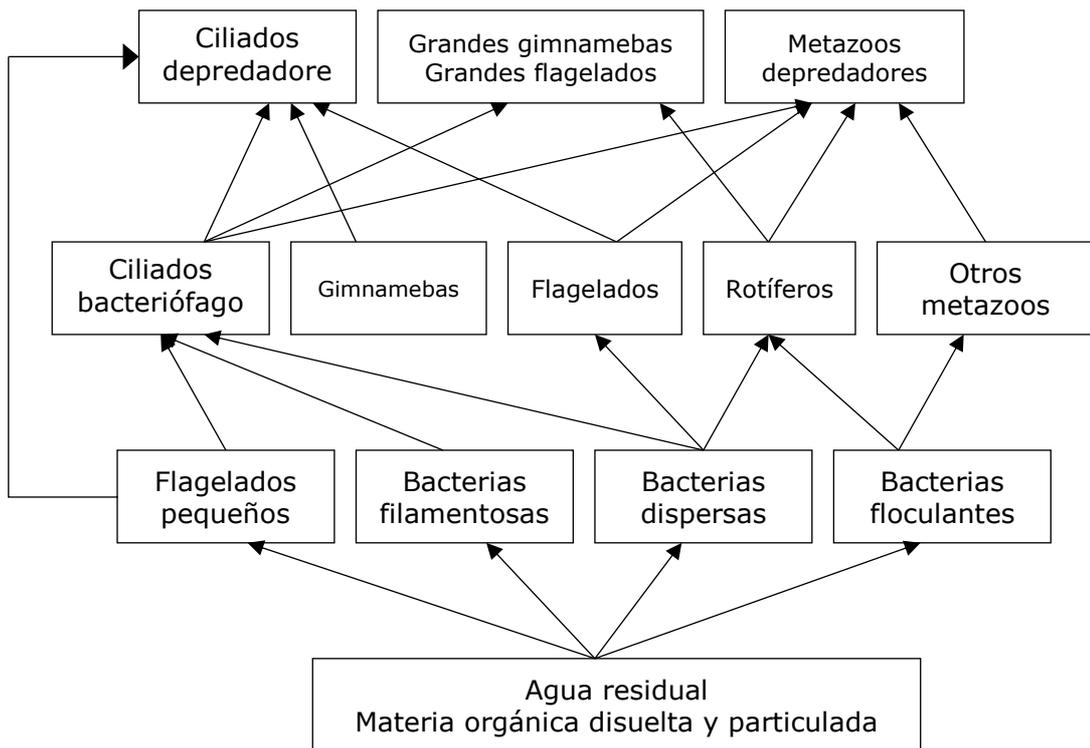
- **Protozoos**

Los protozoos son organismos unicelulares eucariotas, que se alimentan de las bacterias libres presentes en el ecosistema, reduciendo la concentración de bacterias dispersas y materia orgánica, ayudando a que el efluente sea más claro y de mejor calidad (Villaseca, 2001). Cumplen un papel importante a nivel de control y regulación poblacional. Son utilizados como indicadores del funcionamiento del proceso, ya que son muy sensibles a los tóxicos y a los cambios de oxígeno (Villaseca, 2001). Según criterios de morfología y movilidad, se clasifican en flagelados, amebas y ciliados.

- **Metazoos**

Son organismos pluricelulares, que se alimentan de bacterias y pequeñas partículas orgánicas. Los grupos más comunes son los rotíferos y nematodos, y en menor frecuencia oligoquetos, gastrotricos y los tardígrados. Su presencia es un indicador de lodo en fase madura (Villaseca, 2001). Los protozoos y metazoos representan entre un 5–10% de la biomasa del sistema (Masdeu, 1997).

La relación entre los diferentes microorganismos constituye una red trófica compleja, que va cambiando con el tiempo y en función de las condiciones del sistema y, como se observa en la Figura 3, tiene como punto de partida (en la base), la materia orgánica que es consumida por las bacterias (Ramalho, 1996).



**Figura 3.** Red trófica formada por los microorganismos del ecosistema del proceso de lodos activados. Fuente: Mas *et al.* (2008).

### **1.3.3 Ingreso de tóxicos a un sistema de lodos activados**

En la industria de celulosa, se utilizan gran variedad de sustancias químicas, presentando diferentes niveles de toxicidad, llegando incluso a desestabilizar el sistema por completo. Dentro de éstas, se encuentran, extractivos de la madera, sulfatos y compuestos organoclorados, encontrando que los biocidas, ácido acético monoclórico, jabón suave y trementina, inhiben la absorción de oxígeno y por lo tanto, tienen un efecto tóxico agudo sobre el lodo activado, afectando la tasa de consumo de oxígeno y la eliminación de materia orgánica disuelta (Sarlin *et al.*, 1999).

La presencia de tóxicos en los efluentes de entrada al sistema de lodos activados, no sólo inhiben o reducen la eficiencia de los procesos biológicos que se desarrollan, observándose un menor número de especies indicadoras y una disminución de la actividad heterótrofa de la biomasa; sino que además, suponen un grave problema en el ecosistema receptor (Fall *et al.*, 2006).

Muchos de estos compuestos son liberados a través de la digestión del proceso productivo propio de la celulosa kraft, y pasan a formar parte del licor negro generado en dicha etapa. No obstante, el problema principal no son los contaminantes presentes en el licor negro que posteriormente es recuperado, sino aquellos que quedan adheridos en la fibra sucia y que son eliminados con el agua de lavado, dando lugar a un residuo líquido que contiene cierto contenido en licor negro y por tanto, de esos nuevos contaminantes. Estos no son recuperados y pasan, junto con los demás residuos líquidos del proceso, a los sistemas de tratamiento (Sandberg, 2009), perjudicando su estrategia de operación.

No obstante, un posible derrame accidental de licor negro en el proceso de producción, tiene una notable importancia y acentúa las consecuencias del simple ingreso de pequeñas concentraciones de ciertos componentes que no son correctamente eliminados. De esta manera, el efluente se ve afectado con todos los componentes del licor negro, en la proporción en que éste ingresa al sistema de manera inusual, y al no poder ser degradados, provocan efectos potencialmente negativos en el sistema de tratamiento posterior, de carácter tóxico y mutagénico.

Algunos de los efectos observados en sistemas de tratamiento biológico aeróbico sobre indicadores fisicoquímicos y biológicos, debido a la presencia de estos contaminantes y shocks tóxicos, se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Efectos observados a partir de shocks tóxicos aplicados a sistemas de tratamiento biológico aeróbico.

<b>Tecnología</b>	<b>Sustancia adicionada</b>	<b>Efectos</b>	<b>Referencia</b>
Lodos activados	Sulfuro	Debilitamiento y desintegración de los flóculos en presencia de Fe(III)	1
Lodos activados	Biocidas, ácido acético monoclorado, jabón suave y trementina	Inhibición de la velocidad de utilización de oxígeno (VUO)	2
Lodos activados	Sulfato de aluminio y abrillantador óptico	Mala decantación del lodo	2
Lodos activados y SBR	Fenol y cianuro	Cambio en la dominancia de ciliados fijos	3
MultiBio (multi-etapa)	Licor negro e hidróxido de sodio	Inhibición de la eficiencia de DQO de 1300 mg/L en presencia de pH básico y a 2500 mg/L a pH neutro	4
MultiBio (multi-etapa)	Licor negro	Reducción de la actividad biológica y la eficiencia de eliminación. Desaparición de protozoos	5

SBR: Secuencial Batch Reactor.

Fuente: 1. Nielsen and Keiding, 1998; 2. Sarlin *et al.*, 1999; 3. Papadimitriou *et al.*, 2007; 4. Sandberg and Holby, 2008; 5. Sandberg, 2009.

#### **1.4. Toxicidad en efluentes de celulosa**

La evidencia científica existente a nivel mundial, respecto al daño en ecosistemas sometidos a efluentes de celulosa, señala que han sido identificados muchos compuestos tóxicos, principalmente organoclorados, como dioxinas, furanos, y extractivos de la madera. De estos últimos, se incluye una gran variedad de compuestos agrupados en clases generales, tales como, esteroides, terpenoides, ácidos resínicos, grasas, ceras y compuestos fenólicos, así como otros componentes menores, tales como carbohidratos, péptidos y compuestos inorgánicos (Fernández *et al.*, 2001).

Este alto contenido en tóxicos hace que los efluentes de celulosa causen en el ecosistema receptor toxicidad aguda sobre variados organismos (Rosa *et al.*, 2010), cuyos efectos son observados a corto plazo, y toxicidad crónica, tras un periodo prolongado de exposición, de carácter genotóxico y mutagénico. Los agentes genotóxicos son aquellos que interaccionan con el ADN, alterando su estructura o función. Cuando estos cambios se fijan de tal manera que se pueden transmitir, se llaman mutaciones (Springer, 2000).

Debe tenerse en cuenta que la no evidencia de toxicidad aguda, no implica que la carga orgánica residual presente efectos debidos a la toxicidad crónica y actividad mutagénica, que son considerados subletales (Pessala *et al.*, 2004). Los análisis de toxicidad aguda para evaluar la toxicidad de efluentes industriales no son suficientes y se recomienda que la genotoxicidad, la toxicidad crónica y el efecto en el sistema hormonal se evalúe simultáneamente (Springer, 2000).

Los compuestos de baja masa molecular (<1000 Da), son los que presentan los mayores riesgos toxicológicos y mutagénicos, debido principalmente a su hidrofobicidad y la capacidad de penetrar las membranas celulares (Heimberger *et al.*, 1988). Sin embargo, varios de los compuestos organoclorados presentes en este tipo de efluentes son de alta masa molecular (>1000 Da) (Savant, 2006; Yan *et al.*, 1994), muy persistentes en el ambiente por ser de difícil biodegradación, y biomagnificables, es decir, aumentan su concentración progresivamente a lo largo de las cadenas alimenticias (Ham *et al.*, 2006). Debido a su persistencia pueden viajar grandes distancias siendo arrastrados por las corrientes atmosféricas, de agua dulce o marinas.

En los últimos años, la atención ha sido dirigida a identificar los compuestos que generan alteraciones a nivel crónico , debido a que muchos de los efectos demostrados en el ecosistema receptor, son alteraciones en la función reproductiva de una creciente cantidad de especies de crustáceos, aves, mamíferos y peces (Argemi *et al.*, 2005; Filali-Meknassi *et al.*, 2005).

En la Tabla 6, se muestran algunas de las alteraciones provocadas por efluentes de celulosa o algún componente específico, sobre células y otros organismos presentes en los ecosistemas receptores.

**Tabla 6.** Alteraciones observadas sobre diferentes especies por la exposición de efluentes o compuestos específicos de la industria de celulosa kraft.

<b>Efluente /Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos</b>	<b>Test realizado</b>	<b>Referencia</b>
BKME	<i>Poecilia promelas</i>	Masculinización al 5-25%	Exposición adulto 42 d	Larsson <i>et al.</i> , 2002
BKME	<i>Gambusia affinis</i>	Masculinización al 100%	Exposición adulto 21 d	Ellis <i>et al.</i> , 2005
BKME	<i>Daphnia magna</i>	Crecimiento abdominal	Ensayos de toxicidad, CG-MS, microscopia	Xavier <i>et al.</i> , 2005
BKME	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Reducción de testosterona en plasma entre 1 y 5%	Exposición adulto 7-57 d	Dubé and Mactlachy, 2000; 2001
BKME, BKMP, Mixto, fitoesteroles	<i>Daphnia magna</i>	Crecimiento abdominal	Ensayos de toxicidad, CG-MS, microscopia	Xavier <i>et al.</i> , 2005
BKME, BKMP, Mixto	<i>Saccharomy cescerevisae</i>	Actividad estrogénica débil	Unión receptores estrogénicos (YES-RYA)	Chamorro <i>et al.</i> , 2010
BKME, BKMP, Mixto	<i>Saccharomy cescerevisae</i>	Actividad Tipo dioxin like	Unión receptores de hidrocarburo de arilo AhR (RYA)	Chamorro <i>et al.</i> , 2011
BKM	<i>Gambusia holbrokii</i>	Decrecimiento de hormonas masculinas	Ensayos de toxicidad	Jenkins <i>et al.</i> , 2003
Sedimento - BKM	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Inducción VTG	Exposición juveniles 29 d	Orrego <i>et al.</i> , 2005
DHAA (50 µg/L)	<i>Danio rerio</i>	Aumento de VTG (machos F1); bajos niveles de VTG (machos F0)	VTG, ELISA, análisis histológicos	Nagao <i>et al.</i> , 2001
Sitoesterol (200 mg/g)	<i>Carassius carassius</i>	Reducción en el tamaño de las gónadas	VTG, GSI, HSI y análisis histológicos	Christianson-Heiska <i>et al.</i> , 2008

BKME: Celulosa kraft blanqueada en base a Eucaliptus sp; BKMP: Celulosa kraft blanqueada en base a Pinus sp; BKM: Celulosa kraft blanqueada; YES: Yeast Estrogen Screen; RYA: Recombinant Yeast Assay; VTG: Vitelogenina; ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay); GC-MS: Cromatografía de gas con detector de masa Gas (Chromatography-Mass Spectrometry); GSI: Índice gonadosomático (Geological Strenght Index); HSI: Índice hepatosomático (Heat Stress Index).

#### **1.4.1. Técnicas para la evaluación de la toxicidad en efluentes de celulosa**

Dada la elevada complejidad de los compuestos presentes en los efluentes de celulosa y debido al conocimiento que existe sobre los efectos que pueden ejercer en el medio ambiente, es prioritario conocer en profundidad la composición de estos vertidos y la potencialidad con la que se expone a la biota (Kovacs *et al.*, 2003).

Los parámetros físico-químicos globales para el análisis de la calidad del agua como DQO, DBO<sub>5</sub>, COT, pH, entre otros, no permiten identificar si el potencial toxicológico es remediado después de los tratamientos (Costa *et al.*, 2008). Para ello, es necesario complementar con técnicas o ensayos que evalúen la actividad y los efectos de los compuestos presentes en los efluentes de celulosa, sobre organismos vivos, para dar una respuesta, respecto de la potencialidad de estos y su relación con las alteraciones observadas en el medio ambiente (Zeng *et al.*, 2005).

Una aproximación para determinar los efectos tóxicos del efluente y sus componentes específicos, son los test de toxicidad o bioensayos, que se realizan a través de la exposición controlada de organismos de prueba seleccionados, representativos de las comunidades en los ambientes acuáticos, a concentraciones establecidas de compuestos químicos (puros o en mezclas), o bien directamente a diluciones de muestras de los efluentes contaminantes (Nielsen *et al.*, 1998). Sus efectos se evalúan a través de estudios de toxicidad aguda por medio de respuestas letales (inmovilidad, mortalidad), lo que permite expresar el resultado como una concentración letal media (CL<sub>50</sub>), para un tiempo de exposición determinado, normalmente en exposiciones cortas de 24-48 horas (Larraín, A. 1996).

Debido a la facilidad de cultivo en el laboratorio, manejo y determinadas características en su ciclo reproductivo, con frecuencia se recurre a especies planctónicas como organismos de prueba, y de manera particular a los cladóceros, pues son éstos un componente fundamental en la comunidad zooplanctónica, siendo un grupo dominante que funciona como el enlace principal entre los productores primarios y los consumidores de niveles tróficos superiores (Mount y Norberg 1984). Entre los cladóceros, *Daphnia magna* es la especie más utilizada y ha sido propuesta como especie de referencia en múltiples protocolos estandarizados de entidades reguladoras y organismos

internacionales involucrados en la normalización de procedimientos de prueba (Martínez-Jerónimo *et al.*, 2000).

Existen en la actualidad, un gran número de metodologías para la determinación de la toxicidad a nivel genético de un efluente específico, resultando imprescindible su realización como complemento a los ensayos de toxicidad a corto plazo. La mayoría de estos ensayos utilizan como elementos de experimentación los microorganismos, sobre todo bacterias, o cultivos celulares (Venitt y Perry, 1984). Las técnicas aplicadas con mayor frecuencia para la evaluación de la mutagenicidad y genotoxicidad son: test Umu (Schmitt *et al.* 2005), test de Ames (Ohe *et al.* 2004), ensayo en gel de electroforesis cometa o de células individuales (Lah *et al.* 2004), prueba Microtox de bioluminiscencia (Dizer *et al.*, 2002) y de micronúcleos, así como ensayos de aberración en anafase (Grover y Kaur 1999).

El test de Ames, desarrollado por el bioquímico norteamericano Bruce Ames en 1973, sigue una estrategia de operación inversa, a partir de bacterias mutantes, se buscan compuestos químicos que puedan modificarlas y vuelvan así al estado inicial de no-mutación. Es un ensayo rápido y de gran utilidad como medida básica de evaluación de la peligrosidad de familias de compuestos químicos. La detección de mutagenicidad mediante este test utiliza una cepa bacteriana mutante de la especie *Salmonella typhimurium*. Esta cepa mutante no es capaz de formar colonias sin la presencia del aminoácido histidina. Cuando estas bacterias se exponen a un compuesto mutagénico, puede ocurrir un fenómeno llamado mutación inversa, que genera la sustitución de la base incorrecta, revirtiendo la mutación original. Con esta mutación las bacterias llegan a ser capaces nuevamente de crecer sin este aminoácido (Ames *et al.*, 1975).

## **2. HIPOTESIS**

La toxicidad del efluente de celulosa kraft se incrementa debido a derrames de licor negro en la alimentación de un sistema de lodos activados.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo principal**

Evaluar la toxicidad del efluente de celulosa kraft, tratado con un sistema de lodos activados, y expuesto a derrames de licor negro.

### **3.2. Objetivos específicos**

1. Evaluar la operación del sistema de lodos activados para el tratamiento de efluentes de celulosa kraft.
2. Evaluar la operación del sistema de lodos activados, expuesto a derrames de licor negro.
3. Determinar la toxicidad aguda del efluente de celulosa kraft bajo condiciones de shock de licor negro mediante *Daphnia magna*.
4. Determinar la mutagenicidad del efluente de celulosa kraft bajo condiciones de shock de licor negro mediante el test de Ames.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Influyente**

Se utilizó un efluente procedente de una industria de celulosa kraft, localizada en la región del Biobío, que cuenta con un sistema ECF de blanqueo. Dicho efluente se tomó después del tratamiento primario de la planta, basado principalmente en la eliminación de sólidos suspendidos mediante sedimentadores. El efluente fue almacenado en bidones de 30 L y refrigerado a 4 °C, en la oscuridad.

Una caracterización previa del influente fue requerida para el control de los parámetros fisicoquímicos, tales como pH, temperatura, conductividad, DQO, DBO<sub>5</sub>, SST y SST.

Se suministró nitrógeno al influente en forma de urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), para cumplir con las necesidades de nutrientes, en la proporción óptima de DBO<sub>5</sub>:N:P (100:5:1). El pH se mantuvo en torno a la neutralidad, siendo ajustado con ácido clorhídrico (HCl), cuando presentó valores superiores a 7,5.

### **4.2. Sistema de lodos activados**

#### **4.2.1. Inóculo**

La biomasa bacteriana empleada como inóculo, fue obtenida de la línea de recirculación de un reactor de lodos activados de la planta de tratamiento de aguas de la industria de celulosa kraft. Fue transportada en un bidón de 5 L y almacenada, bajo refrigeración a 4 °C, en la oscuridad. Se determinó la concentración de sólidos, en las formas SST y SSV, así como la actividad heterótrofa de la biomasa.

#### **4.2.2. Reactor**

Se instaló un sistema continuo de lodos activados a escala laboratorio, ubicado en la Planta Piloto de Investigación del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental (GIBA), en la Facultad de Ciencias Ambientales y Centro EULA-Chile, de la Universidad de Concepción.

El sistema experimental, presentado en la Figura 4, está formado por un reactor de 1,20 L de volumen útil, inoculado con 5 mgSSV/L, seguido de un sedimentador de 0,390 L, con objeto de clarificar la salida del reactor y recircular a este la mayor parte posible de biomasa sedimentada.

Se utilizaron dos bombas Masterflex, para la alimentación y la recirculación, y un aireador para acondicionar el reactor.



**Figura 4.** Reactor de lodos activados (A: Reactor; B: Sedimentador).

#### **4.2.3. Operación**

Los sistemas de lodos activados fueron operados en flujo continuo, por un periodo de 44 días, a una temperatura promedio de  $22,01 \pm 2,01$  °C. Se diferenció entre una etapa de adaptación previa de 14 días con un TRH de 2 d, y una etapa de operación de 30 días, con un TRH de 1 d. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en valores superiores a los 2 mg/L mediante un difusor de oxígeno, que además permitió la mezcla completa de la biomasa suspendida. Se mantuvo la recirculación del sistema en 1,4 veces el caudal de entrada. La estrategia de operación consideró una condición de operación normal, alimentado con influente crudo y, una condición de shock tóxico, siendo desestabilizado mediante la alimentación de influente con licor negro, durante 24 horas.

Se realizaron 4 shocks tóxicos agregando, al influente normal, licor negro proveniente de una planta de celulosa kraft. Los shocks denominados S1 (Shock 1), S2 (Shock 2), S3 (Shock 3) y S4 (Shock 4), fueron aplicados por 24 horas, y tras ajuste de pH, en los días de operación 22, 29, 36 y 43, aumentando progresivamente la concentración de cada uno de ellos (2, 4, 10 y 30 mL de licor negro/ L de influente, respectivamente). En la Tabla 7, se observan las características de los shocks, en cuanto a concentraciones de licor negro añadido por litro de influente normal.

**Tabla 7.** Características de los shocks tóxicos aplicados

<b>Shocks</b>	<b>Días aplicación</b>	<b>Concentración (mL licor/L)</b>
S1	22 (01/12/14)	2
S2	29 (09/12/14)	4
S3	36 (15/12/14)	10
S4	43 (22/12/14)	30

Para evaluar la evolución de la operación, se determinaron parámetros en el reactor, tales como, oxígeno disuelto, pH, temperatura, y conductividad, estos tres últimos medidos también en el efluente. Además, se determinó TRH, VCO, relación A/M, valor de recirculación, eficiencia de eliminación de materia orgánica en las formas de DQO y DBO<sub>5</sub>, y de color y compuestos específicos detectables al ultravioleta. Con respecto a la biomasa se midió la concentración de sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV) y se realizó una observación general de microorganismos. El nitrógeno total (NT) y el fósforo total (PT), contenidos en el influente y efluente, fueron analizados para determinar si la concentración de nutrientes era adecuada.

Se determinó el índice volumétrico del lodo (IVL), la actividad heterótrofa de la biomasa mediante una técnica respirométrica, y se realizó la observación de microorganismos indicadores. En los días de aplicación de los shocks tóxicos, se aumentó la frecuencia de los análisis, siendo necesario evaluar la actividad de la biomasa, IVL, y observación de microorganismos a las horas 0 y 24 para cada uno de ellos. De igual manera, se monitorearon los parámetros de control pH, temperatura, conductividad, y oxígeno disuelto, y se mantuvo especial atención en las variaciones en las eficiencias de eliminación en la forma DQO.

### **4.3. Técnicas analíticas**

#### **4.3.1. Parámetros fisicoquímicos**

La determinación de los parámetros fisicoquímicos, para el influente, reactor y efluente, se realizó mediante las técnicas analíticas que se detallan a continuación. Específicamente, las muestras utilizadas en el análisis de, DQO, DBO<sub>5</sub>, color, compuestos y nutrientes, fueron previamente filtradas por membrana Wathman de 0,45µm.

- Temperatura y oxígeno disuelto: Fueron medidos a través de un electrodo de oxígeno WTW Oxycal 323B.
- pH y conductividad: Fueron medidos mediante un pH-metro WTW Inolab pH level 1.
- DQO: Se determinó sobre muestras solubles, mediante el método colorimétrico de reflujo cerrado 5220-D, del Standard Methods (APHA, 2005) a 600 nm, a través del equipo, ThermoSpectronic modelo Genesis 10 UV.
- DBO<sub>5</sub>: Se determinó sobre muestras solubles, por la prueba de DBO del quinto día, 5210-B (APHA, 2005). Se empleó un volumen suficiente para que la concentración de oxígeno disuelto se reduzca a la mitad, durante 5 días de incubación a 20°C.
- Sólidos: Los SST (Sólidos Suspendidos Totales) fueron determinados según el método 2540 D, y los SSV (Sólidos Suspendidos Volátiles) por el método 2540 E (APHA, 2005).
- Color: Se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 440 nm, en cubeta de vidrio 1×1 cm, a través del equipo ThermoSpectronic modelo Genesys 10 UV. A la muestra utilizada se le ajustó el pH a 9, con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH), según fue requerido.
- Compuestos específicos: Compuestos fenólicos totales (UV 215 nm), lignina y derivados (UV 272 nm y UV 280 nm), compuestos aromáticos (UV 254 nm) y ácidos lignosulfónicos (UV 346 nm) fueron medidos en cubeta de cuarzo 1×1 cm, según describe Çeçen (2003). Todas las mediciones espectrofotométricas se efectuaron con el equipo ThermoSpectronic modelo Genesys 10 UV.

- Nitrógeno total (NT) y Fósforo total (PT): Se determinaron mediante kit específicos de Spectroquant NOVA-60 de Merck.

#### 4.3.2. Determinación de IVL

En la determinación de IVL, según el Standard Method, se requiere un volumen de 1 L de lodo, pero debido al volumen limitado del reactor, se tomaron 100 mL de muestra, dejándolo decantar durante 30 minutos en una probeta graduada de 100 ml. La medida se llevó a cabo una vez por semana, y en las horas 0 y 24 durante los shocks tóxicos. Para obtener el valor final del IVL, fueron determinados los sólidos suspendidos totales de la muestra de lodo empleada.



**Figura 5.** Determinación experimental del IVL.

#### 4.3.3. Determinación de la actividad heterótrofa de la biomasa

La actividad heterótrofa de la biomasa se evaluó a través de una técnica respirométrica, basada en la medida de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo. Se determina el oxígeno consumido por los microorganismos durante la degradación de un sustrato orgánico, empleando como tal acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 0,75 M. Para la realización del análisis, el lodo fue lavado 3 veces con una solución tampón compuesta por fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), a pH 7. Tras el lavado, el lodo se burbujea durante 30 minutos, hasta la saturación. La concentración de biomasa utilizada en el ensayo fue de 1–1,5 mgSSV/L. El análisis respirométrico se basó en el protocolo de Mosquera *et al.* (2005), con mediciones cada 15 segundos.

#### **4.3.4. Observación microscópica de la biomasa**

Para evaluar la calidad del lodo, se observaron periódicamente los microorganismos presentes en el licor de mezcla en suspensión, mediante un análisis microscópico de las muestras frescas, con un microscopio óptico Leica Microsystems, modelo DM500. El acople de una cámara digital al lente del microscopio, facilitó la captura de imágenes de la biomasa presente, y la posterior identificación de los diferentes tipos de microorganismos y variaciones observadas mediante los shocks aplicados.

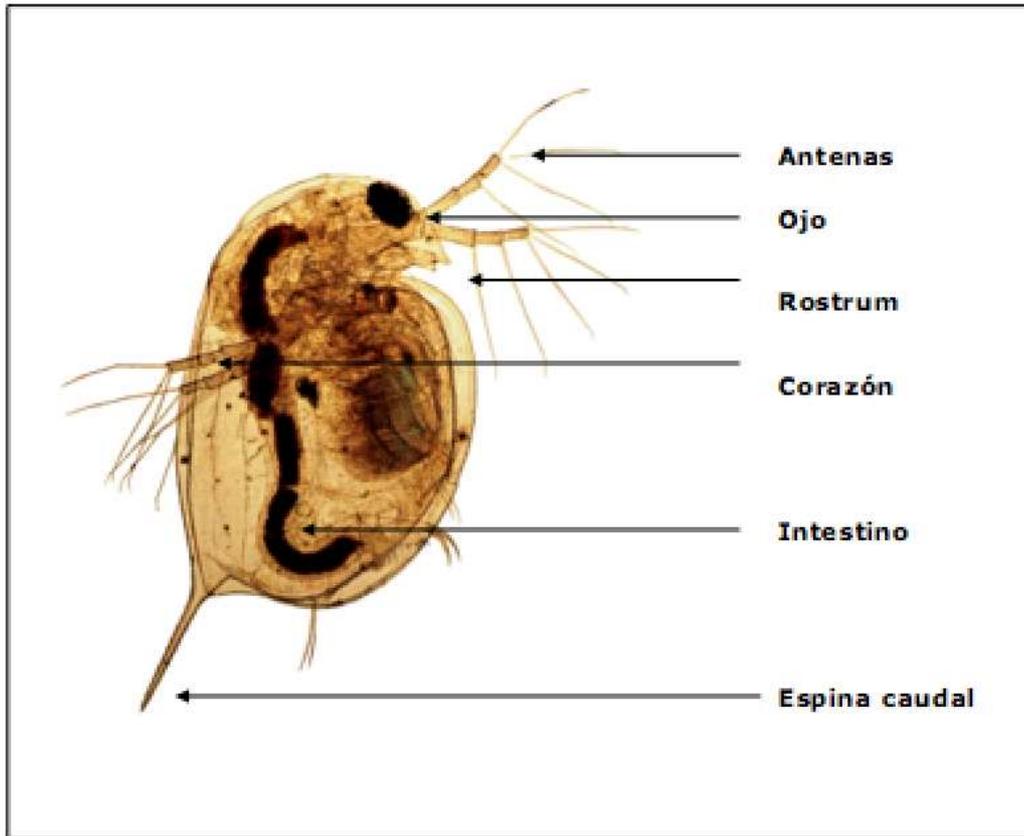
#### **4.4. Determinación de la toxicidad**

##### **4.4.1. Bioensayo con *Daphnia magna***

Se realizó un bioensayo con la especie indicadora *D. magna*, con la finalidad de establecer el grado de dilución a considerar en los de mutagenicidad.

##### **Cultivos de Daphnideos**

Los organismos fueron obtenidos desde cultivos del Laboratorio de Bioensayos del Centro de Ciencias Ambientales EULA-CHILE y del Laboratorio de Ficología (*Selenastrum capricornutum*), ambos de la Universidad de Concepción. Los cultivos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento de normativa chilena (NCh2083. Of 1999). La preparación del agua reconstituida, de dilución y cultivo para el bioensayo, consistió en agua para análisis (agua destilada), a la cual se le agregaron sales inorgánicas; NaHCO<sub>3</sub> (2,59 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O (4,93 g/L), KCl (0,23 g/L), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (11,76 g/L) completadas a 1L (NCh 2083. Of 1999) y con un contenido de oxígeno disuelto mayor al 80% (EPA, 1993). El medio fue renovado tres veces por semana alimentados de acuerdo a Xavier et al. (2005).



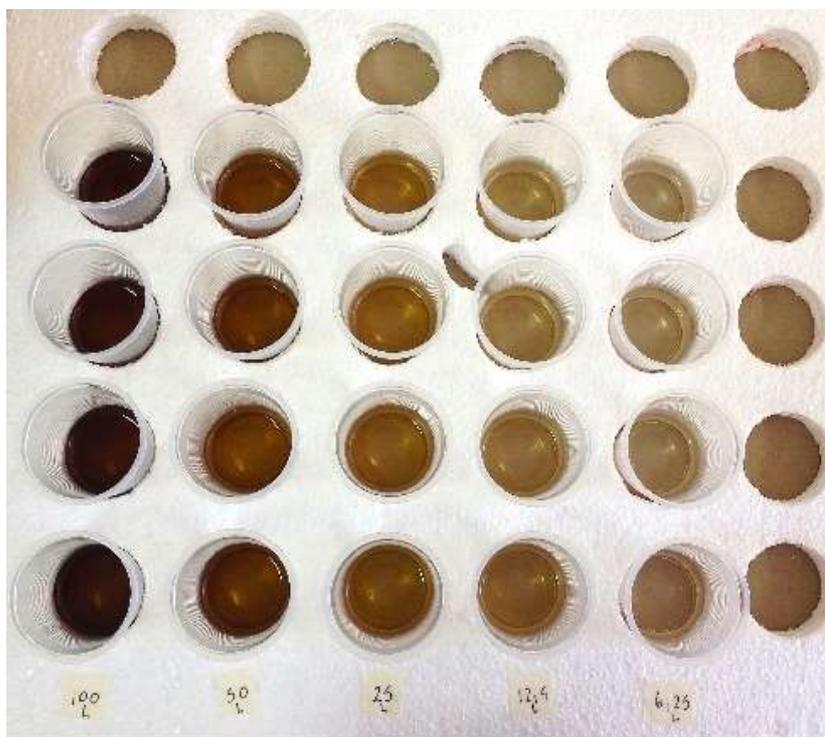
**Figura 6.** *Daphnia magna*.



**Figura 7.** Cultivos de *Daphnia magna*

## Toxicidad aguda y subletal

Para evaluar los efectos agudos, se expusieron a neonatos de *D. magna* (<24 h de edad), efluentes de celulosa kraft con distintos shock de licor negro (2, 4, 10 y 30 ml de licor negro/L de influente, para S1, S2, S3 y S4, respectivamente) durante 24-48 h de exposición, además de su respectivo control. Los efluentes fueron filtrados mediante membrana Whatman 0,45µm y pH ajustado a 7. Se emplearon 4 réplicas para cada tratamiento, con 5 neonatos por cada envase (30 mL de vidrio). Los ensayos se realizaron con fotoperiodo controlado de luz y temperatura (8 h oscuridad: 16 h Luz). La respuesta evaluada al final del bioensayo fue la concentración letal 50 (LC<sub>50</sub>), mediante la mortalidad o inmovilidad de los organismos. Los datos se analizaron mediante el programa estadístico Probit y Spearman-Kärber (EPA, 1993). Para determinar el grado de efecto subletal se fotografiaron los organismos expuesto a los distintos shocks (S1-S4), mediante micoroscopio Leika a un objetivo de 10X. Además en las fotografías se evaluó la longitud del cuerpo (cabeza hasta la espina caudal) y abdomen con el fin de determinar la tasa de crecimiento alométrica



**Figura 8.** Ensayo de toxicidad aguda 48 horas con *Daphnia magna*, a diferentes grados de dilución para el shock 4 (30 ml licor negro/L de efluente).

#### 4.4.2. Ensayo de mutagenicidad: Test de Ames

La detección de mutagenicidad se realizó con el Test Muta-ChromoPlate de la empresa EBPI. Este test se basa en la mutación reversa bacteriana generalmente más utilizada y validada, conocida como el test de Ames (Ames et al, 1975), y emplea una cepa mutante de *Salmonella typhimurium*, con dicha mutación en el operón que codifica para la biosíntesis del aminoácido histidina, por lo que no puede sintetizarlo, necesitando un aporte externo de histidina para su crecimiento. Cuando estas bacterias se exponen a agentes mutagénicos, bajo determinadas condiciones, ocurre un proceso de mutación inversa que permite que la bacteria sintetice histidina y pueda crecer en el medio sin este aminoácido.

Los reactivos del kit Muta-ChromoPlate deben estar refrigerados (2-8°C) inmediatamente tras la recepción. Los estándares mutagénicos, las bacterias y algunos de los reactivos son sensibles a la luz, y deben ser almacenados en total oscuridad.

El ensayo se realizó con la cepa TA 100 que se utiliza para detectar mutaciones puntuales, y con la presencia de la enzima de activación S9, que biotransforma compuestos promutágenos (compuestos que al ser metabolizados dentro del organismo son mutagénicos) en compuestos mutágenos. Se utilizan placas de 96 pocillos, considerando cada pocillo una colonia. Tras un periodo de incubación de 5 días a 37°C, las mutaciones se determinan visualmente en las placas debido a un cambio de color de púrpura a amarillo.



**Figura 9.** Componentes del Muta-ChromoPlate kit y reactivos, y placa de control de esterilidad o blanco.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterización fisicoquímica del influente

El influente de celulosa kraft, cuya caracterización se muestra en la Tabla 8, se utilizó como alimentación en condición normal de operación al reactor, y al que se añadieron las diferentes cargas de licor negro en condiciones de shock tóxico.

**Tabla 8.** Caracterización físicoquímica del influente de celulosa kraft

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Promedio</b>
<b>pH</b>	-	7,10 ± 3,91
<b>CE</b>	mS	3,05 ± 0,09
<b>DBO<sub>5</sub></b>	mg/L	345,00 ± 41,20
<b>DQO</b>	mg/L	477,13 ± 76,10
<b>SST</b>	g/L	0,41 ± 0,19
<b>SSV</b>	g/L	0,29 ± 0,21
<b>Color</b>	Abs	0,15 ± 0,03
<b>Ácidos lignosulfónicos</b>	Abs	0,05 ± 0,06
<b>Compuestos aromáticos</b>	Abs	0,59 ± 0,06
<b>Lignina (UV 272 nm)</b>	Abs	2,98 ± 0,12
<b>Lignina (UV 280 nm)</b>	Abs	2,12 ± 0,11
<b>Fenoles totales</b>	mg/L	150,30 ± 57,83
<b>NT</b>	mg/L	< 0,50
<b>PT</b>	mg/L	2,92 ± 0,59

CE: Conductividad Eléctrica; DBO<sub>5</sub>: Demanda Biológica de Oxígeno; DQO: Demanda Química de Oxígeno; SST: Sólidos Suspendidos Totales; SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles; NT: Nitrógeno Total; PT: Fósforo Total.

La caracterización del influente utilizado en condición de operación normal, mostró rangos de variabilidad en el pH, en torno a la neutralidad (6,7 -8,0), siendo necesario su ajuste con ácido clorhídrico (HCl) en los casos en los que fue superior a 7,5. En la etapa de adaptación (primeros 14 días de funcionamiento del sistema de lodos activados), resultó complicado este ajuste de pH, lo que provocó que en el reactor las condiciones de pH no fueran óptimas.

La conductividad registró valores en el rango 2,67 - 3,05 mS, y al ser relativamente constante, fue posible establecer una línea de base para la comparación con las mediciones de conductividad en el influente utilizado en los shocks. En lo referido a la concentración de materia orgánica, el influente presentó valores promedio de  $477,13 \pm 76,10$  mg/L para DQO, y de  $345,00 \pm 41,20$  mg/L para DBO<sub>5</sub>. Se determinó la biodegradabilidad del efluente, mediante la relación DBO<sub>5</sub>/DQO, indicando un valor promedio de 0,92. El influente presentó coloración marrón, con un promedio de absorbancia de  $0,15 \pm 0,03$ . Con respecto a los fenoles totales, se obtuvieron concentraciones entre 109,3-249,4 mg/L, con un valor promedio de  $150,30 \pm 57,83$  mg/L.

La determinación de nutrientes, en las formas de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT), presentó concentraciones menores a 0,5 mg/L para NT y de  $2,92 \pm 0,59$  mg/L para PT, a partir de las cuales se obtiene una relación promedio entre materia orgánica y nutrientes, representada como DBO<sub>5</sub>:N:P de 100:<0,5:1,1, comparada con la relación recomendada para un óptimo funcionamiento del sistema, 100:5:1, resulta deficiente en nitrógeno (Diez *et al.*, 2002). Debido a esto, se añadió urea ((CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) para aumentar la proporción de nitrógeno hasta los niveles requeridos.

En la Tabla 9, se presenta la caracterización realizada al influente alimentado durante cada shock tóxico.

**Tabla 9.** Caracterización del influente utilizado en la condición de shock tóxico

Shock	Fecha aplicación	pH	DQO (mg/L)	CE (mS)
<b>S1</b>	01/12/14	7,50	$708 \pm 3,91$	$3,47 \pm 0,02$
<b>S2</b>	09/12/14	7,20	$1113 \pm 7,01$	$3,79 \pm 0,02$
<b>S3</b>	15/12/14	7,30	$1887 \pm 15,29$	$4,53 \pm 0,02$
<b>S4</b>	22/12/14	7,12	$3221 \pm 112,03$	$6,35 \pm 0,02$

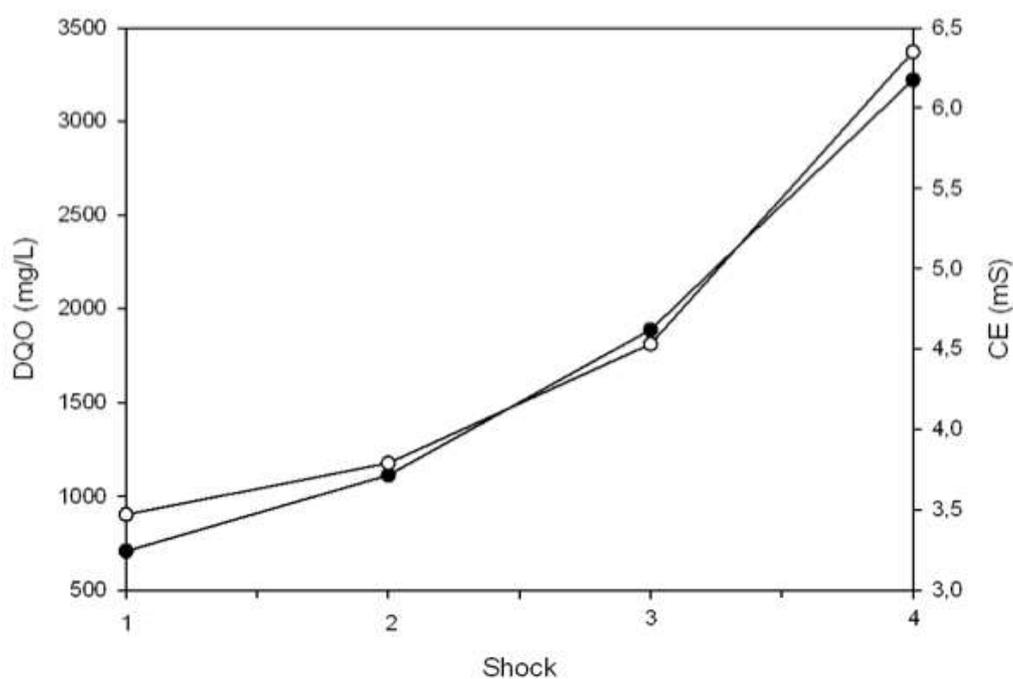
DQO: Demanda Química de Oxígeno, CE: Conductividad Eléctrica, S1: Shock 1, S2: Shock 2, S3: Shock 3, S4: Shock 4.

El licor negro es muy alcalino, con un pH mayor a 12, por lo que fue ajustado con ácido clorhídrico (HCl), obteniendo valores próximos a la neutralidad, entre 7,0 - 7,5.

En función de la concentración de licor negro aplicada, se observa un incremento en los niveles de DQO. Considerando un valor promedio en condición normal de operación de  $477,13 \pm 76,10$  mg/L, se obtuvo un aumento de 148, 233, 395 y 675% en S1, S2, S2 y S4, respectivamente, alcanzando en S4 una carga orgánica de  $3221 \pm 112,03$  mg DQO/L.

La conductividad fue un parámetro crítico, que se vio aumentado con la cantidad de materia orgánica ingresada en el sistema desde una condición de operación de  $3,05 \pm 0,09$  mS, a  $6,35 \pm 0,02$  mS, en S4.

En la Figura 10, se observa la variación de DQO y CE con respecto a cada concentración de shock tóxico aplicado.



**Figura 10.** Variación de DQO (●) y CE (○) en los shocks aplicados.

## 5.2. Caracterización del inóculo

Se realizó la medición del contenido de sólidos presentes en el lodo con el fin de inocular 5 gSSV/L en el reactor. Además, se determinó la actividad de la biomasa, para poder evaluar el comportamiento de ésta a lo largo de las distintas condiciones de operación. En la Tabla 10, se observan los parámetros analizados en el lodo.

**Tabla 10.** Caracterización del inóculo.

Parámetro	Unidad	Rango
SST	g/L	14,49 ± 0,02
SSV	g/L	9,05 ± 0,02
SSV/SST	-	0,65
VUO	mgO <sub>2</sub> /L·min	0,146 ± 0,006
Actividad heterótrofa	mgO <sub>2</sub> /gSSV·min	0,097 ± 0,023

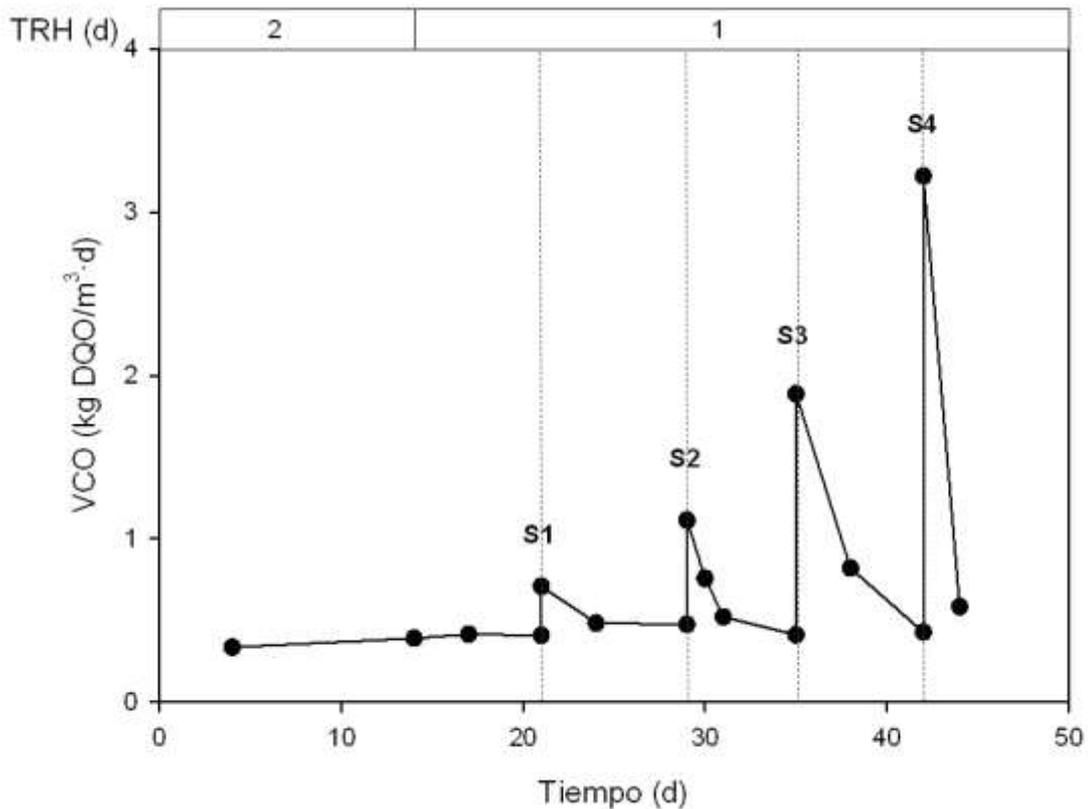
SST: Sólidos Suspendidos Totales; SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles; VUO: Velocidad Utilización de Oxígeno.

El lodo presentó una concentración de SST de 14,49 g/L, de los cuales, 9,05 g/L correspondieron a SSV.

La evaluación de la biomasa, evidenció una tasa de Velocidad de Utilización de Oxígeno (VUO) de 0,146 ± 0,006 mgO<sub>2</sub>/L·min, encontrándose en condiciones óptimas de transferencia de oxígeno para su activación en el reactor. La actividad heterótrofa, con un valor promedio de 0,097 ± 0,023 mgO<sub>2</sub>/gSSV·min inferior a la velocidad de consumo, demuestra el estado de renovación de los microorganismos.

## 5.3. Operación del sistema de lodos activados

Uno de los parámetros fundamentales en la operación de un sistema de lodos activados es la VCO, que junto al TRH, determinan la cantidad de materia orgánica y el tiempo en que esta estará en contacto con la biomasa en el tanque de aireación (Chamorro *et al.*, 2005). En la Figura 11, se observa la evolución en el tiempo de la VCO en el reactor.



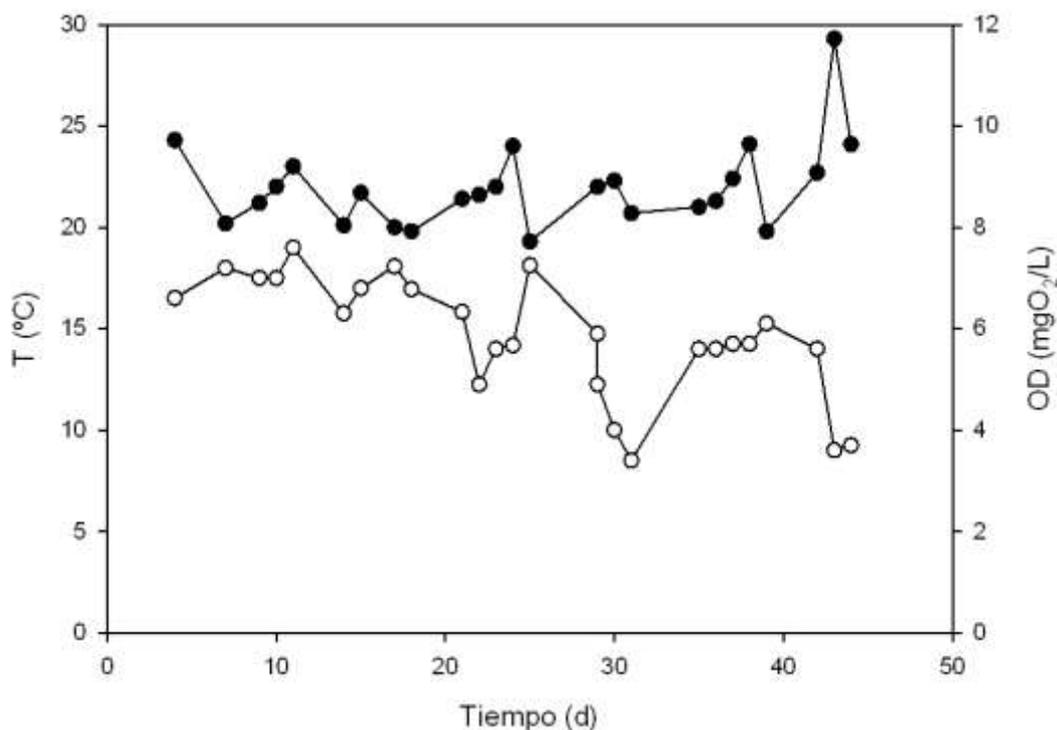
**Figura 11.** Evolución de la Velocidad de Carga Orgánica (VCO) en el reactor, donde S1: Shock 1; S2: Shock 2; S3: Shock 3; S4: Shock 4.

Durante el periodo de operación normal, la VCO se mantuvo relativamente constante, con un valor promedio de  $0,39 \pm 0,04$  kgDQO/m<sup>3</sup>·d.

Específicamente, la VCO osciló entre 0,34-3,22 kgDQO/m<sup>3</sup>·d. El rango de variación tan amplio se debe al aumento progresivo de la VCO por la aplicación de cada shock. Así, a partir del día 22, se observan en la Figura 8, los 4 picos correspondientes a cada shock tóxico. Durante S1 y S2, los valores de VCO fueron 0,71 y 1,11 kgDQO/m<sup>3</sup>·d, respectivamente. Estos valores son 1,8 y 2,9 veces el valor promedio de VCO en operación normal. Finalmente, en S3 la VCO fue de 1,89 kgDQO/m<sup>3</sup>·d, representando un aumento de 4,9 veces, y de 3,22 kgDQO/m<sup>3</sup>·d en S4, implicando un aumento de 8,3 veces.

Como se mencionó anteriormente, junto con la VCO, un parámetro fundamental es el TRH. Entre los días 1 y 14, el TRH fue de 2 d, estableciendo un periodo de puesta en marcha, con el fin de permitir la adaptación de la biomasa a las nuevas condiciones ambientales y operativas. A partir del día 14, el TRH se redujo a 1 d.

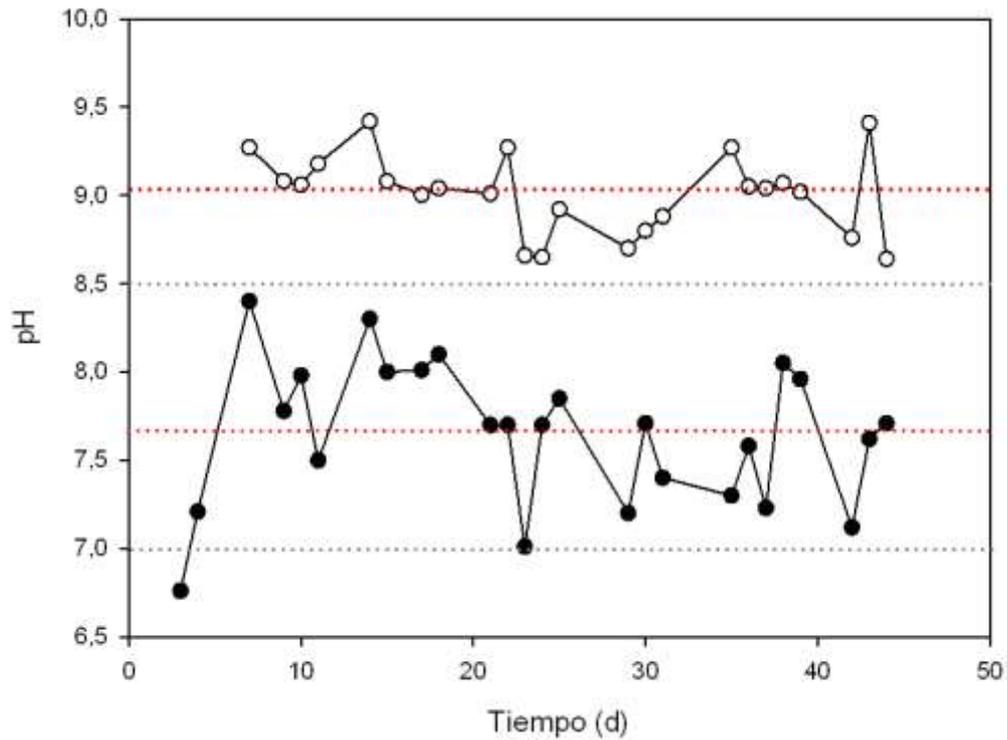
Parámetros operacionales, tales como pH, T y OD, fueron monitoreados en forma continua para llevar un control del sistema. La evolución de la temperatura y el oxígeno disuelto se encuentra en la Figura 12.



**Figura 12.** Evolución de la Temperatura (T) (●) y del Oxígeno Disuelto (OD) (○) en el reactor.

Durante todo el período de funcionamiento, existió una variabilidad tanto para la temperatura como para el oxígeno disuelto, relacionada a los cambios de estacionalidad. El OD se mantuvo, en operación normal y durante los shocks tóxicos, dentro del rango de 3,40-7,60 mgO<sub>2</sub>/L, con un valor siempre superior al sugerido por Diez *et al.* (2002) de 2 mgO<sub>2</sub>/L.

El comportamiento del pH, presentado en la Figura 13, evidenció una tendencia variable en el tiempo, tanto para el influente y efluente, señalando los valores promedio para ambos, según el estudio realizado (rojo) y el valor de referencia en condiciones óptimas de operación (gris).

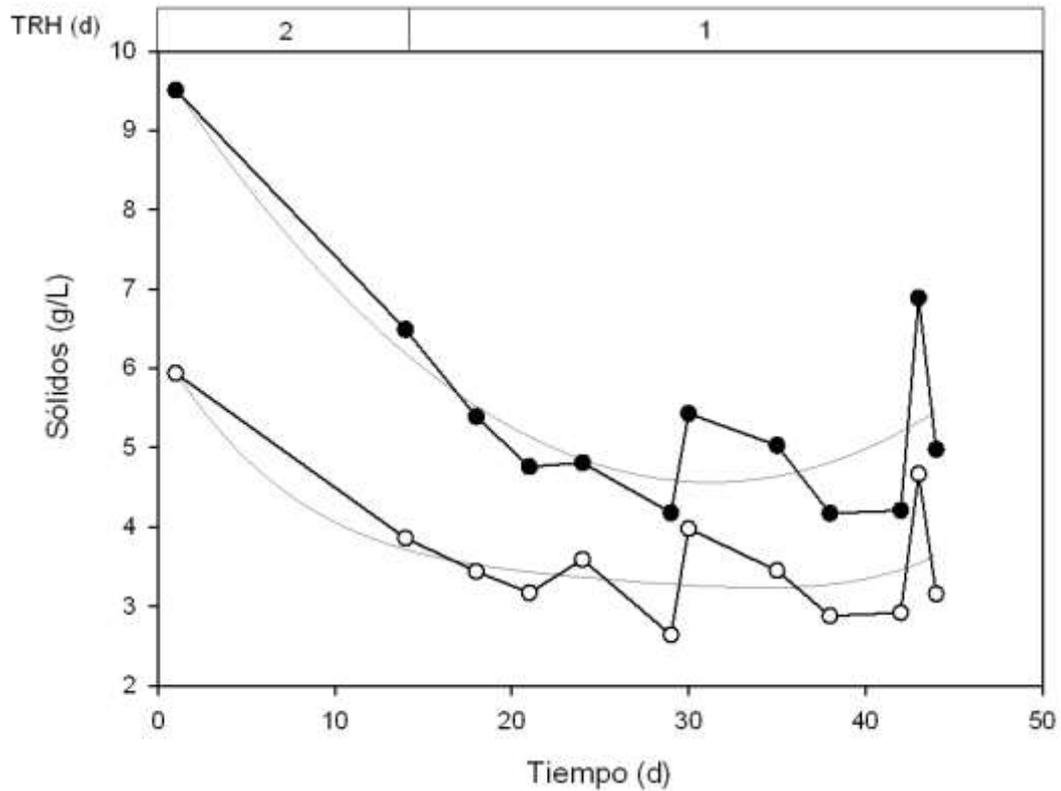


**Figura 13.** Evolución del pH en el influente (●) y en el efluente (○) del reactor.

En el influente, el pH promedio fue de  $7,65 \pm 0,41$ , siendo correcto para el desarrollo de los microorganismos, tanto en la condición de operación normal como de shock tóxico. Sin embargo, un ajuste más cuidadoso, con un valor promedio de  $7,20 \pm 0,20$ , hubiera favorecido a la operación del sistema.

Por otro lado, en el efluente, se observó un aumento del pH, con un valor promedio de  $9,01 \pm 0,23$ . Esta situación se produjo, tanto en condición normal, como de shock tóxico y, además de verse afectado por valores de pH de entrada al reactor algo elevados, pudo ser consecuencia de la degradación de microorganismos que generan un aumento del pH en el reactor y por tanto en el efluente, lo que también fue reportado por Vergara (2013) (Ramalho, 1996).

Otro parámetro estudiado, fue la concentración de sólidos, que indica la cantidad de materia orgánica e inorgánica del reactor. La Figura 14, presenta la concentración de biomasa en el reactor durante el período de operación.



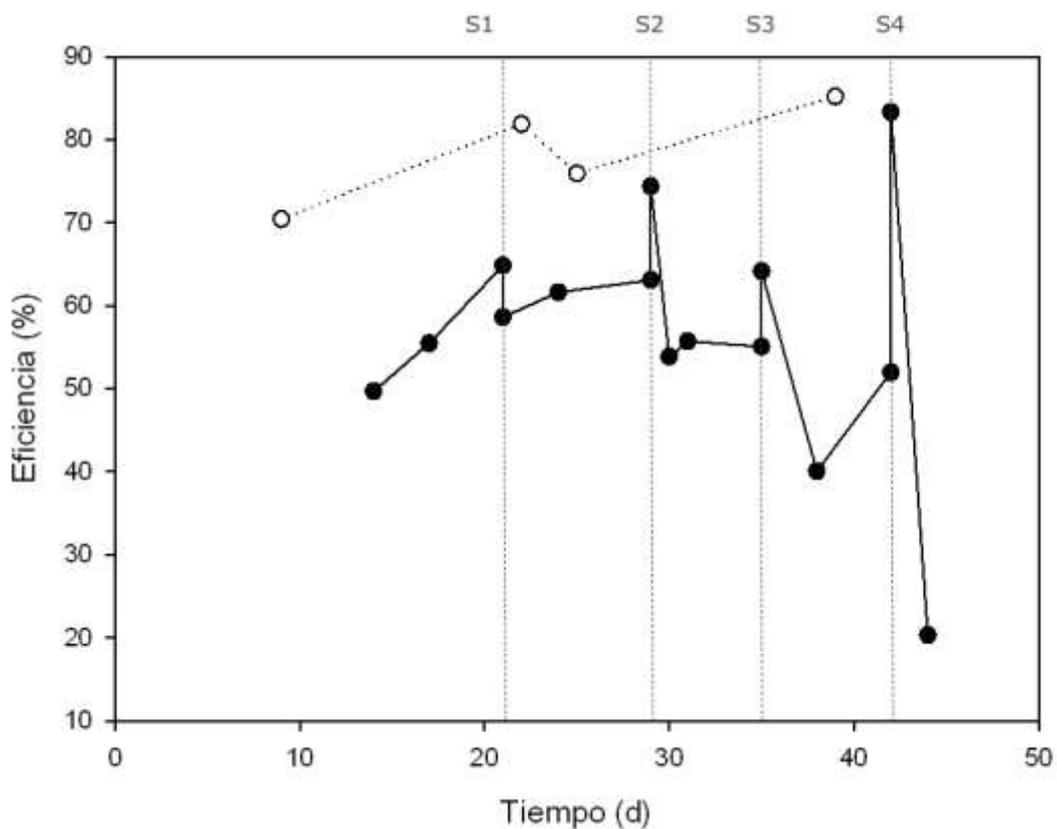
**Figura 14.** Concentración de SST (●) y SSV (○) en el reactor.

En particular, los SSV representan la biomasa en el tanque de aireación, la cual osciló entre 2,64–5,94 g/L. Dicha concentración, coincide con la reportada por Xavier *et al.* (2009), operando un sistema de lodos activados con 2-6 gSSV/L. Cabe señalar que la concentración de sólidos se mantuvo dentro de los niveles de la condición de operación normal, durante todos los shocks aplicados. Lo anterior, debido a la tasa de recirculación, que permitió mantener estable la concentración de sólidos en el reactor y a que no se presentó ningún fenómeno que implicara la salida de biomasa del sistema. El valor promedio de la relación SSV/SST durante la operación del sistema de lodos activados fue de  $0,67 \pm 0,05$ .

#### 5.4. Eficiencias de eliminación de materia orgánica, color y compuestos específicos

Como consecuencia de la operación del sistema, asociada a los parámetros anteriormente analizados, se obtiene una eficiencia de eliminación de materia orgánica, la cual es el objetivo del sistema de tratamiento. Asimismo, a partir de esta eficiencia, es posible establecer una condición de estabilidad en el reactor. De esta manera, cuando el sistema presenta eficiencias de eliminación de DQO de alrededor de un 60-65% y de DBO<sub>5</sub> de un 95%, se considera estable (Metcalf y Eddy, 2003; Sandberg, 2009).

La Figura 15, muestra la eficiencia de eliminación de materia orgánica obtenida durante la operación del reactor en términos de DQO y DBO<sub>5</sub>.

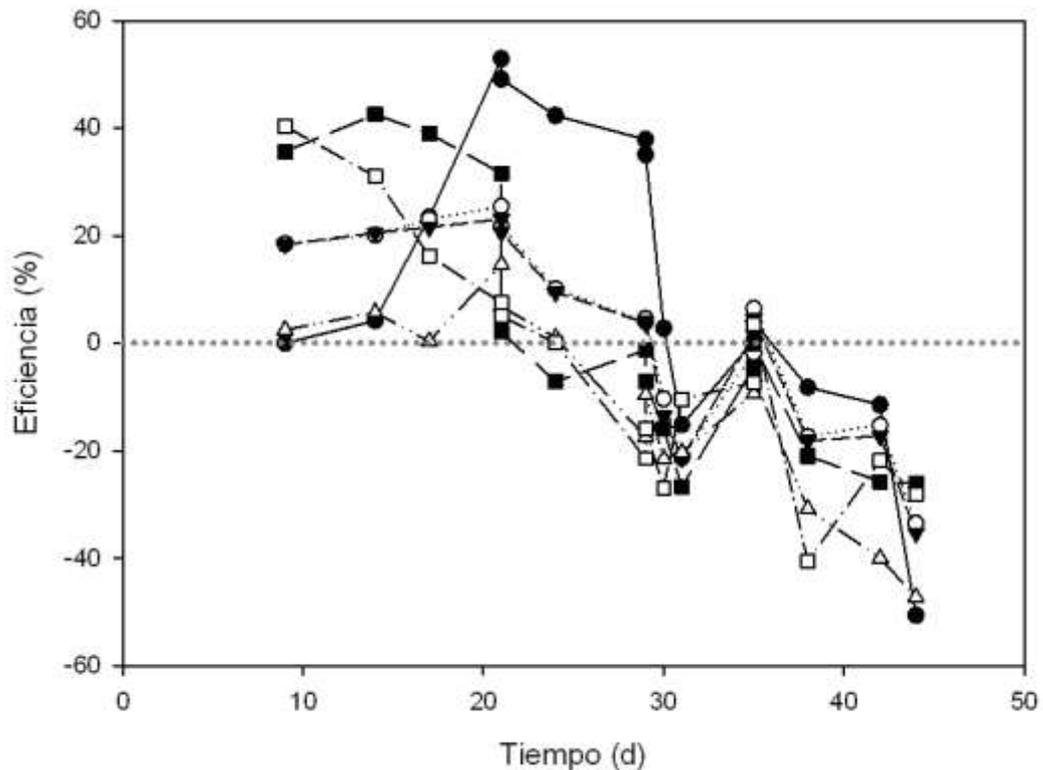


**Figura 15.** Evolución de las eficiencias de eliminación de DQO (●) y DBO<sub>5</sub> (○) en el reactor, donde S1: Shock 1; S2: Shock 2; S3: Shock 3; S4: Shock 4.

Para la operación normal del reactor, la eficiencia promedio de eliminación de DQO fue de  $56,6 \pm 7,7\%$ , alcanzando un máximo de  $64,84\%$  en el día 14. Por su parte, la eficiencia de eliminación de  $DBO_5$  fue de  $78,3 \pm 6,5\%$ , con un máximo medido de  $85,1\%$ .

A partir del día 21, se observan oscilaciones en la eficiencia de eliminación de DQO con respecto a la condición de operación normal. Los análisis realizados después de S1, evidenciaron una eliminación de DQO de un  $71,67\%$ . Cuando el reactor vuelve a ser alimentado con influente normal, la eficiencia decae a valores cercanos al  $50\%$  de eficiencia, y se vuelve estable y similar a la de la operación normal. Es a partir del día 35, cuando se observan, marcadas oscilaciones, debido al ingreso de cargas orgánicas significativamente superiores. Durante S3, la VCO fue 4,9 veces superior al promedio. En tanto, durante S4, se aplicó una VCO 8,3 veces superior a la normal, lo que se evidenció en la eficiencia de eliminación, ya que el día 44, dos días después de la aplicación de S4, es cuando se obtuvo el valor más bajo de eficiencia ( $20,34\%$ ).

El efluente de celulosa kraft, presenta además, compuestos característicos, como ligninas y derivados, fenoles y color, los que pueden ser eliminados por el sistema de lodos activados. En la Figura 16, se observa la eficiencia de eliminación de compuestos en el reactor.



**Figura 16.** Eficiencia de eliminación de color (●), lignina (UV 280 nm) (○), lignina (UV 272 nm) (▼), ácidos lignosulfónicos (△), compuestos aromáticos (■) y fenoles totales (□) en el reactor.

Hasta el día 21, considerado período de operación normal, para el color, la eliminación osciló entre 0,00 – 52,90 %. Por su parte, para fenoles totales el rango fue de 7,50 – 40,34%.

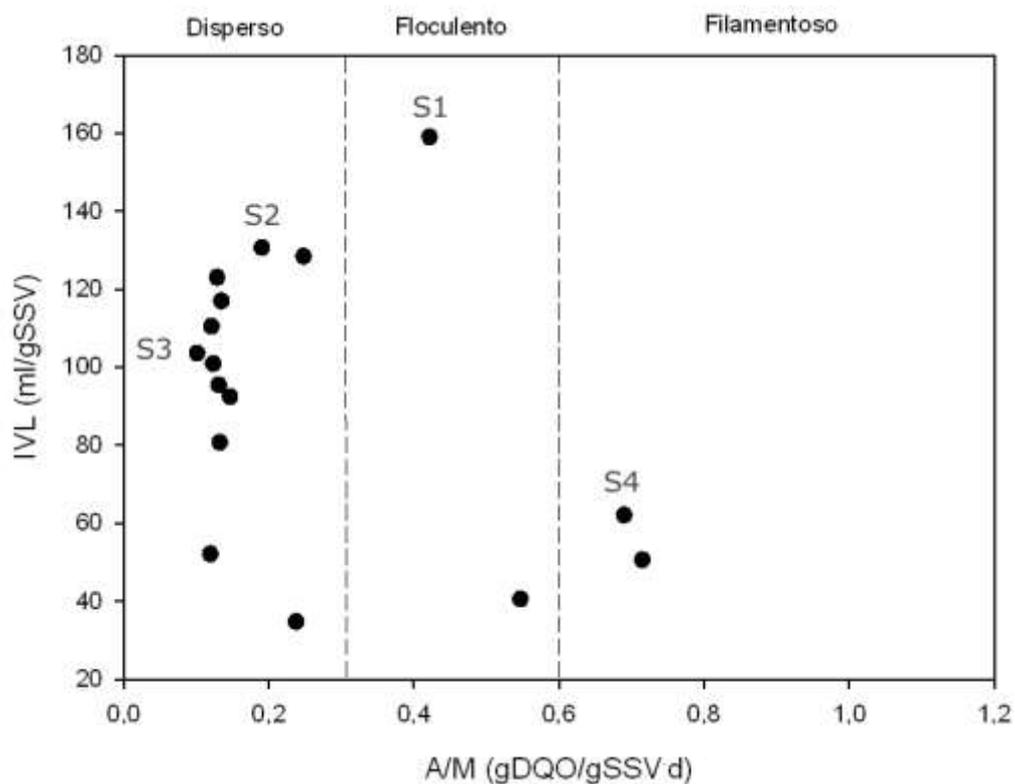
El día 31 se registra la menor eficiencia de eliminación hasta entonces, coincidiendo con las 48 horas después de la aplicación de S3. Es a partir de ese momento cuando las eficacias sufren variaciones (aumentos breves) pero con una tendencia decreciente llegando a 50,65% de eliminación de color al aplicar S4. Esta situación, ha sido documentada para sistemas de tratamiento biológico aeróbico, en que el color aumentó entre 10-40% en algunos períodos. Respecto a los máximos alcanzados, se ha establecido que el color en los efluentes de celulosa kraft está estrechamente relacionado con el contenido de compuestos fenólicos, la lignina y sus derivados. Por esta razón, la pobre eliminación, podría relacionarse con la resistencia de estos compuestos para ser biodegradados (Xavier *et al.*, 2009). En este caso, las eficiencias de eliminación de lignina y sus derivados, compuestos aromáticos y ácidos lignosulfónicos, estuvieron entre, 35,28–25,43%, 26,68–42,51% y 47,20–14,68%, respectivamente.

A raíz de la aplicación de los shocks, se observa una disminución progresiva en la eficiencia de eliminación de compuestos y color. Desde la aplicación de S2, eficiencia de eliminación de compuestos aromáticos, lignina y sus derivados, disminuye hasta llegar a un mínimo de 50,65%, 2 días después de S4.

### 5.5. Evolución del índice volumétrico del lodo

Durante todo el proceso de operación, se obtuvo un rango de IVL de 34,78–159,09 mL/gSSV, con un valor promedio de  $92,64 \pm 36,25$  mL/gSSV. Durante los shocks tóxicos S1, S2, S3 y S4, los valores de IVL fueron de  $135,97 \pm 24,35$ ,  $113,07 \pm 24,87$ ,  $37,68 \pm 4,10$  y  $56,37 \pm 8,11$  mL/gSSV, respectivamente. Se obtuvo un rango de variabilidad de 37–135 mL/gSST para todos los shocks, encontrándose siempre el IVL dentro del rango óptimo.

Es posible relacionar el IVL con la relación A/M, con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica del lodo y su capacidad de sedimentación en conjunto, lo cual es presentado en la Figura 17.

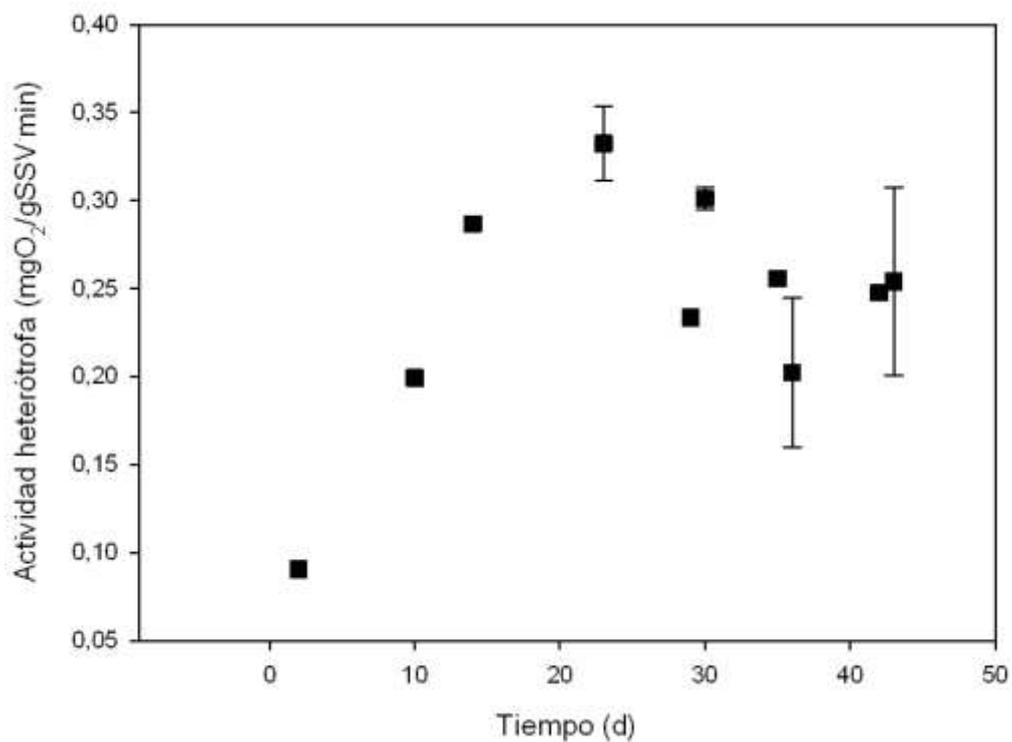


**Figura 17.** Relación entre IVL y relación Alimento/Microorganismos (A/M) observada en el reactor, donde S1: Shock 1; S2: Shock 2; S3: Shock 3; S4: Shock 4.

Se observa que el lodo tuvo durante el período de operación normal (antes de la aplicación de los shocks tóxicos, un promedio de A/M de un promedio de A/M de  $0,15 \pm 0,05$  gDQO/gSSV·d, con un valor máximo de 0,25, siendo siempre inferior a 0,3 gDQO/gSSV·d. Con estas condiciones, la biomasa presentaría características de lodo disperso, siendo considerado de sedimentación deficiente. Sin embargo, según lo observado durante los ensayos, evidenciado en los valores de IVL, el lodo de ambos reactores presentó buena sedimentación. Durante S1, se alcanza el mayor valor de IVL con 159,09 mL/gSSV con una A/M de 0,42 (gDQO/gSSV·d), clasificando el lodo como floculento, mientras que S2 y S3, hacen del sistema un lodo disperso, de baja sedimentabilidad. S4 presenta un valor de IVL de 62,19 mL/gSSV y una A/M de 0,69 (gDQO/gSSV·d), evidenciando un lodo filamentoso.

## **5.6. Evolución de la actividad de la biomasa**

De acuerdo al metabolismo de las bacterias aeróbicas, la materia orgánica biodegradable, es usada en parte como energía para respiración y el resto en la síntesis de nuevas células (Ramalho, 1996). El análisis respirométrico de la biomasa, permite establecer en forma preliminar la tasa de consumo de oxígeno y correlacionarla con la velocidad de consumo de materia orgánica (Villamar, 2009). Específicamente, la Velocidad de Utilización de Oxígeno (VUO) puede ser expresada por unidad de biomasa, denominándose velocidad de utilización de oxígeno específica y en este caso, actividad heterótrofa, la que se aprecia en la Figura 18.

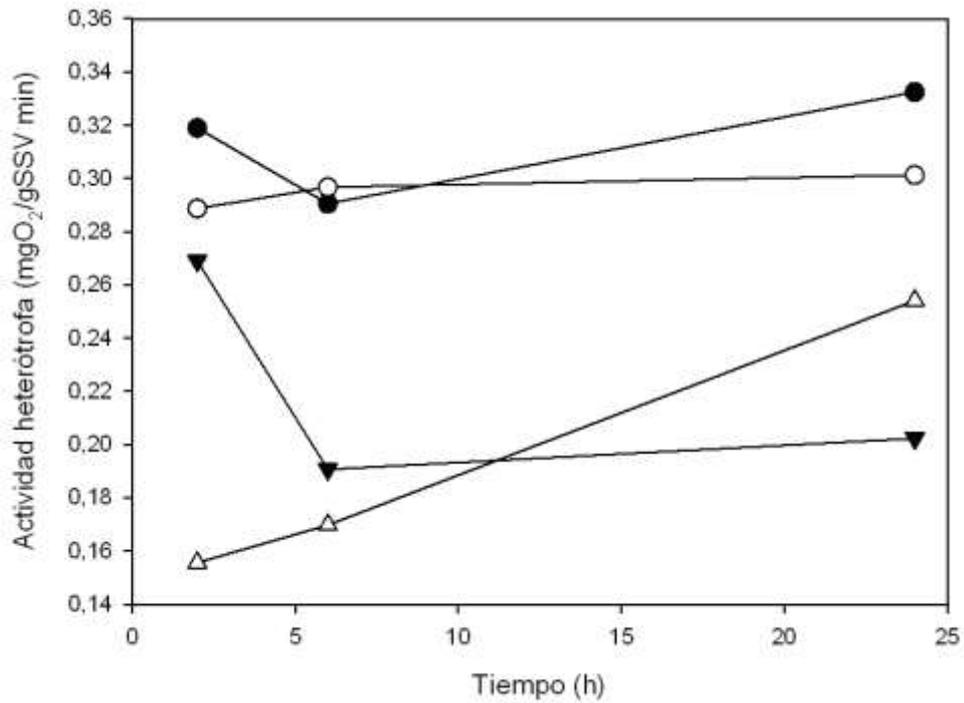


**Figura 18.** Evolución de la actividad heterótrofa en el reactor.

La actividad heterótrofa varió en un rango de 0,091-0,332 mgO<sub>2</sub>/gSSV·min, en el reactor.

El valor mínimo obtenido durante los shocks fue alcanzado el día 36, a las 24 horas de aplicación del S3, para luego mostrar un pequeño aumento, lo cual coincide con un incremento de la temperatura debido a cambios en la estacionalidad.

Los valores obtenidos para la actividad heterótrofa de la biomasa durante los días de aplicación de shock, se dan a conocer en la Figura 19.



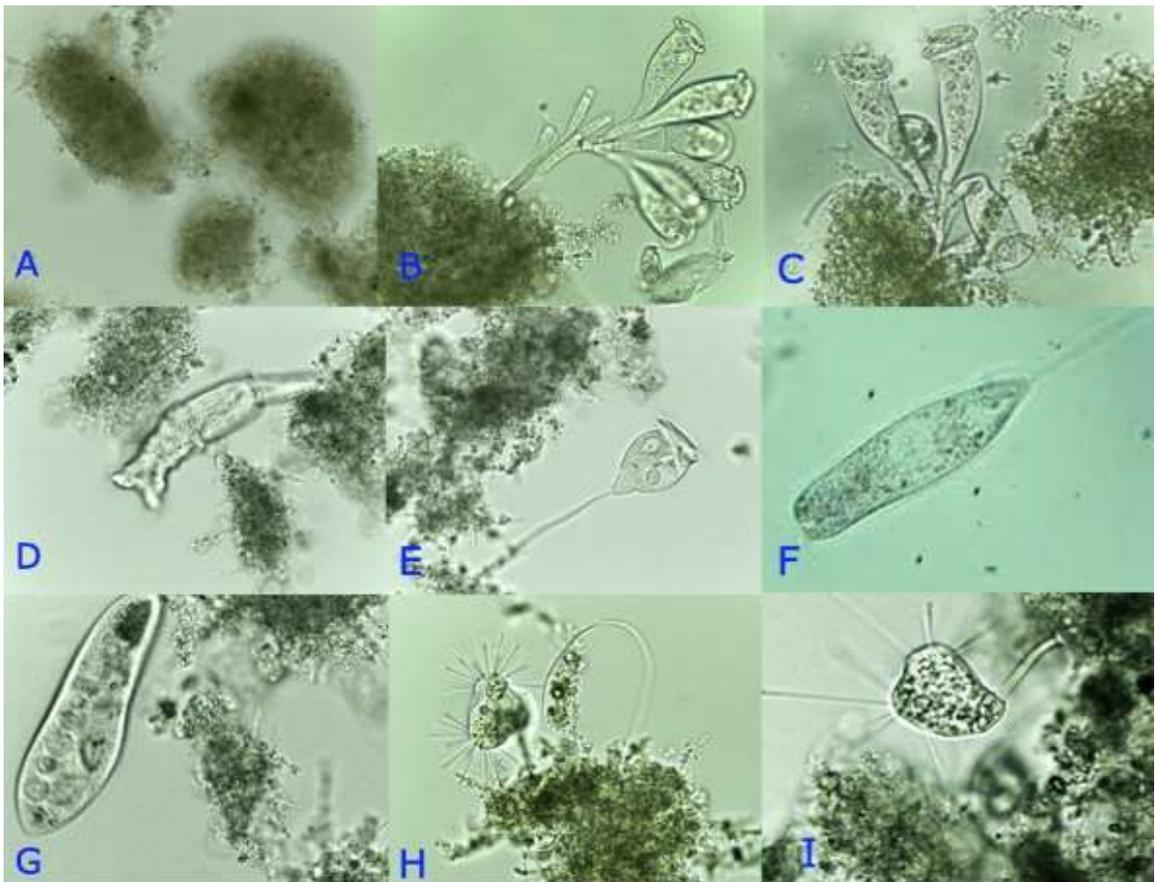
**Figura 19.** Evolución de la actividad heterótrofa en el reactor durante shocks tóxicos, S1 (●), S2 (○), S3 (▼), y S4 (△).

Las mediciones de la actividad de la biomasa se realizaron en la hora, 2, 6 y 24 de cada shock. Se observó que en la hora 2, para S1, S2 y S3, el valor de actividad heterótrofa fue similar, 0,32, 0,29 y 0,27 mgO<sub>2</sub>/gSSV·min, respectivamente. En tanto que en S4, fue de 0,16 mgO<sub>2</sub>/gSSV·min.

En la hora 6, la actividad se mantuvo prácticamente constante para S2 y S3, en tanto que para S1, disminuyó a 0,29 mgO<sub>2</sub>/gSSV·min y para S2 aumentó a 0,30 mgO<sub>2</sub>/gSSV·min. S4 aumentó a 0,17 mgO<sub>2</sub>/gSSV·min, y fue S3 quien experimentó el descenso más pronunciado, con una diferencia de 0,08 unidades. Por otro lado, en la hora 24, se presentó un aumento en la actividad heterótrofa, en S1, S2 y S4, alcanzando valores entre 0,25 y 0,33 mgO<sub>2</sub>/gSSV·min. Sin embargo, en S3 se observó una variación casi inexistente de 0,19 a 0,20 mgO<sub>2</sub>/gSSV·min, valor siempre dentro de los rangos usuales de actividad.

## 5.7. Microbiología del lodo

Mediante la microscopía óptica, se realizó la observación de los microorganismos existentes en el lodo del reactor, los cuales son presentados en la Figura 20. A partir de esta observación, fue posible conocer la diversidad de microfauna del sistema, la cual corresponde a un indicador de estabilidad de operación, siendo una herramienta útil para establecer la situación de operación normal, la que luego fue comparada, con la condición de shock tóxico.



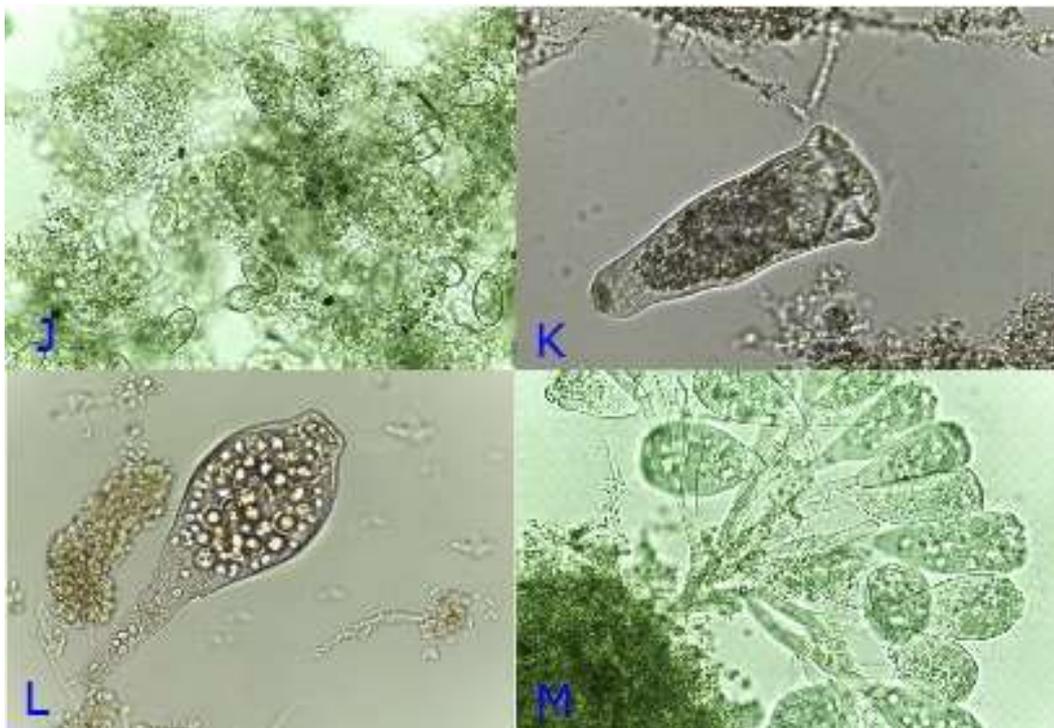
**Figura 20.** Microorganismos observados en el reactor en condición de operación normal. A: Flóculo; B, C y E: Ciliados fijos; D: Rotífero; F: Flagelado; G: Ciliado móvil; H e I: Ciliados suctores.

Es posible observar el flóculo unidad estructural del lodo activado, que presentó una estructura compacta, predominante en el periodo de operación normal, y de tamaño medio, entre 150-500  $\mu\text{m}$ .

Alrededor del flóculo, nadando libremente, se identificaron flagelados, como *Euglena sp.* y ciliados libres, como *Paramecium sp.* Estos últimos están

presentes en la iniciación del sistema e indican un buen proceso de depuración (Villaseca, 2001). Asociados al flóculo, se observaron, ciliados suctores, como *Acineta sp.*, relacionados con la eliminación de fenoles (Papadimitriou *et al.*, 2007). Asimismo, adheridos al floculo, se encontraron ciliados pedunculados, como *Vorticella sp.*, y *Opercularia sp.*, los cuales son frecuentes cuando el tratamiento funciona correctamente, ya que, su capacidad de fijación supone una ventaja adaptativa en este sistema, siendo eliminados en el efluente los microorganismos que no la poseen. También fueron observados, rotíferos, que indican un lodo maduro, ya establecido (Mas *et al.*, 2008).

El análisis microscópico durante los shocks tóxicos, dio a conocer cambios en la microbiología del lodo. Durante S1 y S2, la microfauna del lodo tuvo similares características a la observada en la condición normal de operación. A partir del S3, se comienzan a evidenciar cambios en la microfauna y específicamente en S4, los ciliados fijos, presentaron estructuras de acumulación de alimento (vacuolas) visiblemente más grandes que las observadas durante operación normal. Lo anterior, debido a que al aumentar la carga orgánica, existió una mayor disponibilidad de alimento, el que fue almacenado. Se observaron además, una mayor cantidad de ciliados suctores y nadadores libres.



**Figura 21.** Alteraciones del sistema observadas durante Shock 4. J: Estructura externa de amebas, sin organismo (Teca); K: Ciliado fijo sin pedúnculo (lodo poco compacto); L y M: Acumulación de alimento en ciliados fijos.

Durante todos los shocks fue posible observar la formación de espuma, siendo muy abundante durante S3 y S4, pudiendo ser explicada por la presencia de ácidos grasos en licor negro, que forman espuma en ambientes de pH alto (9–10) (Sandberg and Holby, 2008). Además, el efluente adoptó un color negro muy oscuro, que aumentaba progresivamente su intensidad conforme el influente contenía mayores cantidades de licor negro.

## **5.8. Toxicidad**

### **5.8.1. Bioensayo con *Daphnia magna***

Los resultados del bioensayo llevado a cabo con *Daphnia magna* para la determinación de la toxicidad, presentados en la Tabla 11, muestran que S1, S2, S3 y S4 no presentan toxicidad aguda, no pudiendo establecer la concentración letal (LC<sub>50</sub>).

En los resultados obtenidos para el S3, se evidencia mayor mortalidad que en S1 y S2, pero menor que en S4, aún siendo este último el shock con mayor concentración de licor negro aplicado (30 mL licor/L).

De acuerdo con la observación microscópica del organismo de ensayo tras la realización del mismo, se calculó el porcentaje de deformación (Tabla 11) en cuanto a alteraciones en la espina caudal y acortamiento del rostro, evidenciándose una mayor deformidad para ambos efectos en S3 y S4, y conforme aumenta la concentración del efluente (50 y 100%).

**Tabla 11.** Resultados del ensayo de toxicidad con *Daphnia magna* en términos de LC<sub>50</sub>, y porcentaje de deformidad en cuanto a alteraciones en espina caudal y rostro.

Muestra	Resultado	% Deformidad (según % de dilución)					
		Efluente	48h LC <sub>50</sub>	6,25%	12,5%	25%	50%
<b>S1</b>	N.D		0	0	0	10% espina caudal 20% rostro	10% espina caudal
<b>S2</b>	N.D		0	10% espina caudal	20% espina caudal	20% espina caudal 10% rostro	10% espina caudal
<b>S3</b>	N.D		0	0	20% espina caudal 30% rostro	0	0
<b>S4</b>	N.D		20% espina caudal	30% espina caudal	30% espina caudal 10% rostro	20% espina caudal 20% rostro	30% espina caudal 10% rostro

N.D: No detectado

También resultó evidente una variación en la longitud del cuerpo y el abdomen a medida que el organismo se expone a mayor concentración de efluente tóxico, parámetros que fueron cuantificados según Xavier *et al.* (2005), determinando la relación longitud/abdomen como tasa de crecimiento alométrica (TCA), y cuyos valores se presentan en la Tabla 12.

<b>Shock</b>	Tratamiento	Cuerpo (mm)	Abdomen (mm)	% TCA
	Control	0,034 ± 0,001	0,047 ± 0,008	72,91
<b>S1</b>	12,50%	0,037 ± 0,001	0,034 ± 0,003	106,09
	25%	0,034 ± 0,004	0,038 ± 0,008	90,12
	50%	0,040 ± 0,006	0,037 ± 0,004	108,79
	100%	0,043 ± 0,003	0,045 ± 0,004	95,99
<b>S2</b>	12,50%	0,039 ± 0,004	0,037 ± 0,007	105,14
	25%	0,041 ± 0,003	0,043 ± 0,005	95,76
	50%	0,036 ± 0,011	0,061 ± 0,008	56,08
	100%	0,037 ± 0,007	0,065 ± 0,012	56,35
<b>S3</b>	12,50%	0,033 ± 0,002	0,033 ± 0,002	64,54
	25%	0,032 ± 0,004	0,032 ± 0,004	61,96
	50%	0,037 ± 0,004	0,037 ± 0,004	64,52
	100%	0,055 ± 0,011	0,055 ± 0,011	68,68
<b>S4</b>	12,50%	0,037 ± 0,001	0,057 ± 0,002	106,09
	25%	0,045 ± 0,004	0,064 ± 0,005	90,12
	50%	0,043 ± 0,006	0,068 ± 0,007	108,79
	100%	0,052 ± 0,006	0,075 ± 0,009	95,99

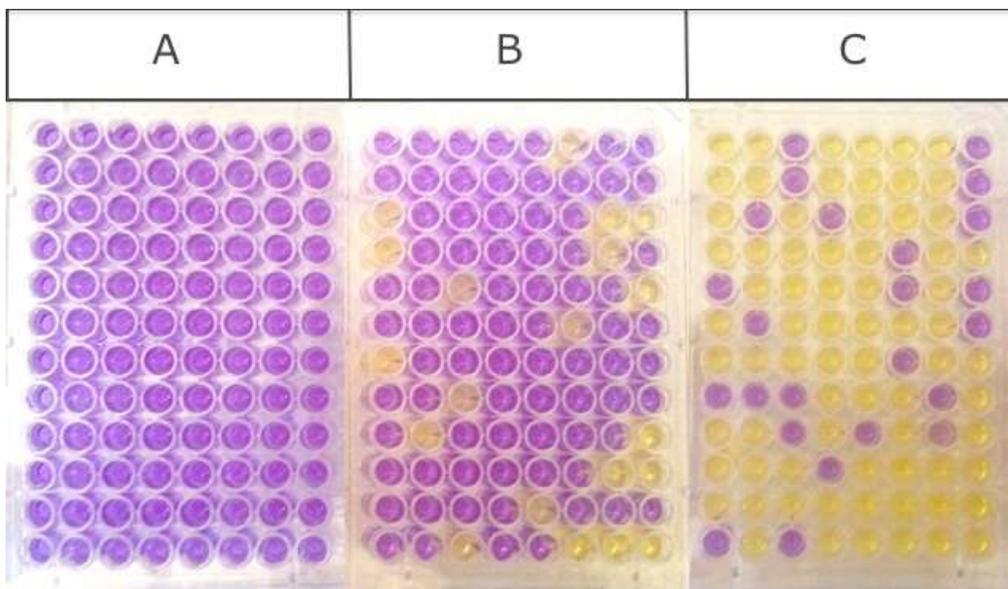
**Tabla 12.** Longitud total del cuerpo, abdomen y relación de tasa alométrica en *Daphnia magna*.

En el ANEXO I, se indican de manera gráfica algunas de las deformaciones a las que se hace referencia anteriormente, de los organismos sometidos al estudio de toxicidad para cada uno de los shocks tóxicos aplicados a diferentes concentraciones de ensayo.

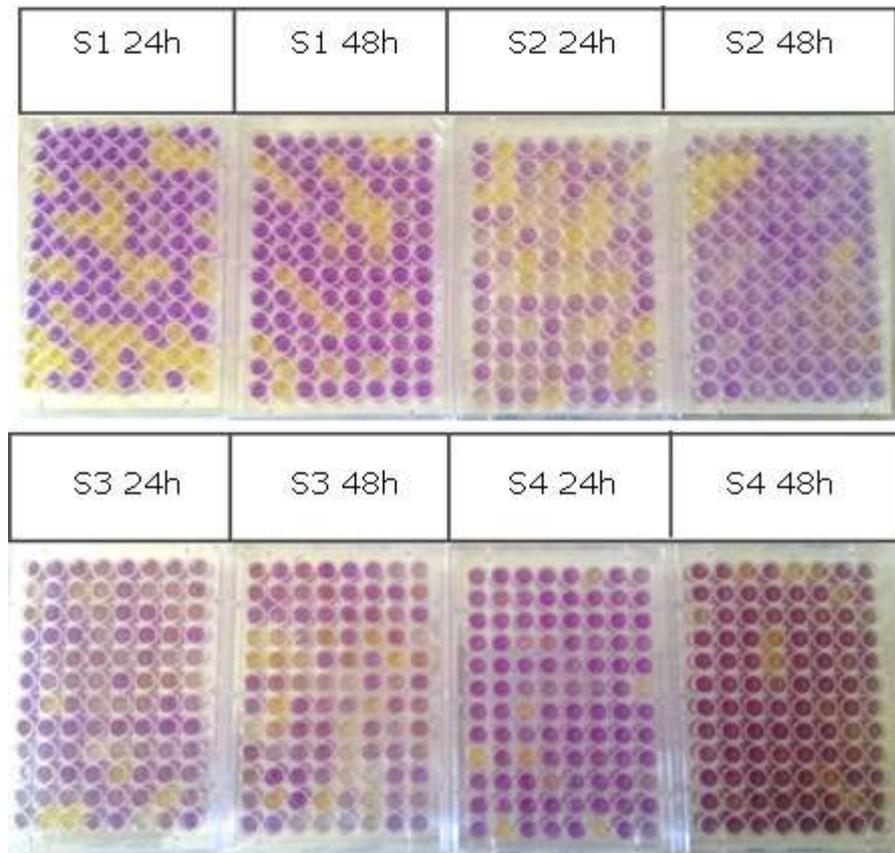
### 5.8.2. Ensayo de mutagenicidad: Test de Ames

El kit de ensayo utilizado para evaluar la mutagenicidad del efluente de celulosa se basa en una alternativa práctica del test de Ames, conocida como test de Fluctuación (Gilbert, 1980), la cual detecta la inducción de la mutación en un cultivo bacteriano en medio líquido por un cambio de color en las celdas de púrpura a amarillo.

Tras 5 días de incubación a 37 °C, se obtienen los resultados finales del ensayo. En las figuras 22 y 23, se muestran las diferentes placas de ensayo con los cambios de color, indicativos de inducción mutagénica.



**Figura 22.** Placas test mutagenicidad. A: Blanco (control de esterilidad); B: Background (indicativo de la tasa de mutación inversa natural); C: Control positivo (con material mutagénico estándar incluido en el kit).



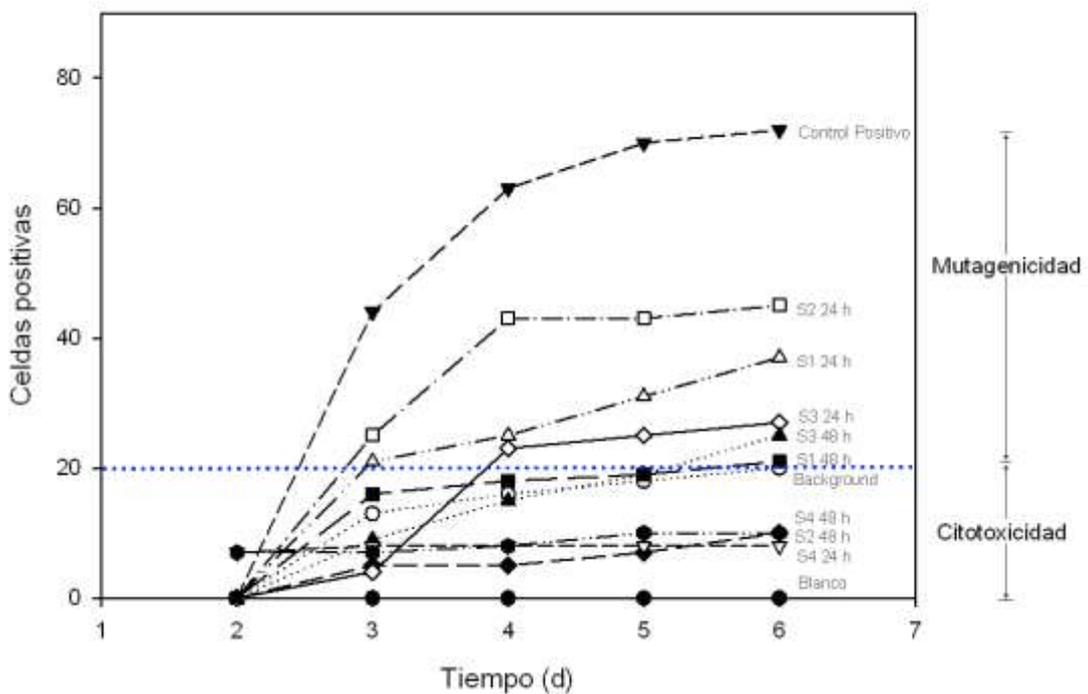
**Figura 23.** De izquierda a derecha, y de arriba a abajo: Placas correspondientes a S1 24 horas, S1 48 horas, S2 24 horas, S2 48 horas, S3 24 horas, S3 48 horas, S4 24 horas, S4 48 horas.

Los resultados positivos (color amarillo) indican que, con base a las condiciones de la prueba, una muestra induce mutaciones de punto por sustitución de bases o del tipo frameshift en el genoma de estos microorganismos. Por otra parte, los resultados negativos (color púrpura) indican que, con base a las condiciones de la prueba, la muestra no presenta actividad mutagénica frente a las cepas probadas de *S. typhimurium* (Ames *et al.*, 1975).

**Tabla 13.** Resultados ensayos Muta-ChromoPlate

Muestra		N ° de pocillos positivos			Resultado
		Día 3	Día 4	Día 5	
	Blanco	0	0	<b>0</b>	-
	Background	16	18	<b>20</b>	-
	Control positivo (estándar)	63	70	<b>72</b>	-
Influente S1	24 horas	25	31	<b>37</b>	Mutagenicidad con un 99% de significancia
	48 horas	18	19	<b>21</b>	
Influente S2	24 horas	43	43	<b>45</b>	Mutagenicidad con un 99,9% de significancia Posible citotoxicidad
	48 horas	5	7	<b>10</b>	
Efluente S3	24 horas	23	25	<b>27</b>	Posible citotoxicidad
	48 horas	15	19	<b>25</b>	Posible citotoxicidad
Efluente S4	24 horas	8	8	<b>8</b>	Posible citotoxicidad
	48 horas	8	10	<b>10</b>	Posible citotoxicidad

En la Figura 24 se muestra la evolución de cada placa con referencia a la inducción de mutación, indicada como mayor número de celdas positivas (color amarillo). El control positivo representa el máximo nivel de inducción de mutación. Se establecen como mutagénicos los efluentes de baja concentración de licor negro S1 (24 y 48 horas) y S2 (24 horas), cuya tasa de inducción es muy elevada, y S3 (24 y 48 horas) en menor medida. Se evidencia citotoxicidad (muerte celular) en S2 (48 horas) y, en las muestras de efluente con la mayor concentración de licor negro (30 ml/L) S4 (24 y 48 horas), con inducción prácticamente nula de la mutación.



**Figura 24.** Evaluación de la inducción de mutación en el tiempo. Blanco (●); Background (○), Control positivo (▼), S1 24h (△), S1 48h (■), S2 24h (□), S2 48h (♦), S3 24h (◇), S3 48h (▲), S4 24h (▽) y S4 48h (-●-).

## 6. DISCUSION

### 6.1 Influyente de celulosa e inóculo: Parámetros fisicoquímicos

El proceso de celulosa Kraft, se caracteriza por generar aguas residuales con altas concentraciones de materia orgánica medida como Demanda Biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) de hasta 13,3 gDBO<sub>5</sub>/L y 39,8 gDQO/L, respectivamente y los sólidos suspendidos pueden alcanzar valores hasta 6,1 g/L (Bajpai, 2000). Con el fin de evitar los efectos ambientales de este tipo de efluentes, tecnologías aeróbicas biológicas tales como los sistemas de lodos activados son ampliamente utilizados (Chamorro *et al.*, 2009).

Caracterización del influente de celulosa se presentan en la Tabla 8. Este presentó valores de DQO y DBO<sub>5</sub> de 477,13 ± 76,10 y 345,00 ± 4,20 mg/L respectivamente. Valores similares fueron registrados en investigaciones relativas al efluente del tratamiento primario de la industria de celulosa kraft, con rangos de 444,5-491,4 mg/L para DQO y de 150,0-168,0 mg/L para DBO<sub>5</sub> descritos en Pozo *et al.* (2011), y Villamar *et al.* (2009). La relación de biodegradabilidad DBO<sub>5</sub>/DQO presenta un valor de 0,92 evidenciando que es un vertido que se puede depurar de forma biológica. Sin embargo, existe la presencia de compuestos recalcitrantes como compuestos aromáticos, lignina y sus derivados que, además de aportar valor a la DQO, son causantes del color en el efluente, con un promedio de absorbancia de 0,15 ± 0,03 (Diez *et al.*, 2002; Pozo, 2010; Villamar *et al.*, 2009). Por su parte, la concentración de fenoles totales 150,30 ± 57,83 mg/L, se encuentra dentro de los valores registrados por Villamar *et al.* (2009), y Chamorro *et al.* (2005), con rangos 117,2 - 150,0 mg/L y 190,0 - 350,0 mg/L, respectivamente. Derrames inesperados de licor negro en este tipo de efluentes pueden alterar la carga orgánica aumentando la concentración de DQO en el influente entre, 888-1965 mg/L en 24h, las que consideran un aumento entre 154-243% con respecto al influente normal (Sandberg, 2009). Estos valores coinciden con lo observado en este estudio, donde shocks de licor negro aplicados en concentraciones de 2 a 4, mL/L efluente (S1-S2), evidencian una alza en la DQO de 158 y 248%, respectivamente, que ingresa en el sistema.

La conductividad eléctrica (CE) por su parte, también se ve incrementada de manera proporcional, con valores de 3,47, 3,79, 4,53 y 6,35 mS, para S1, S2, S3 y S4.

Otros parámetros igualmente importantes para condiciones óptimas del sistema son temperatura, oxígeno disuelto y pH. Las variaciones de pH en cuanto a la neutralidad constante a la entrada del reactor, son un factor a tener en cuenta, puesto que se ha determinado que la neutralización del pH de un influente tóxico, implica un menor impacto de éste en el sistema de biológico y una menor alteración de su funcionamiento (Sandberg and Holby, 2008). Este último parámetro, tuvo un valor promedio de  $7,65 \pm 0,41$  en entrada del reactor, tanto en condición normal como de shock tóxico, variando en ocasiones hasta valores de 8,4. Debido a esto, el influente no entró al reactor en las condiciones realmente óptimas, pudiendo afectar al correcto funcionamiento del sistema. Este ajuste de pH es importante, ya que se ha establecido que para un mismo shock con licor negro, un pH normal en el influente, produce una menor inhibición de la biomasa que un pH no estabilizado (Sandberg, 2008).

La relación SSV/SST es importante debido a que a partir de ella se puede establecer el comportamiento potencial de bacterias activas útiles para la degradación efectiva de la materia orgánica compleja presente en efluente, ya que estos porcentajes se asocian a la biomasa formada. El valor típico de esta relación para un tratamiento biológico es de un 0,70 de biomasa viable, la cual es entendida como la cantidad de biomasa presente en el reactor aerobio referida al contenido celular. El valor promedio durante la operación del sistema de lodos activados fue de  $0,67 \pm 0,05$ , evidenciando un comportamiento efectivo de las bacterias en cuanto al proceso de depuración. Es evidente una tendencia decreciente de la biomasa en el reactor por la aplicación progresiva de los shocks, al tratarse de un influente de entrada de carácter muy tóxico. Inicialmente valores de actividad heterótrofa de la biomasa fue de  $0,097 \pm 0,023$  mgO<sub>2</sub>/gSSV·min y velocidad de utilización de oxígeno (VUO) fue de  $0,146 \pm 0,006$  mgO<sub>2</sub>/L·min. Estos valores se encuentran por debajo de lo observado por Pozo *et al.* (2011), donde indica valores para VUO de  $0,30 \pm 0,01$  mgO<sub>2</sub>/L·min y para actividad heterotrofa de  $0,12 \pm 0,02$  mgO<sub>2</sub>/gSSV·min. En este caso, valores menores pueden deberse a que es necesario considerar un periodo de tiempo de adaptación de la biomasa a las condiciones de tratamiento y una vez acondicionada, es previsible que ésta alcance su máxima actividad.

## 6.2 Performance del reactor

En la industria de celulosa es ampliamente conocida la tecnología de tratamiento primario y secundario, el primero se basa en la eliminación de sólidos suspendidos, además de neutralizar pH, enfriar y homogeneizar el efluente (Metcalf y Eddy, 1995). El tratamiento secundario es un tratamiento biológico, ya sea bajo condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas que consiste en la degradación de la materia orgánica mediante el uso de microorganismos los que requieren una fuente de carbono y nutrientes para su crecimiento (Slade *et al.*, 2004; Gerardi, 2006). El tratamiento biológico logra eficiencias de eliminación de carga orgánica biodegradable DBO<sub>5</sub> (Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días) entre 65-99% y una reducción en la DQO (Demanda Química de Oxígeno) entre 25-65% (Diez y col., 2002). Las tecnologías implementadas en la industria de celulosa para tratamiento secundario, son de tipo biológica aeróbica, por lo tanto, a continuación se describe el proceso de tratamiento aeróbico, las cinéticas de reacción y la microbiología del proceso que involucra el consumo oxígeno. En ese sentido, la Figura 15 muestra las eficiencias promedio de eliminación de materia orgánica, en términos de DQO y DBO<sub>5</sub>, estas fueron de  $56,6 \pm 7,7\%$  y  $78,3 \pm 6,5\%$ , respectivamente. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Pozo *et al.* (2011), donde fueron reportadas eficiencias de eliminación de DQO de  $56,0 \pm 1,2 \%$  y de DBO<sub>5</sub> de  $80,5 \pm 1,6\%$ . Igualmente, Xavier *et al.* (2011), reportaron valores de eficiencia de eliminación de DQO de  $63,3 \pm 10,3\%$  en un sistema de lodos activados. Es importante destacar que la eficiencia de eliminación para DQO como DBO<sub>5</sub>, no alcanzaron los óptimos 90-95% (Xavier *et al.*, 2011). Prueba de ello, teniendo en cuenta que el valor más alto obtenido para la eliminación de materia orgánica biodegradable fue de 85,1%. En todos los shocks aplicados (S1-S4), se observó una disminución de eficiencia del sistema; en S1 disminuyo de 64,8 a 58,6%, en S2 de 74,4 a 53,9%, pero fue en los siguientes donde el descenso fue muy pronunciado, desde 64,1 a 40,1% en S3 y de 83,3 a 20,3%. Estos descensos de eficiencia se producen en mayor proporción cuanto mayor es la concentración de licor negro, y tras un corto periodo, el sistema se recupera y se torna estable, (operación normal). Este aumento de eficiencia, puede deberse a que la biomasa aún permitía el ingreso de materia orgánica, tolerando una VCO 1,8 veces la acostumbrada y a que el influente con licor negro, contiene materia orgánica disponible para los microorganismos. En S2, para una velocidad de carga orgánica 2,9 veces superior a la normal, la eficiencia de eliminación de DQO no se vio notablemente afectada. Lo anterior es confirmado, con los estudios realizados por Sandberg and Holby (2008), que mencionan que en derrames moderados, la mayor parte de la DQO degradable

será eliminada, existiendo una buena eficiencia. A partir de la aplicación S3 se observan marcadas oscilaciones con una tendencia decreciente de la eficiencia, debido al ingreso de cargas orgánicas significativamente superiores para esta etapa la velocidad de carga orgánica fue 4,9 veces superior al promedio. En tanto, durante S4, se aplicó una velocidad de carga orgánica de 8,3 veces superior a la normal, lo que se evidenció en la eficiencia de eliminación, ya que el día 44, dos días después de la aplicación de S4, es cuando se obtuvo el valor más bajo de eficiencia (20,34%). Una explicación a esto es que el licor negro sigue en el sistema por un periodo prolongado y va saliendo diluido con el efluente, contribuyendo a la concentración de materia orgánica de éste. En un derrame accidental de licor negro en una planta de celulosa, la eficiencia de eliminación tardó más de 150 horas en restablecerse (Sandberg, 2009). Considerando lo anterior, desde el día 35, las oscilaciones de eficiencia de eliminación, dan cuenta de una desestabilización de sistema, consecuencia en este caso, del ingreso de una carga orgánica elevada, aplicada en S3 y S4.

Durante todo el proceso de operación se observó una correlación en la eliminación de todos los compuestos y el color (Villamar, 2008). Con la aplicación de los shocks tóxicos, el color en el sistema aumenta, adoptando un color muy oscuro, que se intensifica con S3 y S4. A partir del ingreso de licor negro en grandes concentraciones, la eficiencia de eliminación de color disminuye hasta un 50,65% tras la aplicación de S4, ocurriendo de manera similar con los demás compuestos. La persistencia de esta ineficiencia en la eliminación puede estar producida por contenido de lignina y compuestos del licor negro, que permanecen en el sistema por un largo tiempo y salen diluidos en el efluente (Sandberg and Holby, 2008).

### **6.3 Evolución de la actividad de la biomasa**

Ciertos autores, afirman que un lodo posee buena decantación cuando presenta valores de índice volumétrico del lodo (IVL) entre 35-150 mL/gSST (Ramalho, 1996) y una relación microorganismo (A/M) entre 0,3-0,6 gDBO<sub>5</sub>/gSSV·d. Durante todo el proceso de operación, incluyendo durante los shocks tóxicos, el IVL tuvo valores dentro de ese rango de referencia, teniendo una buena decantación. Valores similares presentan Xavier *et al.* (2009), en un sistema de lodos activados, donde este parámetro se mantuvo alrededor de 50 mL/gSST. Por otro lado, Sandberg and Holby (2008), presentan valores entre 70-100 mL/gSST. Sin embargo, el valor promedio de IVL en este estudio fue de 92,64 ± 36,25 mL/gSSV, superior a los 50 mL/gSST recomendados. Esto puede estar

relacionado con el tamaño del flóculo, ya que, un mayor tamaño de éste, aumenta el IVL. En este caso los flóculos fueron de tamaño medio (150–500  $\mu\text{m}$ ) (Sezgin *et al.*, 1982). También ese valor de IVL pudo estar influenciado por una baja concentración de sólidos en el reactor.

Se observa una disminución progresiva del IVL comparando los 4 shocks aplicados en su hora 24, desde 135,97 mL/gSST en S1 hasta 56,37 mL/gSST en S4. Ello puede deberse a que este parámetro es influenciado por factores como, el tamaño de los flóculos, la concentración de sólidos y sobre todo la presencia de organismos filamentosos. Cuando la concentración de organismos filamentosos es baja y existe una concentración fija de SST en el reactor, el IVL se ve influenciado principalmente por el tamaño de los flóculos (Sezgin *et al.*, 1982). Durante el estudio no se observaron cambios significativos en cuanto al tamaño de los flóculos, pero si se destaca su carácter disperso durante casi toda la operación, a excepción de la aplicación del S4, que evidenció un lodo filamentososo de acuerdo a sus parámetros de IVL con respecto a A/M. Sin embargo, según lo observado durante los ensayos, evidenciado en los valores de IVL de 37–135 mL/gSST el lodo del reactor presentó buena sedimentación.

La actividad heterótrofa (Figura 18) varió en un rango de 0,091-0,332  $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$ , en el reactor, encontrándose dentro del rango de actividad normal, tal y como reporta Pozo (2010) con un promedio de 0,095  $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$ . La baja tasa de actividad registrada a la hora 2 de aplicación de S4, puede justificarse debido a la alta concentración de licor negro contenida (30 mL/L), lo que provocó una desestabilización en la biomasa, que no se encontraba adaptada a este tipo de influente. Aunque dicho valor está considerado dentro de los rangos medidos, al ser el menor comparado con las mediciones de la hora 2 de los otros shocks, puede ser un indicio de un efecto de la toxicidad del licor negro. Cabe destacar, que en la hora 24 de aplicación de S4, el sistema se recuperó hasta 0,25  $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$ , superando la actividad de incluso S3, sin apenas variación y registrando la tasa más baja (0,20  $\text{mgO}_2/\text{gSSV}\cdot\text{min}$ ). Esta alza puede explicarse por la robustez del sistema de lodos activados, el que se encontraba en una condición muy estable, situación que le permitió resistir los shocks y restablecer la velocidad de carga orgánica. Además, dicho comportamiento coincide con la máxima concentración de DQO en el sistema (3221 mg/L) pudiendo ser la mayor disponibilidad de materia orgánica un factor que influyó, ya que es posible detectar la presencia de alzas en la carga orgánica, a través de un aumento en la actividad de la biomasa (Chalasaní y Sun, 2007). Se evidencia así cierta

capacidad de adaptación de las bacterias del sistema, tras la aplicación constante de cargas tóxicas.

Además, se ha documentado la existencia de una relación entre la actividad de la biomasa y la temperatura, siendo los lodos más activos en virtud de una temperatura más alta (Chalasan and Sun, 2007), coincidiendo así ese aumento en S4 con las altas temperaturas (29,3°C) debido al cambio de estacionalidad.

En general, se observó un potenciamiento de la actividad y no una inhibición. Resultados de ensayos realizados a escala industrial y de laboratorio, muestran que la velocidad de carga orgánica, fue inhibida en el sistema de tratamiento de aguas residuales a concentraciones de 3500 mgDQO/L, con un incremento en la DQO, producido por el ingreso de licor negro (Sandberg, 2009). En este caso, las concentraciones de licor negro del influente, llegaron hasta 3221 mgDQO/L, no observándose un efecto significativo de disminución de la actividad por efecto tóxico, dentro de lo cual el sistema fue alterado en mayor grado por la aplicación de S3 y, posiblemente, el pH del influente no ajustado en ocasiones hasta la neutralidad, el que afectó a las bacterias y pudo potenciar los compuestos tóxicos del licor negro (Sandberg and Holby, 2008).

#### **6.4 Microbiología del lodo**

La presencia o ausencia de determinada especie microscópica, establece el estado del lodo presente en el reactor, afirmación que es corroborada por la eficiencia de eliminación, pero que a diferencia de ésta, también nos permite visualizar la dinámica de las distintas especies presentes en este tipo de sistemas de tratamiento (Villamar, 2008).

Los ciliados fijos y los rotíferos son un indicativo del buen funcionamiento del sistema. Pellizzaro et al. (2005), plantean que un buen rendimiento del sistema está directamente relacionado con la especie dominante en el proceso. De esta manera, la predominancia de ciliados pedunculados y libres es indicativa de buenas condiciones de depuración.

En un sistema de lodos activados, es posible tener indicios de derrame con componentes de material orgánico y tóxico, a través de las características y composición de la biomasa, representadas en el IVL, la actividad heterótrofa y los microorganismos indicadores. Durante este estudio, fue posible observar que una mayor concentración de DQO (3221 mg/L) en el influente, producto de la adición del licor negro (2, 4, 10 y 30 mL licor/L efluente, conllevó una disminución progresiva de la eficiencia de eliminación hasta un 20,34%. En

este sentido, la desestabilización del sistema, fue evidenciada por una alteración de la actividad heterótrofa, disminuyendo de manera general en todos los shocks (indicativo de toxicidad). Se vio aumentada en la hora 24 de aplicación para cada uno de ellos, debido a la mayor disponibilidad de alimento y a la robustez del sistema, siendo este el indicio de un ingreso repentino de carga orgánica extra (708, 1113, 1887 y 3221 mg/L, desde S1-S4). Lo anterior se confirma en la Figura 21, donde se observa que, las vacuolas de alimentación de los ciliados fijos (*Vorticella sp.*) fueron notablemente más grandes luego de S3 y S4. Sin embargo, la actividad heterótrofa en el caso de S3, no pudo recuperarse tras las 24 horas de aplicación, casi sin variación desde 0,190 a 0,202 (mgO<sub>2</sub>/gSSV min), lo que sí ocurrió con el S4, a pesar de tener una concentración 3 veces mayor, llegando a 0,254 (mgO<sub>2</sub>/gSSV min). Aquí se evidencia, por tanto, una capacidad de adaptación de las bacterias tras la exposición continua a grandes gradientes de tóxicos, pues éstas son capaces de recuperarse y adaptarse al sistema. Un factor clave para ello, fue la neutralización del pH del influente, ya que, por un lado, las bacterias son sensibles a los cambios de pH y por otra, la toxicidad de ciertos compuestos del licor negro se potencia con un pH más básico. Lo anterior se confirma con experiencias realizadas por Sandberg and Holby (2008), que mencionan que cuando el pH de la alimentación, se ha ajustado a aproximadamente 7, las bacterias pueden resistir concentraciones más altas de licor negro antes de ser inhibidas.

En el caso de la observación de presencia/ausencia de microorganismos presentes en el lodo, se evidencia la presencia de compuestos tóxicos en el sistema, a través de la disminución del número de microorganismos indicadores. Conforme el shock tuvo mayor cantidad de licor negro, fue observada una menor cantidad de ciliados fijos y rotíferos, organismos muy sensibles a la contaminación tóxica. Sin embargo, en ningún momento el sistema se vio inhibido. Específicamente en S4, se observó un número abundante de flagelados, lo que es indicativo de una depuración inadecuada, ya que, la elevada densidad de estos microorganismos ocurre en la puesta en marcha o bien asociada a un mal funcionamiento del proceso, debido por ejemplo a un exceso de carga orgánica, situación que concuerda con las más bajas eficiencias de eliminación de materia orgánica (24,34%) (Madoni, 1994). De igual forma, un aumento en los ciliados nadadores en un lodo bien formado, es indicio de anomalías en el proceso, como podría tratarse del caso de una carga excesiva. En ocasiones, también puede estar relacionado con la entrada de vertidos tóxicos, ya que se eliminan las comunidades estables del proceso, presentando los reactores una situación semejante a la puesta en marcha

(Villaseca, 2001). Como se observa, es a partir de S3 y S4 cuando se comienza a evidenciar, a través de los microorganismos, un aumento en la carga orgánica, indicativo de desestabilización y también signos de la toxicidad del licor negro. Además, a partir de la aplicación de S2, se destaca el carácter disperso del lodo, y en S4 se evidencia un lodo filamentoso en términos de IVL con respecto a A/M, con un valor de 0,69 (g DQO/g SSV d) para este último parámetro, indicativo también de toxicidad.

### **6.5 Bioensayos de toxicidad con *Daphnia magna***

El uso de métodos biológicos para la evaluación de la contaminación muestra una alternativa importante para conocer el potencial de las aguas residuales descargadas a ecosistemas acuáticos (Kim *et al.*, 2008; Ignace *et al.*, 2011). En este sentido, el destino y los efectos de los efluentes de celulosa Kraft, han sido evaluados mediante variados organismos, entre ellos *Daphnia sp.* (Hewit *et al.*, 2006). Bioensayos clásicos con esta especie incluyen ensayo de toxicidad aguda en la que el parámetro medido es la muerte (24-48h.), y pruebas crónicas, donde la fertilidad es el punto final más frecuentemente utilizado (Gaete *et al.*, 2000). Si bien es cierto, se ha demostrado que la toxicidad generada por estos efluentes, se ha visto reducida en un 100% debido a la sustitución del blanqueo convencional y la implementación de tratamientos biológicos (Chamorro *et al.*, 2005), ensayos crónicos han evidenciado que aún existen compuestos refractarios que son capaces de interferir con el metabolismo de *Daphnia sp.* (van den Heuvel *et al.*, 2008). Además, estudios realizados en este ámbito, muestran que compuestos presentes en los efluentes tienen la capacidad de actuar como moderadores hormonales incidiendo principalmente en el crecimiento (Xavier *et al.*, 2005). Al respecto, se ha visto que puede existir una alteración en la relación cuerpo/abdomen de al menos un 25.6%–27.8% en *Daphnia magna* sobre la tendencia normal (López *et al.*, 2011). Actualmente, existe una necesidad de desarrollar ensayos biológicos de corto plazo, como alternativa a los de larga duración y que puedan prever efectos a largo plazo como los mencionados (Guillermino *et al.*, 1999; Gaete *et al.*, 2000). De acuerdo a esto, en la última década ha habido una creciente evidencia de la aplicación de ensayos de toxicidad subletal de corto plazo (24h) (Barata *et al.*, 2007), de tal forma, ensayos realizados sobre el metabolismo y fisiología en *Daphnia magna*, reflejan efectos directos sobre la reproducción y crecimiento del organismo y efectos indirectos sobre la estructura de la comunidad (McWilliam *et al.*, 2002). En este sentido, los ensayos de toxicidad aguda con los shocks tóxicos de licor negro presente en

efluentes de celulosa, corroborarán que el tratamiento biológico disminuye la letalidad, no evidenciando toxicidad aguda ( $LC_{50}$ ) a las 24-48h para ninguno de los shocks. Cabe destacar que a pesar que no se detecta  $LC_{50}$ , si existen evidencias de mortalidad en  $S3 > S2 > S1$ , lo que resulta evidente puesto que la concentración de tóxicos aumenta progresivamente, sin embargo, respecto a  $S4$ , cuya concentración es la más alta (30 ml licor/L), no se presenta mortalidad. En este sentido, es probable que a la máxima concentración de shock existan compuestos que provoquen un efecto antagónico. Estudios en este sentido ha visto que al 100% de efluente de celulosa existen una mayor disponibilidad de compuestos específicos, entre ellos triterpenos, ketonas y fitosteroles entre otros, que pueden producir un efecto beneficioso para los organismos disminuyendo la toxicidad aguda. Este efecto ha sido ampliamente discutido por varios autores, observando que los fitoesteroles son capaces de ingresar en la ruta metabólica actuando como antagonista de hormonas naturales (Martin-Creuzburg and Von Elert, 2004). La presencia de esteroides en la dieta de *Daphnia sp* es un factor determinante en cuanto a la alimentación se refiere, ya que estos compuestos son muy similares estructuralmente al colesterol, principal fuente alimenticia de *Daphnia*, (Martin-Creuzburg *et al.*, 2005) y a la hormona ecdisoma (Clubbs *et al.*, 2007), por lo que pueden ser incorporados y transformados en colesterol, generando un sinergismo de condiciones óptimas para su crecimiento y reproducción (Sperfeld and Wacker, 2009; Piepho *et al.*, 2010).

Además de los ensayos de letalidad se realizaron pruebas subletales para determinar el grado de alteración a nivel morfológico en *D. magna*. Deformación a nivel de la espina caudal (acortamiento y curvatura), del rostrum, y crecimiento del abdomen, aumenta significativamente con la concentración de tóxicos en el efluente y a menor grado de dilución en la realización del ensayo. En relación a esto, se observa que a las 48h, existe una fuerte tendencia la deformidad de la espina caudal, para el shocks 1 y 2, presenta un máximo de 10% para la concentración de 50 y 100%, y este grado de alteración se va incrementando a medida que el licor negro es más concentrado.  $S2$ , presenta un 20% de deformidad en espina caudal a 25 y 50%, cabe que  $S2$  y  $S3$  al 100% se presenta una disminución en la alteración de la espina caudal a la máxima concentración, coincidiendo con lo descrito, que efluente de celulosa pueden contener compuestos específicos que de algún modo benefician al organismo para aplacar el grado de alteración ambiental que puedan estar sufriendo. De esta misma forma, shock 3 solo evidencia alteraciones al 25% con 20% espina caudal y 30% rostro. Por último shock 4 presenta alteraciones en todas las concentraciones (6,25-100%), con

un máximo de 30% en la espina caudal en 12,5, 25, 50,100% y 20% de deformidad en el rostrum al 50%. Para relacionar estas alteraciones fisiológicas también se realizó mediciones en la longitud del cuerpo y abdomen (crecimiento alométrico). Esta relación ha sido usada como criterio de valoración tras la exposición a compuestos disruptores endocrinos. Es así que Olmstead and LeBlanc (2000), demostraron que tanto dietilbestrol (DES) y metopreno, aumenta el tamaño abdominal en relación con el cuerpo (21d), siendo esta una relación que expresa alteración estrogénica. Por otro lado, Xavier *et al.* (2005), por su parte, discute que dáfnidos expuestos a efluentes de celulosa, presentan una temprana maduración sexual, y alteraciones morfológicas de tipo endocrino. Sin embargo, no se ha observado si existe una alteración temprana (24-48h) en el organismo. En este sentido la Tabla 12 evidencia la relación alométrica de *D. magna* expuesta a los distintos shocks tóxicos. En este sentido, se observa en general que el proceso de crecimiento tanto para el cuerpo como para el abdomen siguen patrones de alteración endocrina en S1, donde se presenta una tendencia a desarrollar más el abdomen que el cuerpo en todas las concentraciones expuestas. Por su parte, shock 2 evidencia un crecimiento mayor en el abdomen al 12,5% con respecto de los organismos control. S3, no presenta diferencias significativas en el crecimiento alométrico en ninguna de las concentraciones respecto del control y S4 por su lado, presenta una mayor tendencia al crecimiento del cuerpo con respecto del control en todas las concentraciones expuestas. De acuerdo a esto, se puede inferir que solo el S1, tendría una incidencia en el desarrollo del abdomen sobre el cuerpo, indicando una alteración endocrina. Estos resultados son concordantes con lo observado por Xavier *et al.* (2005), quienes evidencian que un efecto positivo en el crecimiento abdomen/cuerpo de hembras expuestas a bajas concentraciones de efluente de celulosa (5%), relacionando estos efectos con alteraciones endocrinas. Un dato interesante serían datos medidos a través del tiempo, sobre las generaciones (multigeneracional), para evaluar los efectos crónicos específicos asociados a los shock de licor negro.

## **6.6 Test de mutagenicidad : Test de Ames**

El bioensayo con *Salmonella typhimurium*, más conocido como "Test de Ames", (Ames *et al.*, 1975), mide la actividad de una sustancia para mutar células bacterianas. Este ensayo ha sido ampliamente utilizado para determinar la mutagenicidad de mezclas complejas, como lo son los efluentes de celulosa (Xavier *et al.*, 2011). La Tabla 13, presenta los valores de mutagenicidad del ensayo realizado a los shocks tóxicos, cuyos potenciales de inducción de

mutación se pueden observar de manera gráfica en la Figura 24. Los resultados muestran mutagenicidad en los efluentes con menor concentración de licor negro S1 y S2, mientras que en S3, la inducción de la mutación es de carácter muy moderado, este punto está muy relacionado con los efectos vistos en *D. magna*, ya que justamente es a esta concentración de shock tóxico (S3) que se presenta la menor deformidad en rostrum y espina caudal y no existe una alteración en el crecimiento alométrico. Por su parte, S4 con una concentración en licor negro de 30 mL licor/L, no evidencia mutagenicidad, debido a que se induce muerte celular o citotoxicidad. Respecto de la mutagenicidad vista en los efluentes de celulosa, esta se ha atribuido principalmente a compuestos específicos tales como ácidos resínicos (abiético y dehidroabiético) (Fernández *et al.*, 2007) y esteroides (Lehtinen *et al.*, 1996) contenido en los efluentes de la planta de Kraft. De esta forma Xavier *et al.* (2011), evaluó componentes tales como estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, encontrados para ellos ser genotóxicos a bajas concentraciones y contribuir en general a potenciar este efecto. Más aun, estos autores detectaron que el sistema de tratamiento aeróbico puede generar un aumento en la muta-genotoxicidad en los efluentes tratados. Por su parte, Rao *et al.* (1995), determinó mutagenicidad en efluentes filtrados a una dilución de 4 mL y observó además potencial genotóxico a aproximadamente 0,28 mL. Lo que indica que este tipo de tests son bastante sensibles para determinar alteraciones a nivel celular. De concordante a lo descrito, los efluentes analizados en este estudio mostraron potencial mutagénico y citotóxico, lo que comprueba que los sistemas de tratamientos secundarios convencionales no logran eliminar el potencial mutagénico generado en el proceso de la celulosa (Springer, 2000).

## CONCLUSIONES

La eficiencia de eliminación de materia orgánica obtenida para la condición de operación normal fue de  $56,6 \pm 7,7\%$ , y varió entre 64,84 y 20,3% desde la aplicación de S1 a S4 con un TRH de 1 d y relación  $DBO_5:N:P$  de 100:5:1.

El IVL se mantuvo en un rango de 34,8 159,1 mL/gSSV, observando para S1 valor fuera de rango óptimo. El lodo se clasificó como disperso durante casi todo el periodo de operación, y filamentoso para la condición de S4, confirmando desestabilización del sistema de lodos activados para la concentración de 30 mL licor negro/L efluente.

La actividad heterótrofa de la biomasa presentó valores entre 0,091 0,332  $mgO_2/gSSV \cdot min$ , para toda condición de operación, presentando los valores más altos durante la hora 24 de S1 y S2, evidenciando una disminución de la actividad con la aplicación de S3 y S4.

Se observaron anomalías en el sistema mediante la observación de microorganismos; una disminución en el número de ciliados fijos y rotíferos a medida que aumentó la intensidad de los shocks, se refleja en la baja eficiencia de eliminación correspondiente a S4.

El efluente no presenta una toxicidad aguda ( $LC_{50}$ ), en ninguno de los shocks tóxicos, sin embargo, presenta alteraciones principalmente en el rostrum y espina. S1 presenta alteración a la concentración de 50 y 100%, evidenciando un 10 % de deformidad en la espina caudal para ambas concentraciones y un 20% sobre el rostrum para el 50%. S2, presenta un 20 % de deformidad en espina caudal a 25 y 50%. S3 sólo evidencia alteraciones al 25% con 20% espina caudal y 30% rostro. Por último, S4 presenta alteraciones en todas las concentraciones (6,25-100%), con un 30% en la espina caudal en 12.5, 25 ,50, 100% y 20% de deformidad en el rostrum al 50%.

Se evidencia mutagenicidad en los efluentes con menor concentración de licor negro (S1 y S2, con 2 y 4 mL licor/L, respectivamente), mientras que en S3 (10 mL licor/L) la inducción de la mutación es de carácter muy moderado, y S4 (30 mL licor/L), no se produce inducción alguna, lo que indica citotoxicidad.

Fue posible determinar a través de los ensayos realizados, toxicidad con efectos subletales y potencial mutagénico y citotóxico, de los efluentes de la industria de celulosa kraft, sometidos a shocks de licor negro con concentraciones de hasta 3221 mg/L, durante 24 h, con un TRH de 1 d y una relación DBO<sub>5</sub>:N:P de 100:5:1, por tanto, se acepta la hipótesis. Se comprueba que los sistemas de tratamientos secundarios convencionales no logran eliminar el potencial mutagénico generado en el proceso de la celulosa.

## BIBLIOGRAFIA

- Ali, M. and Sreekrishnan, T.R., (2001). Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: A Review. *Advances in Environmental Research*, 5, 175-196.
- Altesor, A., Eguren, G., Mazzeo, N., Panario, D., Rodríguez, C., (2008). La industria de la celulosa y sus efectos: certezas e incertidumbres. *Ecología Austral*, 18:291-303.
- Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki., (1975). Mutation. *Research*. 31:347.
- American Public Health Association. APHA, (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater, 16<sup>th</sup> ed. APHA, WCPF, AWWA, Washington DC. USA.
- Argemi, F., Cianni, N. and Porta, A., (2005). Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39 (3), 291-300.
- Asociación Técnica de la Celulosa y el Papel. ATCP, (2012). Industria de la celulosa en Chile. 5th International Colloquium on Eucalyptus Pulp. Porto Seguro, Brazil. May 9-12.
- Bajpai, P., (2013). Bleach Plant Effluents from the Pulp and Paper Industry. *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*, Punjab, India, 88 pp.
- Barata, C., Porte, C. and Donald J.B., (2004). Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates: A Review. *Ecotoxicology*, 13, 511-517.
- Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J., Soares A.M and Riva M.C., (2006). Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides of *Daphnia magna* Straus. Implications for mult-substance risks assessment. *Aquatic Toxicology*, 78, 1-14.

- Barata C., Baird D.J., Nogueira A.J., Agra A., Soares A.M., (2007). Life-history responses of *Daphnia magna* Straus to binary mixtures of toxic substances: Pharmacological versus ecotoxicological modes of action. *Aquatic Toxicology*, 84:439–449.
- Belmonte, M., Calderón, M., Chamorro, S., Vidal, G., (2006). Gestión Ambiental de la Industria de Celulosa en Chile. 30° Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. AIDIS. Uruguay.
- Biermann, C., (1996). Handbook of Pulping and Papermaking, Second Edition, El Servier, 754 pp.
- Bishnoi, N., Khumukcham, R.K. and Kumar, R., (2006). Biodegradation of pulp and paper mill effluent using anaerobic followed by aerobic digestion. *Journal of Environmental Biology*, 27(2):405-408.
- Borton, D.L; Streblow; W.R., Van Veld P., Hall T.J., and Bousquet, T., (1997). Comparison of bioindicators to reproduction during fathead minnow (*Pimephales promelas*) life-cycle tests with kraft mill effluents. Pp. 277-286 en: Third International Conference on Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents. November 9-13, Rotorua, NZ.
- Campos, V., Zaror, C. and Mondaca, M., (2004). Detection of phenols in kraft pulp bleaching effluents using DmpR mutant strains. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 73, 666-673.
- Chalasani, G. and Sun, W., (2007). Measurement of temperature effects on oxygen uptake rate in activated sludge treatment. Report Michigan State University College of Engineering, 28 pp.
- Chamorro, S., Xavier, C. and Vidal, G., (2005). Behavior of aromatic compounds contained in kraft mill effluents treated by an 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.

- Chamorro, S., Hernández, V., Matamoros, V., Domínguez, C., Becerra, J., Vidal, G., Piñaand B., Bayona, J., (2013). Chemical characterization of organic microcontaminant sources and biological effects in riverine sediments impacted by urban sewage and pulp mill discharges. *Chemosphere*, 90:611-619.
- Chamorro, S. y Vidal, G., (2013). Guía práctica de observación macroscópica y microscópica de organismos indicadores del lodo. Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental. GIBA. 34 pp.
- 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):111-122.
- Christianson-Heiska, I., Haavisto, T., Paranko, J., Bergelin, E. and Isomaa, B., (2008). Effects of the wood extractives dehydroabietic acid and betulinol on reproductive physiology of zebrafish (*Danio rerio*)—A two-generation study. *Aquatic Toxicology*, 86(3), 388-96.
- Clubbs, R.L. and Brooks, B.W., (2007). *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 7, 385–398.
- Costa, C., Olivi, P., Botta, C., Espindola, E., (2008). Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods, *Química Nova*, 31 (7), 1820-1830.
- Del Río, J., Romero, J. & Gutiérrez, A., (2000). Analysis of pitch deposits produced in kraft pulp mills using a totally chlorine free bleaching sequence. *Journal of Chromatography A*, 874: 235 – 245.
- Diez, M. C., Castillo, G., Aguilar, L., Vidal, G. y Mora, M. L., (2002). Operational factors and nutrients effect on activated sludge treatment for phenolic compounds degradation from Pinus radiate kraft mill effluents. *Bioresour. Technol.* 83 (2), 132-138.
- Diez, M. C., Villouta, F., Montoya, M. T., Bornhardt, C., (2002). Tratamiento combinado de lodos activados y lecho fijo sumergido para

tratar efluente de celulosa kraft blanqueada. 27o Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. AIDIS. Cancún, México.

- Dizer H., Wittekindt E., Fischer B., (2002). The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. *Chemosphere* 46:225–233
- Doble, M., Kumar, A., (2005). Biotreatment of Industrial Effluents. 11-19
- Dubé M. G., MacLatchy D. L., (2000). Endocrine responses of *Fundulus heteroclitus* to effluent from a bleached- kraft pulp mill before and after installation of reverse osmosis treatment of a waste stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2788- 2796.
- Ellis R. J., Van den Heuvel M. R., Smith M. A., Ling N., (2005). Effects of maternal versus direct exposure to pulp and paper mill effluent on rainbow trout early life stages. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 68, 369- 387.
- Fall, Ch., Cuenca, F., Bâ, K. and Solís, C., (2006). Respirometry-based evaluation of the fate and possible effects of antifreeze on activated sludge. *Journal of Environmental Management*, 80:83-89.
- Fernandez, M.P., Watson, P.A. and Breuil, C., (2001). Gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous determination of wood extractive compounds in quaking aspen. *Journal of Chromatography A*, 922, 225–233.
- 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.
- Filali-Meknassi, Y., Barata, C. and Riva, C., (2005). Disruptores endocrinos estrogénicos en las aguas residuales. Mecanismos de mitigación en el tratamiento del agua. *Afinidad*, 62, 95- 99.
- Gaete, H., Larraín, A., Baeza, J., Rodríguez, J. and Bay-Schmith, E., (1999). Efecto de aguas receptoras de efluentes de industrias de celulosa

localizadas en la cuenca del río Bio Bio (Chile, Central) sobre la tasa de crecimiento de la microalga *Selenastrum capricornotum* y reproducción del cladóceros *Daphnia pulex*. *Ciencia Tecnológica Marina*, 4 (1-3), 19-29.

- Gaete, H., Larrain, A., Bay-Schmith, E., Baeza, J., Rodriguez, J., (2000). Ecotoxicological Assessment of Two Pulp Mill Effluent, Biobio River Basin, Chile. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65:183–189.

Gerardi, M., (2006). Nitrogen, Phosphorus, and Sulfur Bacteria. *Wastewater Bacteria*. pp 75-117. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

- Gilbert, R.I., (1980). The analysis of fluctuation tests. *Mutation Research* 283: 289.
- Grover I.S., Kaur S., (1999). Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research* 426: 183–188.
- Guilhermino L., Sobral O., Chastinet C., Ribeiro R., Gonçalves F., Silva C., Soares A., (1999). A *Daphnia magna* first-brood chronic test: An alternative to the conventional 21-day chronic bioassay?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42:67–74
- Gutiérrez, A., Del Río, J., González-Vila, F. & Martín, F., (1998). Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 823: 449 – 455.
- Gutiérrez, A., Del Río, J.C., Rencores, J., Ibarra, D. and Martínez, A. T., (2006). Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase– mediator system. *Applied Microbiology Biotechnology*, 72, 845–851.
- Hamm, U., Schabel, S. and Oeller, H.J., (2006). Comparison of the endocrine effects of treated waste waters from different paper mills by use of an in-vitro test with modified yeast cells. Fate and effects of pulp and paper mill effluents Vitoria-Espírito Santo (Brasil) 9- 12 de Abril.

- Heimberger, S.A., Blevins, D.S., Bostwick, J.H., Donnini, G.P., (1988). Kraft bleach mill plant effluents: recent developments aimed at decreasing their environmental impact, part1. *Tappi J.* Oct, 51-59.
- Hewitt L., Parrott J., McMaster M., (2006). A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluents in Canada: sources and characteristics of bioactive substances. *Toxicol Environ Health B* 9:341–356.
- Ignace D., Dodson D., Stanley I., Kashian S., Donna R., (2011). Identification of the critical timing of sex determination in *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda) for use in toxicological studies. *Hydrobiologia* 668:117–123.
- Jenkins, R., Wilson, E., Angus, R., Howell, W. & Kirk, M., (2003). Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent. *Toxicological Sciences*, 73:53–59.
- Kim, I. G., Kang, S. C., Kim, K. C., Choung, E. S. and Zee, O. P., (2008). Screening of estrogenic and antiestrogenic activities from medicinal plants. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25, 75–82.
- Kovacs T.G., Gibbons G.J.S., Tremblay B.I., O’Connor P.H. y Voss R.H., (1995). The effects of secondary-treated bleached Kraft mill effluent on aquatic organisms as assessed by short-term and long-term tests. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 31, 7-22.
- Kovacs, T., Gibbons, S., Naish, V. and Voss, R., (2003). Regulatory toxicity compliance in relation to water usage: Survey on Canadian mill: 5<sup>th</sup> International Conference of Fate and effect of Pulp and Paper Mill Effluents, Seattle, Washington Jun 1-4.
- 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.
- Lah B., Malovrh S., Narat M., (2004). Detection and quantification of genotoxicity in wastewater-treated *Tetrahymena thermophila* using the comet assay. *Environmental Toxicology* 19:545–553

- Larraín, A., (1996). Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. *Cienc. Tec. Mar. CONAMA (No especial)* 39-47.
- Larsson, P. and Dodson, S., (1993). Chemical communication in plankton animals. *Archives Hydrobiology*, 129, 129-155.
- Larsson, D.G., Kinnberg, K., Sturve, J., Stephensen, E., Skön, M. and Förlin, L., (2002). Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 52, 13-20.
- Latorre, A., Rigol, A., Lacorte, S., and Barceló, D., (2005). Organic Compounds in Paper Mill Wastewaters. *Handbook Environ. Chem.* 5, 25-51.
- Lehtinen, K. & Tana, J., (1996). Assessing the aquatic environmental impact of ECF and TCF pulping operations using multispecies mesocosms and fish biomarker test. In: Turosky, W. (ed), *Chlorine and Chlorine compounds in the paper industry*. Ann Arbor Press, Chelsea, Michigan, pp. 151 – 168.
- López, D., Chamorro, S., Silva, J., Bay-Schmith, E. and Vidal, G., (2011). Chronic effects of *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* kraft mill effluents and phytosterols on *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87:633-637.
- Luraschi, M., (2007). Análisis de la cadena productiva de la celulosa y el papel a la luz de los objetivos de desarrollo sostenible: estudio del caso de Chile. Colección Documentos de proyectos Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), 96 pp.
- Madoni, P., (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Research*, 28(1):67-75.
- Martin-Creuzburg, D. and von Elert, E., (2004). Impact of 10 dietary sterols on growth and reproduction of *Daphnia galeata*. *Journal of Chemical Ecology*, 30, 483-500.

- Martin-Creuzburg, M., Wacker, A. and von Elert, E., (2005). Life history consequences of sterol availability in the aquatic keystone species *Daphnia*. *Oecologia*, 144, 362-372.
- Martínez-Jerónimo F., Espinosa-Chávez F. y Villaseñor- Córdoba R., (2000). Effect of culture volume and adult density on the neonate production of *Daphnia magna*, as test organisms for aquatic toxicity tests. *Environ. Toxicol.* 15, 155-159.
- Mas, M., Gómez, N., Vasco, J. y Salvadó, H., (2008). Caracterización de los microorganismos de depuradoras biológicas urbanas de fangos activos con tratamiento convencional y de eliminación de nutrientes de las comarcas de Lérida. *Hydrolab Microbiologica*.
- Masdeu, M., (1997). La depuradora com a sistema biològic. Formació i estructura dels flocs. *Anàlisi Microbiològica de Fangs Activats*. Mas Carandell, Reus.
- Mcwilliam R.A., Baird D.J., (2002). Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 21:1198–1205.
- Metcalf and Eddy, (1995). *Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización*. 30 edición, McGraw-Hill Inc., Interamericana de España S.A.
- Metcalf and Eddy, (2003). *Wastewater Engineering: Treatment, and Reuse*. McGraw-Hill, New York, USA, 1485 pp.
- Morales G., Pesante S., Vidal, G., (2015). Effects of black liquor shocks on activated sludge treatment of bleached kraft pulp mill wastewater. 628-632 pp.
- Mosquera, A., González, F., Campos, J. and Méndez, R., (2005). Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochemistry*, 40(9): 3109-3118.
- Mount, D.I. and Norberg T.J., (1984). A seven-day-cycle cladoceran test. *Environ. Toxicol. Chem.* 3:425-434.

- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., and Ono, H., (2001). Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod. Toxicol.* 15, 399-411.
- Norma Chilena Oficial, NCh 2083. Aguas- Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladóceras). *Instituto Nacional de Normalización, INN-Chile*, (1999).
- Nielsen, P.H. and Keiding K., (1998). Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide. *Water Resource*, 32(2): 313-320.
- Odendahl, S.M., Weishar, K.M., Reeve, D.W., (1990). Chlorinated organic matter in bleached chemical pulp production. Part II: A Review of measurement techniques for effluents on methanogenic consortia. *Pulp and Paper Canadian*, 91, 62- 66.
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K., (2004). Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research* 567:109–149
- Olmstead, A. and LeBlanc, G., (2000). Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristic of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2107-2113.
- Oñate, E., (2006). Evaluación de la genotoxicidad de fitoesteroides 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.
- Papadimitriou, Ch., Palaskab, G., Lazaridou, M., Samarasc, P. and Sakellaropoulou, G.P., (2007). The effects of toxic substances on the activated sludge microfauna. *Desalination*, 211:177-191.

- Parody, D.F., (1997). Microorganismos filamentosos. Microorganismos Filamentosos en el Fango Activado. EMASESA, Ayuntamiento de Sevilla, 23-95.
- Pellizaro, A., SezerinoII, P., PhilippiII, L., Reginatto, V. e Rubens, F., (2005). Microfauna characterization in activated sludge wastewater treatment plant: an instrument of assessment and control of process. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 10:329-338.
- Pessala, P., Schultz, E., Nakari, T., Joutti, A. And Herve, S., (2004). Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2):263-272.
- Piepho, M., Martin-Creuzburg, D. and Wacker, A., (2010). Simultaneous Effects of light intensity and phosphorus supply on the sterol content of phytoplankton. *PLoS ONE*, 5(12), 1- 7.
- Pokhrel, D. and Viraraghavan, T., (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater—a review. *Science of the Total Environment*, 333:37-58.
- Pozo, G., (2010). Optimización de la operación de un reactor aeróbico de biopelícula bacteriana inmovilizada: incidencia de los nutrientes en la biosíntesis de polihidroxialcanoato (PHA) como producto del tratamiento de efluentes de celulosa Kraft. Tesis Magister, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Pozo, G., Villamar, C., Martínez, M. and Vidal, G., (2011). Polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis from kraft mill wastewaters: biomass origin and C:N relationship influence. *Water Science & Technology*, 63(3):449-455.
- Ramalho, (1996). Introduction to wastewater treatment process. Academicpress.
- Rao, S., Kentburnison, B., Efler, S., Wittekindt, E., Hansen, P. and Rokosh D., (1995) Assessment of genotoxic potential of pulp mill effluent and an effluent fraction using ames mutagenicity and Umu-C genotoxicity assays. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 10, 301-305.

- Rius, M.M., (2003). Caracterización del proceso de depuración de aguas residuales y dinámica de las comunidades de microorganismos en plantas de tipo SBR. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- Rodrigues, C., Mounteer, A., Stoppa, T. and Dalvi, L., (2010). Chemical components of bleached eucalypt kraft pulp effluent COD and treatment removal efficiency during normal mill operation and maintenance shutdowns. *Water Science and Technology*, 62(7):1567-1573.
- 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), 439–51.
- Sandberg, M. and Holby, O., (2008). Black liquor and alkaline shocks in a multiple stage biological treatment plant. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 7:335-344.
- Sandberg, M., (2009). Mill case, simulation, and laboratory plant study of black liquor spill effects on a multiple stage biological treatment plant. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 36: 839-849.
- Sarlin, T., Halttunen, S., Vuoriranta, P. and Puhakka, J., (1999). Effects of chemical spills on activated sludge treatment performance in pulp and paper mills. *Water Science and Technology*, 40(11-12):319-325.
- Savant, D., Abdul-Rahman, R., Ranade, D., (2006). Anaerobic degradation of sorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology*, 97: 1092-1104
- Sezgin, M., (1982). Variation of sludge volume index with activated sludge characteristics. *Water Res.* 1982, 16, 83–88.
- Slade, A., Ellis, R., vanden Heuvel, M. y Stuthridge, T., (2004). Nutrient minimisation in the pulp and paper industry: an overview. *Water Sci. Technol.* 50, 111-122.

- Sperfeld, E. and Wacker, A., (2009). Effects of temperature and dietary sterol availability on growth and cholesterol allocation of the aquatic keystone species *Daphnia*. *The Journal of Experimental Biology*, 212, 3051-3059.
- Springer, A., (2000). *Industrial Environmental Control: Pulp and Paper Industry*. Atlanta: Tappi Press
- Thompson, G., Swain, J., Kay, M. and Forster, C.F., (2001). The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Technology*, 77:275-286.
- van den Heuvel M., Landman M., Finley M., David W., (2008). Altered physiology of rainbow trout in response to modified energy intake combined with pulp and paper effluent exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 69:187–198.
- Venitt, S., Crofton-Sleigh, C. And Forster, R., Bacterial mutation assays using reverse mutation, in Venitt, S. and Perry, J.M. (Eds), *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, (1984), 45.
- Vidal, G., Videla, S., Diez, M. C., (2001). Molecular weight distribution of *Pinus radiata* kraft mill wastewater treated by anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 77:183-191.
- Villamar, C. A., (2008). Propuesta para la operación y optimización de un sistema biológico aerobio de biomasa adherida para tratar efluentes provenientes de la industria de celulosa Kraft en la region del Bío Bío, Chile. Tesis Magister en Ingeniería Ambiental, Escuela De Posgrado En Ingeniería Y Ciencias, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Villamar, C. A., Jarpa, M., Decap, J. and Vidal, G., (2009). Aerobic moving bed bioreactor performance: comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* as raw material. *Water Science and Technology*, 59(3): 507-514.
- Villaseca, M., (2001). Observación microscópica de fangos activados en los tratamientos de depuración biológica. *Boletín INTEXTER (U.P.C.)*, 119:67-72.

- Water Environment Federation. WEF, (2008). Operation of Municipal Wastewater Treatment Plants Task Force. Manual of Practice No. 11. Sixth Edition. Volume I Management and Support Systems.
- 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., Mosquera-Corral, A., Becerra, J., Hernández, V. and Vidal, G., (2009). Activated sludge versus aerated lagoon treatment of kraft mill effluents containing  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 44:327-335.
- Xavier, C., Oñate, E., Mondaca, MA., Campos, J. and Vidal, G., (2011). Genotoxic effects of kraft pulp mill effluents treated by biological aerobic systems. *Interciencia*, 36(6):412-416.
- Yan, G., Allen, D., (1994). Biosorption of high molecular weight organochlorines in pulp mill effluent. *Water Resources*, 28, (9), p.1933-1941
- Zaror, C., (2002). Introducción a la Ingeniería Ambiental para la Industria de Procesos. Editorial Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 613 pp.
- Zeng, Z., Shan, T., Tong, Y., Lam, S. and Gong, Z., (2005). Development of estrogen- responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. *Environmental Science and Technology*, 39, 9001-9008.

## **LINKOGRAFIA**

- Arauco, (2012). Reporte de sustentabilidad. Disponible en URL: [http://www.arauco.cl/\\_file/file\\_50\\_arauco\\_reporte\\_2012-espanol.pdf](http://www.arauco.cl/_file/file_50_arauco_reporte_2012-espanol.pdf)
- Arauco, (2013). Proceso productivo Celulosa Kraft. Disponible en URL: <http://www.arauco.cl/flash/base.swf>
- Compañía Manufacturera de Papeles y Cartones. CMPC, (2012). Informe sostenibilidad. Disponible en URL: <http://www.cmpccelulosa.cl/CMPCCELULOSA/archivos/file/cmpc-reporte-de-desarrollo-sostenible-2011.pdf>
- Compañía Manufacturera de Papeles y Cartones. CMPC., (2014). Newsletter CMPC Celulosa. Disponible en URL: <http://www.cmpccelulosa.cl/CMPCCELULOSA/archivos/file/CMPC%20News%202022.pdf>
- Environmental Protection Agency. EPA, (2014). Water: Monitoring & Assessment. 5.9 Conductivity. Disponible en URL: <http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms59.cfm>
- FAO., (2007). *FAOSTAT on-line statistical service*, Disponible en URL: <http://faostat.fao.org>.
- KnowPulp - Learning Environment for Pulping Technology, Chemical Pulling and Automation, (2014). Disponible en URL: [http://www.knowpulp.com/spanish/demo/spanish/pulping/cooking/1\\_process/1\\_principle/frame.htm](http://www.knowpulp.com/spanish/demo/spanish/pulping/cooking/1_process/1_principle/frame.htm)
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), (2014). Gobierno de Chile. [http://www.odepa.cl/wp-content/files\\_mf/1420035075Celulosa201412.pdf](http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1420035075Celulosa201412.pdf)
- Resource Information Systems Inc. (RISI), (2014). World Market Pulp Capacity Report 2013. Disponible en URL: [http://www.risiinfo.com/Marketing/capacity\\_reports/Excerpts/world\\_market\\_pulp.pdf](http://www.risiinfo.com/Marketing/capacity_reports/Excerpts/world_market_pulp.pdf)

## **ANEXO**

**ANEXO I. Deformaciones del organismo de ensayo *Daphnia magna*, para cada shock tóxico, a nivel espina caudal ( — ) y rostrum ( — ). Sustitución del exoesqueleto ( ← ).**

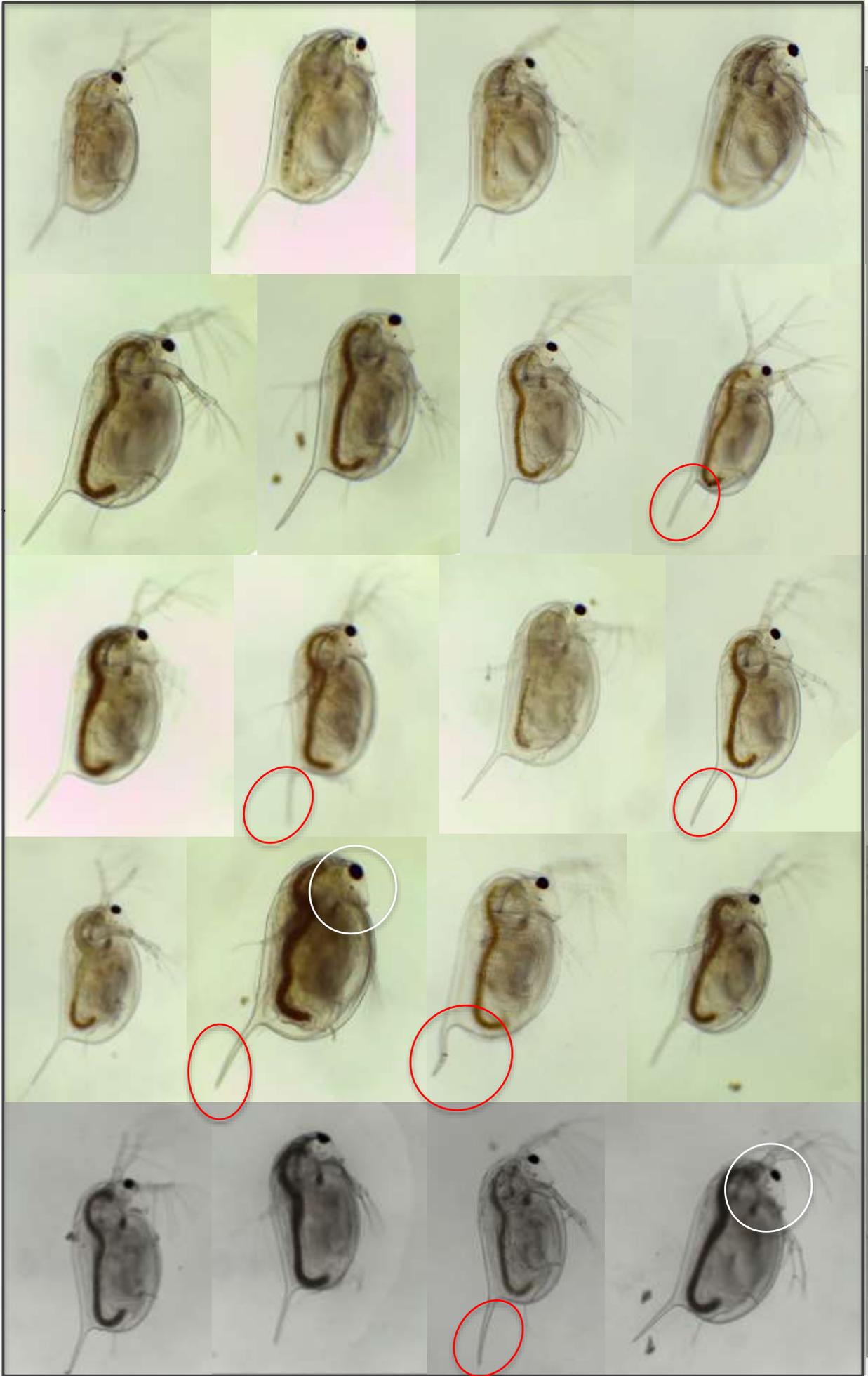
Control

Shock 2 - 12,5 %

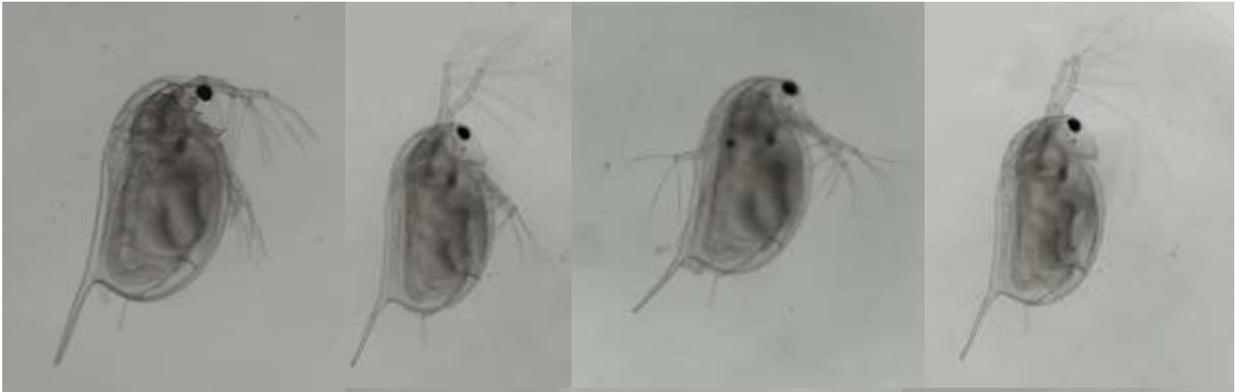
Shock 2 - 25 %

Shock 2 - 50 %

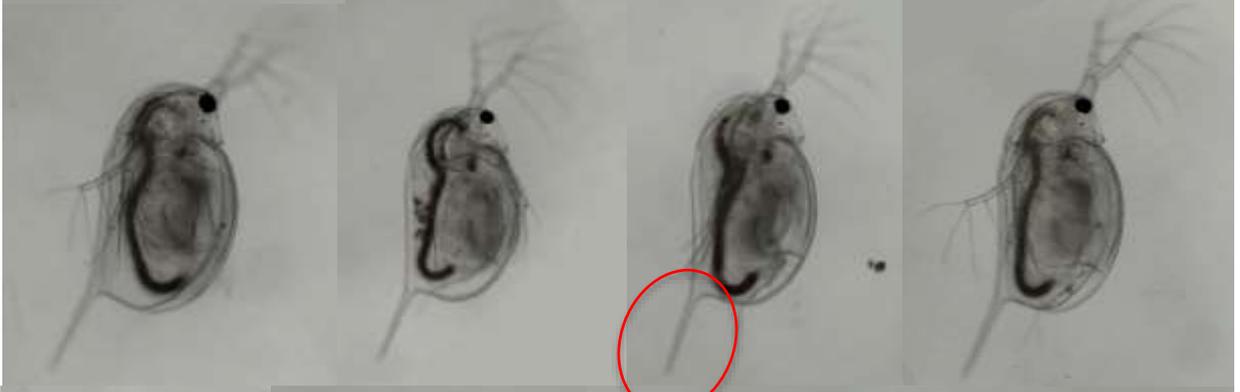
Shock 2 - 100 %



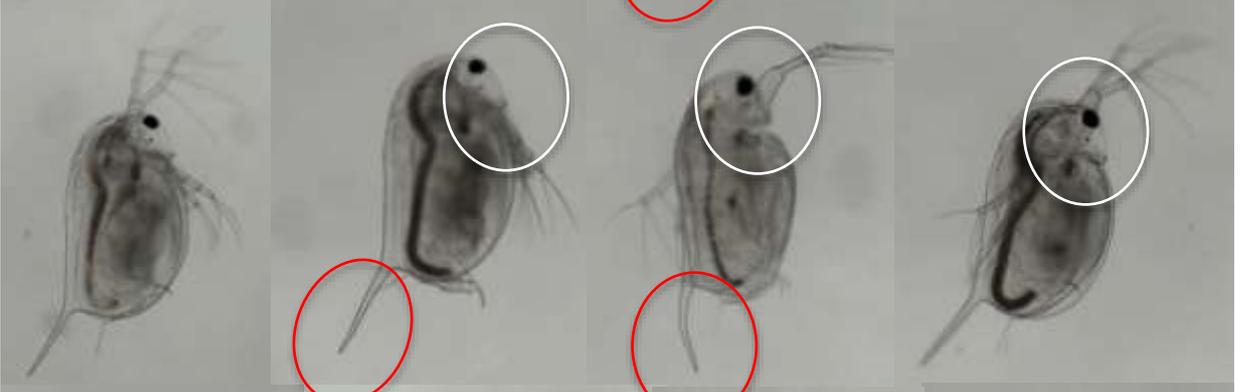
Control



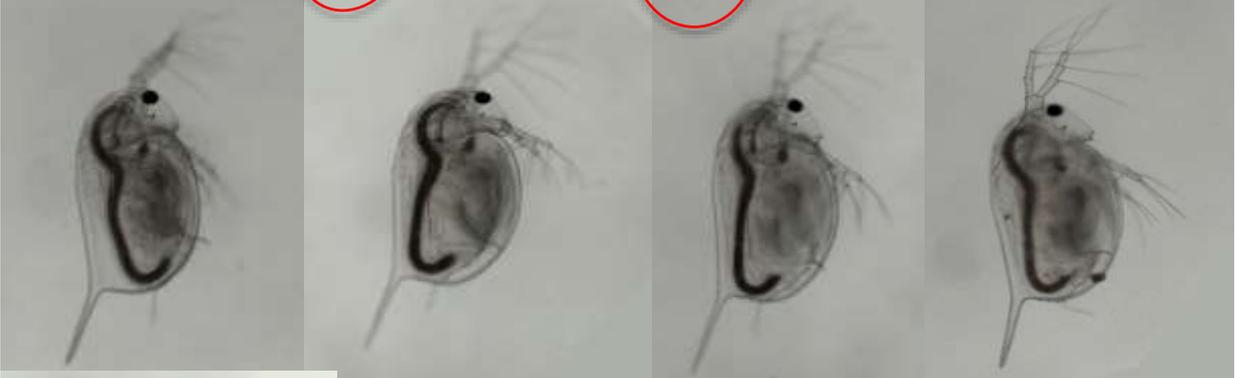
Shock 3 - 12,5 %



Shock 3 - 25 %



Shock 3 - 50 %



Shock 3 - 100 %



Shock 4 - 100 %

