

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRAFICAS  
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA MARINA Y ACUICULTURA



**DETERMINACION DE EFECTOS SUBLETALES Y CRONICOS EN *Daphnia magna* EXPUESTA A EFLUENTE DE CELULOSA KRAFT**

PABLINA ANDREA ALEJANDRA BRITO HERRERA

SEMINARIO DE TITULO PARA OPTAR AL TITULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCION - CHILE  
ENERO, 2013



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRAFICAS  
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA MARINA Y ACUICULTURA



**DETERMINACION DE EFECTOS SUBLETALES Y CRONICOS EN *Daphnia magna* EXPUESTA A EFLUENTE DE CELULOSA KRAFT**

Por

PABLINA ANDREA ALEJANDRA BRITO HERRERA

Profesor Guía

DRA. GLADYS CECILIA VIDAL SAEZ

SEMINARIO DE TITULO PARA OPTAR AL TITULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCION - CHILE

ENERO, 2013

**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas**

Este Seminario de Título ha sido realizado en la Unidad de Biotecnología Ambiental,  
Centro EULA- Chile.

Profesor Guía:

Dra. Gladys Vidal Sáez  
Unidad de Ingeniería Ambiental  
Centro EULA- Chile  
Universidad de Concepción, Concepción

Co-Tutora:

Dra. Soledad Chamorro Rodríguez  
Unidad de Ingeniería Ambiental  
Centro EULA- Chile  
Universidad de Concepción, Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Enrique Bay-Schmith  
Departamento de Zoología  
Facultad Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

Jeannette Silva  
Biólogo Marino  
Departamento de Zoología  
Facultad Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

Coordinador Seminario de Título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat  
Unidad de Biotecnología Marina  
Universidad de Concepción, Concepción

## DEDICATORIA

*A mis padres Victoria y Dagoberto, a Lilian por entregarme la vida y a mi familia, por su apoyo incondicional, amor, Fe y sabiduría durante todo lo vivido y todo por vivir, porque este tesoro sobre todo es de ustedes .....*

## AGRADECIMIENTOS

Me es indispensable y necesario agradecer desde lo más profundo de mi ser a todas aquellas personas que han trabajado conmigo, incentivándome y creyendo en mis capacidades. En primera instancia, soy una infinita agradecida de Dios por darme las capacidades para sobrepasar las adversidades y alegrarme en cada triunfo, por darme la capacidad de maravillarme con su creación y así poder valorar todo lo aprendido en esta carrera. También por darme una maravillosa y extensa familia, Victoria, Dagoberto y Lilian, mis grandes padres quienes siempre me entregaron los pilares fundamentales para crecer como persona y ser humano y sobre todo por su incondicional amor, apoyo, sabiduría y sobre todo mucha paciencia durante todas las etapas que me llevaron al culmine de esta carrera. A cada uno de mis hermanos, Sergio, Marcial, Héctor, María, Carmen y a cada uno de mis sobrinos, a todos ellos les agradezco por todo lo compartido, penas y alegrías, sueños y realidades, y porque en definitiva cada uno fue guía en cada paso dado a lo largo de mi vida, ayudándome a alcanzar este sueño. A Flori y Max por mostrarme su belleza sin vanidad, la fuerza sin insolencia, la valentía sin ferocidad, por poseer todas las virtudes del hombre y ninguno de sus defectos, por todo el amor y bondad que me entregaron sin pedir absolutamente nada a cambio.

También quisiera agradecer de manera muy especial a mi profesor tutor, La Dra. Gladys Vidal Sáez, por creer en un sueño que termino por hacerse realidad en el presente seminario. A mi Co-tutora Soledad Chamorro Rodríguez que me guió en cada paso y siempre tuvo la voluntad de enseñarme, sobre todo de ayudarme y entregarme consejos a la hora de contribuir en este trabajo científico, y por las extensas conversaciones acerca de la vida siempre que lo necesite.

También, agradecer a las profesoras Jeannette Silva y Ana Silvia Cifuentes por su gentileza a la hora aclarar mis dudas, entregándome con mucha disposición todos sus conocimientos siempre que lo necesite. Cómo olvidar a mis compañeras del grupo GIBA Mayra Jarpa y Daniela López, por ayudarme siempre y sobre todo por estar conmigo en esta última etapa del escrito en este trabajo, realizando sus correcciones y aportando con sus conocimientos y por su plena disposición en ayudar siempre en lo que fuese necesario.

También, a María José, Claudia, Viviana y Rubí quienes me brindaron su apoyo y plena disposición durante las diversas situaciones e inquietudes de laboratorio, en donde sin su ayuda todo hubiera sido mucho más difícil. A todo el grupo GIBA por la colaboración brindada desde un principio.

Difícil es encontrar las palabras para agradecerle a Cesar, el cual llegó a mi vida en el momento preciso, por su absoluta voluntad de ayudarme siempre, en lo académico, personal y también en lo sentimental, por las experiencias vividas y todo lo que aun nos queda vivir, por creer en mí.

A mi amiga Monserrat Montoya, por su ayuda y absoluta preocupación en todo ámbito durante todos estos años, también a Nicole Badilla, Carolina Alarcón, Linda López, Natalie Belmar, que me entregaron muy buenos momentos en el transcurso de esta carrera, a cada una de ellas por las siempre oportunas e interminables charlas, el aguante y la comprensión de cada uno durante esta epopeya universitaria. A Pía Oyarzúa por entregarme sus conocimientos y ayudarme en cada ramo que necesite de su apoyo y también por su ayuda brindada en las correcciones de este seminario.

Finalmente, agradecer al Programa o Proyecto FONDECYT 1120664 y 3120216 Universidad de Concepción, por permitir y financiar la presente tesis.

## INDICE DE CONTENIDOS

	<b>Pág.</b>
INDICE DE FIGURAS	<b>10</b>
INDICE DE TABLAS	<b>11</b>
RESUMEN	<b>12</b>
ABSTRACT	<b>13</b>
INTRODUCCION	<b>14</b>
1.1. Industria de Celulosa en Chile	<b>15</b>
1.2. Proceso de Pulpa Kraft	<b>18</b>
1.3. Constituyentes de la madera	<b>19</b>
1.4. Efectos asociados a efluentes de celulosa Kraft	<b>21</b>
1.5. Ensayos de toxicidad	<b>22</b>
1.6. <i>Daphnia magna</i> : Ensayos subletales	<b>24</b>
1.7.1. Biología y ciclo de vida	<b>26</b>
1.7.2. Test Feeding assay	<b>25</b>
HIPOTESIS	<b>29</b>
HIPOTESIS GENERAL	<b>29</b>
OBJETIVOS	<b>29</b>
OBJETIVO GENERAL	<b>29</b>
OBJETIVOS ESPECIFICOS	<b>29</b>

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

4.1.	Efluente de celulosa Kraft	<b>30</b>
4.2.	Bioensayos a través de <i>Daphnia magna</i>	<b>30</b>
4.2.1.	Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	<b>30</b>
4.2.2.	Cultivos de microalgas ( <i>Chlorella vulgaris</i> )	<b>30</b>
4.3.	Determinación de la toxicidad aguda del efluente de celulosa Kraft	<b>31</b>
4.4.	Determinación de toxicidad subletal en <i>Daphnia. magna</i>	<b>32</b>
4.4.1.	Ensayo de alimentación: Feeding assay en efluente secundario de celulosa Kraft.	<b>32</b>
4.4.2.	4.4.2. Ensayo de alimentación post-exposición: Feeding Assay Post-exposure	<b>33</b>
4.5.	Determinación de toxicidad crónica en <i>Daphnia magna</i>	<b>34</b>
4.5.1.	Tasa de Crecimiento Alométrica (TCA)	<b>35</b>
4.6.	Caracterización físico-químico del efluente	<b>37</b>



<b>RESULTADOS</b>		
5.1.	Caracterización fisicoquímica de efluente de celulosa Kraft.	<b>38</b>
5.2.	Curva de crecimiento con <i>Chlorella vulgaris</i>	<b>39</b>
5.3.	Ensayos de toxicidad	<b>39</b>
5.3.1.	Toxicidad aguda	<b>39</b>
5.4.	Determinación de toxicidad subletal en <i>Daphnia magna</i>	<b>40</b>
5.4.1.	Ensayos subletales: Feeding assay	<b>40</b>
5.4.2.	Ensayos subletales: Feeding assay Post-exposure	<b>41</b>
5.5.	Toxicidad crónica con efluente de celulosa	<b>42</b>
	<b>DISCUSION</b>	<b>47</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>53</b>

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Proceso productivo de la industria de celulosa Kraft.	<b>19</b>
<b>Figura 2:</b> Ciclo de <i>Daphnia magna</i> , incluye ciclo sexual y partenogénico.	<b>27</b>
<b>Figura 3.</b> Relación abdomen /cuerpo en <i>Daphnia magna</i> , denominado Tasa de relación alométrica (TCA).	<b>36</b>
<b>Figura 4:</b> Curva de crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .	<b>39</b>
<b>Figura 5:</b> Supervivencia de <i>Daphnia magna</i> expuesta a diferentes concentraciones de efluente secundario de celulosa.	<b>40</b>
<b>Figura 6:</b> Número de neonatos de <i>D. magna</i> a diferentes concentraciones de efluente secundario de celulosa, medido a los 21 días, encontrándose el NOEC y LOEC.	<b>41</b>
<b>Figura 7.</b> Tasa de crecimiento alométrica al cabo de 7, 14 y 21 días para <i>D. magna</i> expuesta a efluente secundario de celulosa Kraft.	<b>42</b>
<b>Figura 8:</b> Número de células de <i>C. vulgaris</i> ingestadas por <i>Daphnia magna</i> en ensayos de alimentación de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de efluente secundario de celulosa Kraft.	<b>43</b>
<b>Figura 9:</b> Número de células de <i>C. vulgaris</i> ingestadas por <i>Daphnia magna</i> en 4 h post-exposición a diferentes concentraciones de efluente secundario de celulosa Kraft en ensayos de alimentación de 24 h.	<b>44</b>

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Plantas de celulosa Kraft operantes en Chile: Tipo de proceso, materia prima, sistema de tratamiento y cuerpo receptor de efluentes.	17
<b>Tabla 2.</b> Componentes de la madera presentes en las materias primas más usadas por la industria de celulosa Kraft	19
<b>Tabla 3.</b> Ubicación taxonómica del organismo <i>Daphnia sp</i>	25
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i> .	32
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad crónica con <i>Daphnia magna</i> .	35
<b>Tabla 6.</b> Caracterización de efluente de celulosa Kraft.	38
<b>Tabla 7.</b> Parámetros crónicos utilizados sobre <i>Daphnia magna</i> expuesta a concentraciones de efluente de celulosa Kraft.	46

## RESUMEN

Actualmente, Chile presenta un gran crecimiento en la producción celulosa Kraft blanqueada, con una producción de 4,7 millones de toneladas al año. Asociado a este crecimiento, existe también un incremento en los volúmenes de residuos líquidos eliminados al ambiente, los cuales han sido por años considerados como una de las principales fuentes de contaminación de los sistemas acuáticos. Este trabajo evalúa el efecto potencial que tienen los efluentes de celulosa en los organismos zooplanctónicos en los ambientes dulce acuícolas. Para esto los objetivos planteados fueron: i) caracterizar físico- químicamente el efluente de celulosa, en conjunto con ello evaluar la toxicidad aguda mediante el bioindicador *D. magna*. ii) evaluar los efectos subletales del efluente de celulosa por medio del comportamiento de ingesta mediante el bioindicador *D. magna* iii) evaluar la toxicidad crónica del efluente de celulosa Kraft, mediante el bioindicador *D. magna*. Referente a lo expuesto este seminario de investigación se presentan evidencias toxicológicas que permiten concluir que los efluentes de celulosa Kraft tratados mediante sistemas de tratamientos biológicos no presentan toxicidad aguda sobre *D. magna*. Por otro lado en la evaluación de toxicidad subletal, mediante los ensayos de alimentación (Feeding assay) con efluentes de celulosa, *D.magna* presentó un efecto negativo en la capacidad de ingesta, en cambio en los ensayos de alimentación post- exposición (Feeding assay post-exposure)*D: magna* presento un efecto positivo presentando una mayor capacidad de ingesta

En complemento a los ensayos antes mencionados, los resultados de toxicidad de tipo crónica sobre *D. magna*, evidenció alteraciones en todo el ciclo de vida, observados en parámetros tales como reproducción, mudas, camadas y TCA.

Estos resultados evidencian la posibilidad de realizar una evaluación toxicológica utilizando tanto ensayos crónicos como también ensayos de corto tiempo de exposición como los subletales.

## ABSTRAC

Currently, Chile has a great growth in Kraft pulp mill production, with a production of 4.7 millions of ton per year. Related to this growth, there is also an increase in the volumes of liquid waste disposed to the environment, which for years have been considered as one of the main sources of contamination of the aquatic systems. This research evaluated the potential impact that the pulp mill effluents on zooplankton organisms in freshwater aquatic environments. For this, the goals were: i) Physico-chemical characterization of the pulp mill effluent, as well as evaluating the acute toxicity by *D. magna* bioindicator. ii) Evaluate the sublethal impact of the pulp mill effluent via intake behavior through *D. magna* bioindicator. iii) Evaluate the chronic toxicity of the Kraft pulp mill effluent through *D. magna* bioindicator. Regarding the above, this research seminar shows toxicological evidence that the Kraft pulp mill effluents treated with biological treatment systems don't have acute toxicity over *D. magna*. Furthermore in the evaluation of sublethal toxicity, through the Feeding assays with pulp effluents, *D. magna* had a negative impact in the intake capacity. On the other hand, in the post-exposure Feeding assays *D. magna* had a positive impact showing a higher intake capacity.

In addition to the above mentioned assays, the chronic toxicity results on *D. magna* showed alterations in the life cycle, observed in parameters such as reproduction, molts, broods and TCA.

These results show the possibility of performing a toxicological evaluation using chronic assays as well as short time exposure assays such as sublethals.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, Chile presenta un gran crecimiento a nivel forestal, debido principalmente a la industria de celulosa Kraft blanqueada, con una producción anual de 4,7 millones de toneladas de pulpa de celulosa de fibra larga (BSKP, pino) y fibra corta (BSKE, eucalipto) (Chiang *et al.*, 2010). Asociado a este crecimiento, existe también un incremento en los volúmenes de residuos industriales líquidos (RILES) eliminados al ambiente, los cuales han sido por años considerados como una de las principales fuentes de contaminación de los sistemas acuáticos (Vidal *et al.*, 2007).

A través de los años, esta actividad ha desarrollado cambios en el proceso productivo implementando tecnologías de tratamiento secundario para la degradación de la materia orgánica. Para este fin, las tecnologías disponibles, son de tipo biológica aeróbicas. Sin embargo, a pesar de la implementación de este tipo de tecnologías, se ha demostrado por un lado, que existe una alta fracción de compuestos aromáticos en los efluentes que no son biodegradados, y por otro, alteraciones en organismos que habitan los cuerpos receptores de las descargas (Chamorro *et al.*, 2009). Es factible que estos tratamientos no tengan la capacidad de eliminación completa de compuestos específicos (extractivos de la madera) y por ello, existe un potencial biológico en los efluentes tratados (Chamorro *et al.*, 2009; 2011).

La madera está constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y compuestos orgánicos tales como: terpenos, fenoles polares, ácidos grasos, ácidos resínicos y fitoesteroles, extraídos durante el proceso de pulpaje. La concentración de cada uno de ellos en los efluentes tratados es altamente variable, dependiendo de la materia prima utilizada, los procesos de blanqueo y tecnologías de tratamiento empleadas. Las maderas blandas como el pino, presentan mayor cantidad de extractivos (0,5-7%) que las maderas de fibra larga como el eucalipto (0,2-3,5%) (Lafleur *et al.*, 1996). Así las maderas de fibra corta son más ricas en ácidos resínicos y las de fibra larga son más ricas en fitoesteroles y triterpenos (Verta *et al.*, 1996). Por lo tanto, la materia prima en gran parte condiciona la composición del efluente final (Videla and Diez, 1997). Numerosos estudios han determinado que la compleja mezcla de sustancias que componen los efluentes de las

industrias de papel y celulosa, afectan adversamente a la fisiología de los organismos acuáticos (Van Der Kraak *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 2000).

La evaluación de los efectos de los RILES provenientes de la industria de celulosa en organismos acuáticos usualmente incluye test de toxicidad agudos y crónicos (Villarroel *et al.*, 2003). De acuerdo a Fernández-Casalderrey *et al.* (1994) y Chiang *et al.* (2010), los cambios en el comportamiento de los peces han sido utilizados con éxito como un indicador rápido y sensible de stress tóxico. Sin embargo, existe poca evidencia del desarrollo de índices de comportamiento con zooplancton (Ferrando *et al.*, 1996; Olmstead and Leblanc, 2000; Xavier *et al.*, 2005; López *et al.*, 2012). En este sentido, los crustáceos cladóceros del género *Daphnia sp.* (EPA 1999), presentan características fisiológicas y reproductivas que permiten evaluar la toxicidad a nivel agudo, crónico y subletal. A través de estos microcrustáceos, se ha identificado que, en general, los efluentes de celulosa Kraft, no generan efectos agudos (Gaete *et al.*, 1999). Sin embargo, Xavier *et al.* (2005), observaron que estos efluentes podrían contener compuestos con potencial biológico que induce alteraciones sobre la fisiología de *D. magna*. Por otro lado, Villarroel *et al.* (2003) y Martin-Creuzburg *et al.* (2006), sugieren que el comportamiento en tasas de ingesta de *Daphnia magna* (efectos subletales) es una función fisiológica, debido a esto, puede ser considerado como un factor importante de estudio a tratar en la toxicidad de contaminantes sobre organismos acuáticos y pueden ser utilizadas como una respuesta inicial para evaluar una perturbación medioambiental. De acuerdo a lo anterior el objetivo de esta investigación es determinar efectos subletales y crónicos de efluentes de celulosa Kraft en *Daphnia magna*.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. Industria de Celulosa en Chile**

En las dos últimas décadas, la actividad destinada a la producción de celulosa, ha adquirido una creciente importancia socioeconómica y ambiental (Pokhrel and Viraraghavan, 2004). En Chile, y específicamente, en la Región del Biobío, la celulosa Kraft ha impulsado una creciente participación en los mercados globales, generando un importante eje de desarrollo económico (Orrego *et al.*, 2010). En Chile, la industria de celulosa, está dirigida por dos

grandes empresas, una de ellas es la Compañía Manufacturera de Papeles y Cartones (CMPC), mientras que la otra es Celulosa Arauco y Constitución (CELCO), las cuales distribuyen a lo largo del país, 9 plantas operantes, como se observa en la Tabla 1 (Vidal *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2010). Específicamente, están localizadas entre la Región del Maule (VII) y de Los Ríos (XIV), destacándose la Región del Biobío (VIII), con una producción nacional entre 32 a 35 % del total (Xavier, 2006; Belmonte *et al.*, 2006).

Hasta el momento, la industria de celulosa Kraft, ha basado su producción en el uso de pino (fibra larga; BSKP) como materia prima la cual representa el 76% de las plantaciones forestales, y las restantes correspondientes a *Eucalyptus globulus* (fibra corta; BSKE) (Videla and Diez, 1997). Sin embargo, se espera que esta tendencia cambie a futuro, hacia el eucalipto (fibra corta; BSKE) principalmente por el tiempo de corte de esta última especie (Vidal *et al.*, 2007),

A través del tiempo, esta industria ha implementado tecnologías avanzadas incorporadas en la línea de producción, tal como la cocción extendida, la deslignificación por oxígeno y blanqueo libre de cloro elemental (ECF) (Videla *et al.*, 2004), complementado con los sistemas de tratamientos de residuos líquidos tales como: lagunas aireadas extendidas, lodos activados y sistemas de reactor de biopelículas de lecho móvil MBBR: (Movil Bed Biofilm Reactor). Estas tecnologías han contribuido a minimizar el impacto ambiental de los efluentes de estas industrias que requieren para su proceso alrededor de 40 m<sup>3</sup> de agua por tonelada de pulpa generada para su proceso (Rosa *et al.*, 2010).



**Tabla 1.** Plantas de celulosa Kraft operantes en Chile: Tipo de proceso, materia prima, sistema de tratamiento y cuerpo receptor de efluentes.

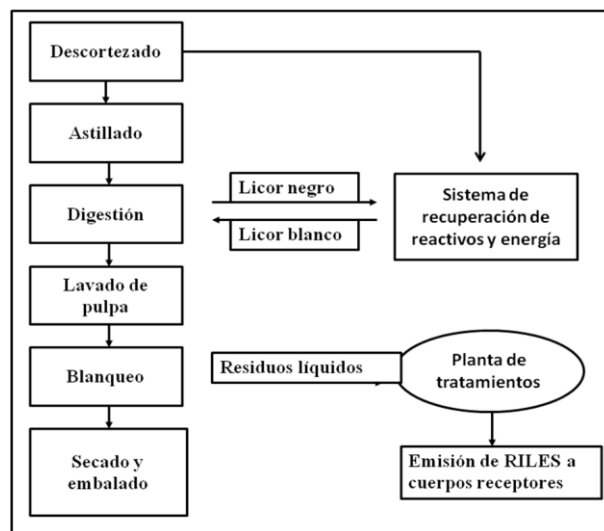
<b>Planta</b>	<b>Región</b>	<b>Proceso</b>	<b>Tipo de Celulosa</b>	<b>Producción (miles ton/año)</b>	<b>Tratamientos de efluentes</b>	<b>Cuerpo Receptor</b>
Constitución	VII	Kraft/SB	UKP	350	TP:CL; TS: LA	Pacífico
Laja	VIII	Kraft/ECF	BSKP-UKP	340	TP:CL;TS:MBBR+LO	Río Biobío
Arauco I	VIII	Kraft/ECF	BSKP-BEKP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

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

## 1.2. Proceso de Pulpaje Kraft

La industria de celulosa Kraft blanqueada corresponde al 92% de la producción en Chile, y basa sus procesos en dos etapas principales: pulpaje y blanqueo. El proceso de pulpaje, consta en la separación de las fibras de celulosa de los componentes de la madera (lignina, terpenoides extraíbles y ácidos resínicos, entre otros). Para esto, en una primera etapa de astillaje, la madera es cortada en pequeños trozos que posteriormente son digeridas a altas temperaturas y alta presión, en una solución alcalina, llamada licor blanco, la cual se compone de sulfuro de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) e hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) y que tienen por función extraer la lignina. En esta etapa, se obtiene como producto la pulpa de celulosa y un residuo líquido llamado licor negro. Actualmente el licor negro es recuperado para ser procesado por la planta de celulosa en un sistema de recuperación de compuestos químicos que son nuevamente inyectados al sistema en un proceso de ciclo cerrado y una parte es destinada a la generación de energía. Todo este proceso es denominado proceso Kraft.

La pulpa generada del proceso de digestión se va a una planta de blanqueamiento, donde se utiliza dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), proceso químico denominado libre de cloro elemental (ECF) (Oñate, 2006). Finalmente, se realiza un proceso de lavado con agua para retirar los posibles contenidos de componentes extraíbles. (Mc Master *et al.*, 2006). Es en este último proceso de lavado de la pulpa blanqueada donde se generan residuos líquidos industriales (RILES), los cuales se tratan mediante varios sistemas para eliminar la carga orgánica presente.



**Figura 1.** Proceso productivo de la industria de celulosa Kraft.

### 1.3. Constituyentes de la madera

Los efluentes de plantas de celulosa Kraft contienen una mezcla compleja de constituyentes orgánicos. La materia prima y el proceso productivo empleado son los principales responsables de las características físico-químicas de los efluentes (Rintala and Puhakka, 1994; Gaete *et al.*, 1999). La madera utilizada en este proceso se caracteriza por tener celulosa (42-50%), hemicelulosa (25-35%), lignina (17-31%) y extractivos (0,2-7%) (Tabla 2). (Xavier *et al.*, 2004).

**Tabla 2.** Componentes de la madera presentes en las materias primas más usadas por la industria de celulosa Kraft.

<b>Componentes de la madera</b>	<b><i>E. globulus</i> (%)</b>	<b><i>P. radiata</i> (%)</b>
Celulosa	42-46	43-50
Hemicelulosa	35	25
Lignina	17-26	25-31
Compuestos extraíbles	0,2-3,5	0,5-7,0

Extraída de :Xavier *et al.*, 2004

Es así, que la madera de pino posee una mayor cantidad de extractivos 0,5-7,0%, mientras que la madera procesada en base a eucalipto presenta entre 0,2 y 3,5% (LaFleur, 1996; Oñate, 2006). La importancia de ellos no está en las cantidades que se presentan, sino en los efectos que pueden producir (Fernández *et al.*, 2007). Estos compuestos extraíbles en la madera varían entre distintas especies de árboles y especialmente entre madera dura y blanda. Así, en la especie *Eucalyptus globulus* está comprendida principalmente por esteroides (31,12%), ésteres de esteroides (25%), ácidos grasos de cadena larga (13,4%), cetonas de esteroides (10,5%), hidrocarburos (8%), triglicéridos (6,37%), ceras (2,79%), tocoferoles (1,21%), diglicéridos (0,82%), monoglicéridos (0,76%) y alcoholes grasos (0,17%) (Fernández *et al.*, 2001). En la especie de *Pinus radiata* los porcentajes, corresponden a ácidos resínicos (54,13%), diterpenos (15,15%), monoterpenos (14,01%), ácidos grasos (12,79%) y sesquiterpenos (3,92%) (Hewitt *et al.*, 2006). Además los llamados esteroides, específicamente están principalmente en *Eucalyptus globulus* y los ácidos resínicos están presentes en mayor proporción en madera de *Pinus radiata* (Latorre *et al.*, 2003).

Los ácidos resínicos son componentes de la madera que son liberados durante las distintas etapas del proceso de conversión de la madera en pulpa Kraft. Ellos presentan una estructura muy estable y resisten la degradación química, de manera que resisten el proceso de pulpaje y blanqueo. Estos compuestos son de interés porque presentan una elevada toxicidad para los peces (Peng and Roberts, 2000). Estos compuestos corresponden a diterpenos tricíclicos, clasificables en dos familias: los pimaranos y los abietanos, de acuerdo a los sustituyentes en el carbono-13. Son insolubles en agua, y solubles en solventes orgánicos, neutros no polares que pueden ser clasificados en dos tipos: abietanos (abiético, dehidroabiético, neoabiético, palústrico, y levopimárico) y pimáricos (pimárico, isopimárico, y sandaracopimárico), los más abundantes son el ácido dehidroabiético y el ácido abiético, 14-30% y 19-33%, respectivamente (Belmonte, 2004; Kostamo *et al.*, 2004). En general son ácidos débiles y relativamente lipofílicos, con un coeficiente de partición octanol agua ( $\log K_{ow}$ ) no mayor a 5 (Peng and Robert, 2000) y son encontrados en efluentes de celulosa previamente tratado en concentraciones de 0,008-1,36 mg/L (Quinn *et al.*, 2003; Kostamo and Kukkonen, 2003; Kamaya *et al.*, 2005). A pesar que los ácidos abiético y dehidroabiético representan más de un 70% de la concentración total de ácidos resínicos, se considera que el ácido isopimárico como el más tóxico entre aquellos

ácidos presentes en los efluentes de celulosa. La toxicidad está estrechamente relacionada a la solubilidad en agua, en sentido inverso, es decir aquellos menos solubles son los más tóxicos (Quinn *et al.*, 2003).

#### **1.4 Efectos asociados a efluentes de celulosa Kraft**

Una primera aproximación en la evaluación de los potenciales efectos de los efluentes de celulosa fueron los ensayos de corto plazo utilizando organismos de prueba como invertebrados. Pruebas evaluando mortalidad en el microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* (para efluentes descargados en cuerpos de agua dulce); crecimiento y sobrevivencia en gametos de erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*), para efluentes de celulosa y papel descargados en ambientes marinos (Orrego, 2005), son algunos de los ejemplos cuyos resultados permitieron demostrar los efectos agudos y posteriormente una significativa disminución de la toxicidad de esos efluentes luego de la implementación de tecnologías para tratamiento secundario (Scroggins and Miller, 2000; Lowell *et al.*, 2003). Aunque estos estudios permitieron una primera aproximación respecto de la evaluación de la toxicidad a corto plazo de los efluentes de celulosa, se hizo necesario la necesidad de pruebas que permitieran evaluar efectos subletales en la salud de los organismos presentes en los cuerpos receptores, utilizando estrategias adecuadas para su estudio tanto en condiciones de laboratorio como de campo. (Barata *et al.*, 2004)

En este contexto, numerosos estudios han determinado que la compleja mezcla de sustancias que componen los efluentes de las industrias de papel y celulosa, afectan la fisiología de los organismos acuáticos (Larsson *et al.*, 2000). Investigaciones realizadas para la identificación del agente causante suponían que los compuestos organoclorados persistentes eran los responsables de estos efectos, sin embargo nuevas investigaciones han conducido a la identificación de compuestos naturales del tipo esteroides, y ácidos resínicos como los responsables de comprometer la capacidad reproductiva de los organismos acuáticos, comportándose algunos de ellos como moduladores del sistema endocrino (Larsson *et al.*, 2000). Estos compuestos, tienen el potencial de interferir con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de hormonas naturales

responsables del mantenimiento de la homeostasis y la regulación de los procesos de desarrollo de los organismos (Altesor *et al.*, 2008).

Específicamente trabajos realizados en el comportamiento de peces, describen efectos como activación del sistema de detoxificación (MFO) del hígado, disminución de los esteroides, inmunodepresión, desfase en la madurez sexual, reducción del tamaño de gónadas y longitud del cuerpo, estrés oxidativo y aumento en los niveles vitelogenina, entre otros (Orrego *et al.*, 2005, 2006, 2009). Sin embargo, estos efectos observados son altamente específicos dentro del organismo. Estudios recientes, apuntan a evaluar estos compuestos específicos en la fisiología de microcrustáceos como *D. magna* para observar alteraciones a nivel individual (variación en la longitud del cuerpo y del abdomen) (Xavier *et al.*, 2005; López *et al.*, 2011), para poder tener una aproximación de efectos a nivel poblacional.

## **1.5 Ensayos de toxicidad**

A lo largo del tiempo, se han desarrollado distintos tipos de ensayos de toxicidad, que se define como el método utilizado para detectar y evaluar la capacidad inherente a un agente en producir efectos tóxicos sobre organismos vivos. Su principal objetivo, además de la obtención de datos para determinar los efectos sobre los sistemas biológicos, es la caracterización de la relación dosis-respuesta para el agente (Larraín, 1996). Por otro lado, un bioensayo corresponde al método utilizado para evaluar la potencia relativa de un agente químico sobre organismos vivos, a través de la comparación de este agente con el efecto de una solución patrón o estándar (Tortorelli *et al.*, 1990).

Las principales diferencias entre ellos están centradas en las concentraciones de tóxico empleadas y en la longitud de la exposición al mismo. Sin embargo, todos los ensayos tienen algunas características que les son comunes:

- a) Exposición al tóxico de grupos de organismos, pertenecientes a la misma población, en buenas condiciones de salud, aclimatados previamente a las condiciones del ensayo.
- b) Organismos mantenidos en condiciones ambientales y estandarizadas (calidad de agua, pH, salinidad) antes y durante el ensayo.

- c) Exposición a concentraciones graduadas del agente tóxico, seleccionadas apropiadamente.
- d) Disposición de grupos de control adecuados.
- e) Durante y al final de la exposición, una observación minuciosa de los signos de toxicidad presentes.
- f) Medición y registro detallado de los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados.
- g) Apropiado análisis estadístico de los datos obtenidos.

Según Tortorelli et al. (1990), de acuerdo al tiempo de exposición del tóxico, los bioensayos se clasifican en:

1. **Ensayos agudos:** Se da un corto periodo de exposición al tóxico en relación al periodo de generación de la especie de prueba; se los utiliza, generalmente para evaluar vertidos esporádicos de efluentes en un punto determinado. La respuesta a analizar es el *efecto agudo*, es el cual es efecto causado por la acción de una sustancia sobre organismos vivos, que se manifiesta rápida y severamente; se produce en un corto periodo de tiempo de exposición generalmente (entre 0 a 96 h). Sin embargo, el tiempo de exposición dependerá del organismo a ensayar.
2. **Ensayos crónicos:** El periodo de exposición cubre al menos, una generación del organismo de prueba. Permiten evaluar la exposición continua al tóxico. La respuesta a analizar es el *efecto crónico*, causado sobre organismos vivos, que normalmente se manifiesta después de días, semanas y meses, dependiendo del ciclo de vida de la especie de prueba. Se produce después de un periodo prolongado de exposición.
3. **Ensayos subletales:** El periodo de exposición es corto (menor a 7 días) y se consideran los efectos sobre los estados de vida más sensibles de los organismos utilizados. Estos ensayos se enfocan en la observación de cambios morfológicos del crecimiento, reproducción y sobrevivencia, entre otros. La respuesta a analizar es *efecto subletal*, el cual se produce por debajo del nivel que causa la muerte directamente, como resultado de la exposición a una determinada concentración del agente tóxico.

## 1.6 *Daphnia magna*: Ensayos subletales

El desarrollo reciente de bioensayos basados en el estudio de respuestas fisiológicas de organismos expuestos a contaminantes, ha proporcionado las herramientas bioquímicas necesarias para desarrollar programas de evaluación sobre los efectos de dichos compuestos. En las últimas décadas, un taxón de invertebrados ha emergido como grupo clave para la realización de ensayos ecotoxicológicos, los Crustáceos cladóceros (dáfidos), entre ellos, *Daphnia magna*, ha sido ampliamente utilizada como representante de invertebrados de agua dulce (Lewis and Maki, 1981; Goulden *et al.*, 1982; Gaete *et al.*, 1999; Olmstead and LeBlanc., 2000).

De acuerdo a Tortorelli *et al.* (1990) y Barata *et al.* (2004), son varias las razones que se concluyen para elegir a individuos de este género. Son organismos de amplia distribución y representantes importantes de la comunidad zooplanctónica, sensibles a una variada gama de tóxicos, fáciles de cultivar en laboratorio, se adaptan sin problemas a condiciones de cultivos estáticos, semiestáticos o de flujo continuo en acuarios. Además, poseen un bajo costo asociado a la mantención de los cultivos, presentan generaciones cortas y con alto número de crías, con lo que se puede realizar estudios sobre generaciones sucesivas en test de toxicidad crónicos. Finalmente son partenogenéticas, es decir, se reproducen asexualmente originando solo hembras en condiciones ambientales óptimas. De esta forma aseguran uniformidad de respuesta a determinadas condiciones ambientales. Contrariamente, la desventaja que puede presentar es que su sensibilidad a tóxicos podría ser dependiente de la edad.



### 1.7.1 Biología y ciclo de vida

**Tabla 3:** Ubicación taxonómica del organismo *Daphnia sp.*

<b>Phylum:</b>	Artrópoda
<b>Clase:</b>	Crustácea
<b>Subclase:</b>	Branchiopoda
<b>Orden:</b>	Cladocera
<b>Familia:</b>	Daphnidae
<b>Género:</b>	Daphnia

*Daphnia sp.* presenta una forma oval, sin segmentación externa. El caparazón cubre total o parcialmente el cuerpo y generalmente termina la parte posterior en una espina caudal. La cabeza que no es cubierta por el caparazón, se proyecta ventralmente en un corto pico y presenta un par de antenas birramosas que utilizan para la natación. Estos movimientos son generalmente verticales y espasmódicos (Lewis & Maki, 1981; Goulden *et al.*, 1982). El tórax presenta apéndices en número de 5 o 6 pares. Están adaptados para filtrar el alimento que llega a través de los movimientos del animal. Las sedas que presentan retienen a organismos (generalmente pertenecientes al nanopláncton) y partículas muy finas (menores de 30 micras), inclusive bacterias. Además estos apéndices torácicos presentan adaptaciones para la función respiratoria (Tortorelli *et al.*, 1990).

Cuando se encuentra en un medio bien aireado son incoloros, pero cuando el mismo presenta deficiencia de oxígeno se tornan de color rojo ya que poseen hemoglobina.

En su ciclo de vida presentan mudas pero no metamorfosis. El crecimiento del cuerpo ocurre inmediatamente después de la muda.

Cuando las condiciones son favorables para la vida de estos organismos, la reproducción en general es partenogenética (asexual), es decir que la población se encuentra formada exclusivamente por las hembras que producen por mitosis huevos con un número diploide de cromosomas (2n), de los cuales se forman nuevas hembras partenogenéticas. Cuando las condiciones ambientales se tornan desfavorables, algunas hembras partenogenéticas

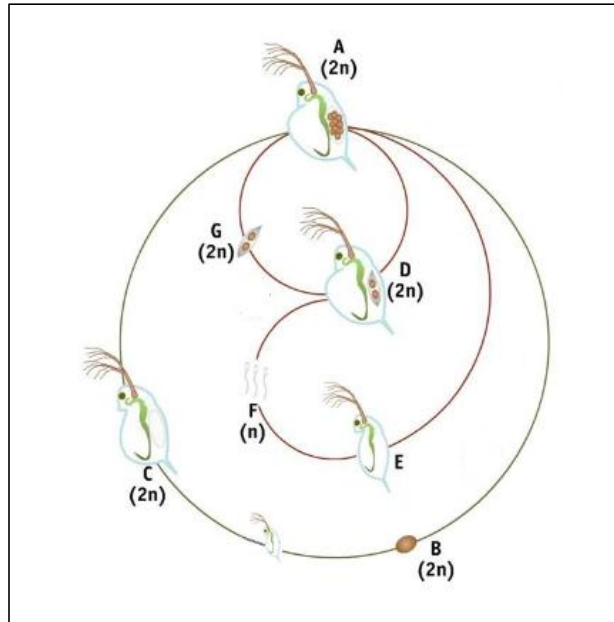
producen por meiosis huevos  $n$  (número haploide de cromosomas), de los cuales se forman machos con el mismo número de cromosomas.

Al mismo tiempo otras hembras producen huevos más grandes con mayor cantidad de reservas. Su número es menor comparado con los partenogenéticos. Estos también presentan el mismo número de cromosomas que los machos ( $n$ ). Cuando estos fecundan a las hembras, se forman en la cámara de cría de estas últimas, huevos de resistencia o efipios.

El efipio es un huevo oscuro de paredes gruesas que posee dos huevos más grandes que los partenogenéticos y presentan mayores reservas. Estas características los hacen soportar condiciones ambientales muy desfavorables (sequías, anoxias, bajas temperaturas, etc.). Cuando las condiciones para el desarrollo de estos organismos vuelve a ser óptimas, a partir de estos dos huevos podrían generarse dos nuevas hembras diploides ( $2n$ ), pero con una dotación distinta a la de su madre. Los mecanismos fisiológicos por los cuales se desencadena este fenómeno todavía son desconocidos (Tortorelli *et al.*, 1990). El crecimiento es rápido, siendo completado en menos de un minuto como se registro en *D. magna* (Tortorelli *et al.*, 1990). Una vez que este se ha endurecido no hay incremento de tamaño hasta después de la siguiente muda. Se pueden reconocer cuatro periodos en el ciclo de *Daphnia*; huevo, juveniles, adolescente y adulto. El periodo de huevos se desarrolla completamente dentro de la cámara de cría de la madre. Los juveniles de *Daphnia spp* nacidos por partenogénesis, son liberados desde las cámaras de crías de las madres y presentan un aspecto similar al de adultos inmaduros. El periodo juvenil presenta entre 4 a 5 estadios.

El adolescente es breve y el número de estadios varía entre 1 o 2; es en este periodo donde se desarrolla la primera camada de huevos dentro del ovario. El adulto, en cambio, es el que presenta mayor número de estadios. La aparición de la función reproductiva es la que marca el comienzo de este último periodo (Tortorelli *et al.*, 1990).

El número de jóvenes producidos por hembra, también varía entre cada especie y de acuerdo al estado del individuo y su edad, *D. magna* puede llegar a producir como máximo 30 juveniles por camada, pero normalmente el número de crías varía entre 6 a 10



**Figura 2:** Ciclo de *Daphnia magna*. En Donde ABC corresponde al ciclo asexual y AEDG incluye ciclo sexual.

### 1.7.2 Ensayos de alimentación: Test Feeding assay

Villarroel *et al.* (2003) y Martin-Creuzburg *et al.* (2006) sugieren que el comportamiento en la tasa de ingesta de alimento de *D. magna* es una función fisiológica y puede ser considerado como un factor importante de estudio a tratar en la toxicidad de contaminantes sobre organismos acuáticos. Estos criterios de valoración pueden ser utilizados como una respuesta inicial para evaluar una perturbación medioambiental. Por otro lado, ayuda a explicar otras observaciones en los organismos, tales como la reducción de sobrevivencia, crecimiento y reproducción (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1994).

La ingesta de alimento en *Daphnia* es a través de filtración o absorción del medio, de esta forma, exponiéndola a mezclas complejas como el efluente de celulosa Kraft, quedando en evidencia la presencia de aquellos compuestos contenidos en los efluentes, capaces de alterar su metabolismo. Por otra parte *D. magna* se alimenta de partículas de diferentes tamaños y es incapaz de hacer una selección de aquellas que van consumir con respecto a su calidad nutricional lo que también indicaría que las partículas orgánicas presentes en efluentes son capaces de ser incorporadas y de esta forma puede determinarse un efecto subletal (Martin-Creuzburg *et al.*, 2006).

Para ello, existen antecedentes previos, en los cuales, se ha demostrado que los contaminantes orgánicos e inorgánicos son capaces de afectar las tasas de alimentación en *Daphnia sp*, en un proceso que puede estar relacionado con la absorción de partículas del alimento ingerido (Barata *et al.*, 2002) y esto podría tener una alta relevancia a nivel ecosistémico dulceacuícola (Barata *et al.*, 2008).

Investigaciones realizadas por Barata *et al.* (2004; 2006; 2008), demuestran que los ensayos subletales realizados en un corto periodo de tiempo 1-6 días de su ciclo, son fundamentales para la evolución de las camadas, número de mudas y crías. Es así que en esta etapa de crecimiento es en donde se aprecia la mayor sensibilidad de esta especie, ya que a medida que se incorpora mas alimento este le permite acelerar el metabolismo sobre todo en las primeras etapas del desarrollo que son las de más alto requerimientos energéticos. Por lo que si este comportamiento de ingesta se ve alterado, demostrará que los contaminantes presentes en las matrices a evaluar, no solo son capaces de producir un efecto subletal en *D. magna*, sino que también pueden producir efectos crónicos.

Por lo tanto, efectos negativos en relación a las tasas de alimentación, podría no solo causar efectos adversos para una especie sino que también se podría interpolar lo que sucedería en toda la población de ésta y así en toda la trama trófica que dependen de los organismos de los primeros escalafones, ya que el flujo en las redes tróficas acuáticas a menudo se ven limitadas por la transferencia de carbono orgánico a los niveles superiores.

Por otra parte, las interacciones entre los productores primarios y los consumidores herbívoros son de crucial importancia en la productividad primaria (Lampert, 1987), por esto que a menor consumo de fitoplancton mayor será el crecimiento de éste, pudiendo causar un efecto en floramientos microalgales y así producir un desequilibrio en todo el ecosistema (Martin-Creuzburg *et al.*, 2006).

## **2. HIPOTESIS**

El efluente de celulosa Kraft presenta efectos a nivel subletal y crónicos en *Daphnia magna* sobre el comportamiento alimenticio, frecuencia de mudas y tasa de crecimiento alométrica.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. General**

Determinar efectos a nivel subletal sobre el comportamiento alimenticio y crónico mediante la tasa de crecimiento alométrico, fertilidad y frecuencia de mudas en *Daphnia magna* expuesta a efluente de celulosa Kraft.

### **3.2. Específicos**

1. Evaluar físico-químicamente el efluente de celulosa Kraft, determinando la toxicidad aguda que este presenta sobre el bioindicador *Daphnia magna*.
2. Evaluar los efectos subletales del efluente de celulosa Kraft sobre el bioindicador *Daphnia magna*.
3. Evaluar la toxicidad crónica del efluente de celulosa Kraft, mediante el bioindicador *Daphnia magna*.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1. Efluente de celulosa Kraft**

Se utilizó un efluente proveniente del tratamiento biológico de la industria de celulosa Kraft. Este efluente utiliza como materia prima *Pinus radiata* y posee tecnología de blanqueo ECF (Libre de cloro elemental). Las muestras fueron almacenadas en bidones de 5L refrigeradas y mantenidas en oscuridad a  $4 \pm 1^\circ \text{C}$ .

### **4.2. Bioensayos a través de *Daphnia magna***

#### **4.2.1. Cultivos de *Daphnia magna***

Se utilizó *Daphnia magna*, obtenida desde cultivos del Laboratorio de Bioensayos del Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile de la Universidad de Concepción. Los cultivos se realizaron según el procedimiento de normativa chilena (NCh2083. Of 1999). Se prepararon las soluciones de agua reconstituida, de dilución y de cultivo agregando  $\text{NaHCO}_3$  (2,59 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (4,93 g/L), KCl (0,23 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (11,76 g/L) a 1 L de agua destilada (NCh 2083. Of 1999) y con un contenido de oxígeno disuelto mayor al 80% (EPA, 1993). El medio fue renovado tres veces por semana, y los cultivos fueron alimentados de acuerdo a Xavier *et al.* (2005).

#### **4.2.2. Cultivos de microalgas (*Chlorella vulgaris*)**

Se utilizó *Chlorella vulgaris* obtenidas desde cultivos del Laboratorio de Ficología de la Universidad de Concepción, como fuente de alimento para *D. magna*. Los cultivos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento de USEPA (1993).

En ambos medios cada una de las sales fue disuelta en 0,5L de agua mili Q y esterilizada a  $121^\circ \text{C}$  por 30 min en el equipo de autoclave Tempra, modelo TMQ CV 3870 .Las microalgas se incubaron en matraces erlenmeyer de 1L a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  bajo luz de espectro blanco en un fotoperiodo de 18 h luz y 8 h de oscuridad.

Para el cultivo de *C. vulgaris* en el medio EPA, se inoculó una concentración de algas preexistentes y conocidas ( $4,75 \times 10^4$  células/ml) dando así inicio al conteo diario en la curva de crecimiento. Las microalgas se incubaron a  $23 \pm 2$  °C bajo luz de espectro blanco en un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

#### **4.3 Determinación de la toxicidad aguda del efluente de celulosa Kraft**

Se evaluó la toxicidad aguda del efluente secundario de celulosa Kraft, utilizando neonatos de *D. magna*, menores a 24 h de vida. Cinco de estos organismos fueron depositados en envases de borosilicato, conteniendo 30 mL de efluente a distintas concentraciones durante 48 h, sin recambio ni alimentación. Las concentraciones ensayadas correspondieron a diluciones seriadas en base 2, expresadas en porcentaje: 100, 50, 25, 12,5 y 6,25%. Pasado ese tiempo, se evaluó la mortalidad de los organismos ( $LC_{50}$  48 horas). El ensayo fue realizado en cuadruplicado y los datos fueron analizados mediante PROBIT (USEPA 1993). Las condiciones del ensayo se observan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna*.

<b>Bioensayo Agudo</b>	<b>Características</b>
Duración de la prueba	24- 48 Horas
Temperatura	20 ± 0,2 °C
Fotoperíodo	16 horas luz ; 8 horas oscuridad
Tamaño de la cámara de prueba	30 mL
Volumen de la solución de prueba	25 mL
Edad de los organismos	Neonatos menores a 24 horas
Número de organismos por cámara	5
Número de replicas por concentración	4
Número de organismos por concentración	20
Agua de dilución	Agua reconstituida: Dureza: 250 mg/L ± 25 mg/L, expresada como CaCO <sub>3</sub> ; pH: 7,8 ± 0,2; OD: sobre un 80 % de saturación.
Criterio de toxicidad	Mortalidad LC <sub>50</sub>
Criterio de aceptabilidad	Sobrevivencia de Controles sobre 90 %

#### **4.4. Determinación de toxicidad subletal en *Daphnia magna***

##### **4.4.1. Ensayo de alimentación: Feeding assay en efluente secundario de celulosa Kraft.**

La respuesta de alimentación se evaluó a través de ensayo de toxicidad de 24 h de exposición. Grupos de 5 neonatos fueron expuestos a 20 mL de diferentes diluciones seriadas del efluente tratado biológicamente, expresadas en porcentajes: 100; 50; 25; 12,5 y 6,25 % previamente filtrados, utilizando filtros de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro. Se utilizó 2 controles, uno blanco (agua reconstituida) con algas y un blanco (agua reconstituida) con *D. magna* y microalgas. Agua reconstituida fue utilizada como control.



Posteriormente se adicionó *Chlorella vulgaris* en una concentración de  $5 \times 10^5$  células /mL (equivalente a 1,5 mg C/mL). En ensayo fue realizado en una zona oscura para que las algas no se reprodujeran, generando falsos negativos. Luego de 24 h se evaluaron las concentraciones finales de microalgas para evaluar la cantidad ingerida por los organismos de *D. magna*, contando las células en cámara de Neubauer (Barata *et al.*, 2008). El ensayo fue realizado en triplicado y los datos fueron analizados con Test de Dunnett.

#### **4.4.2. Ensayo de alimentación post-exposición: Feeding Assay Post-exposure**

La respuesta de alimentación se evaluó a través de un ensayo de toxicidad de 24 h de exposición. Grupos de 60 neonatos fueron expuestos a 500 ml de diferentes diluciones seriadas del efluente tratado biológicamente, expresadas en porcentajes: 100; 50; 25; 12,5 y 6,25 % y 2 controles, uno blanco (agua reconstituida) con algas y un blanco (agua reconstituida) con *D. magna* y microalgas. Agua de reconstitución fue utilizada como control. Transcurridas las 24 horas de exposición se retiraron los neonatos del efluente y se dispusieron en viales de vidrio conteniendo 20 ml de agua de cultivo para *D. magna*, agregando la microalga *Chlorella vulgaris* en una concentración de  $5 \times 10^5$  células/mL (equivalente a 1,5 mg C/mL), y se evaluó la cantidad de microalgas ingerida por *D. magna* luego de 4 h, mediante en recuento de las células disponibles en cámara de Neubauer. El ensayo fue realizado en oscuridad, para impedir la reproducción de las algas y que se produjeran falsos positivos, de acuerdo a Barata *et al* (2008). Se realizó un triplicado del ensayo y los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis estadístico de Dunnett.

#### **4.5. Determinación de toxicidad crónica en *Daphnia magna***

En primer lugar, se determinó la concentración letal ( $LC_{50}$ ) del efluente secundario de celulosa Kraft sobre *Daphnia magna*, utilizando concentraciones que no produjeron mortalidad en los dáfnidos , bajo  $LC_{50}$  obtenidas en el ensayo agudo.

Posteriormente, se determinó la toxicidad crónica del efluente. Para esto, neonatos de *D. magna* fue expuestos durante 21 días a un gradiente de concentraciones menores a LC<sub>50</sub> (75%; 50%; 25% y 12,5%) y agua de recambio como control. Se utilizó 1 neonato por tratamiento. Cada 48 h se realizó recambio de agua, agregando 10 ml de un cultivo de *C. vulgaris* y 5 ml de alimento preparado (3,15 g harina de pescado, 1,3 g de levadura y 0,25 g de alfalfa), eliminando antes los neonatos nacidos por cada organismo. El ensayo se realizó a temperatura y fotoperiodo controlados (20±1°C y 16 hrs luz–8 hrs oscuridad). Durante los 21 días, se evaluó el tamaño, longitud, camadas, número de crías, camadas totales y número de mudas (ASTM, 1988). Se realizaron 10 réplicas por cada tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados para determinar la concentración efectiva o concentración máxima de efecto no observado (NOEC) y la concentración mínima de efecto observado (LOEC), a través de estadístico Toxstat (EPA, 1993). Para evaluar el número de mudas de los organismos, se observaron diariamente la ecdisis o cascarón de mudas de crecimiento de *D. magna* para cada tratamiento, contabilizando y registrando cada muda. Las condiciones del ensayo se muestran en la Tabla 5.

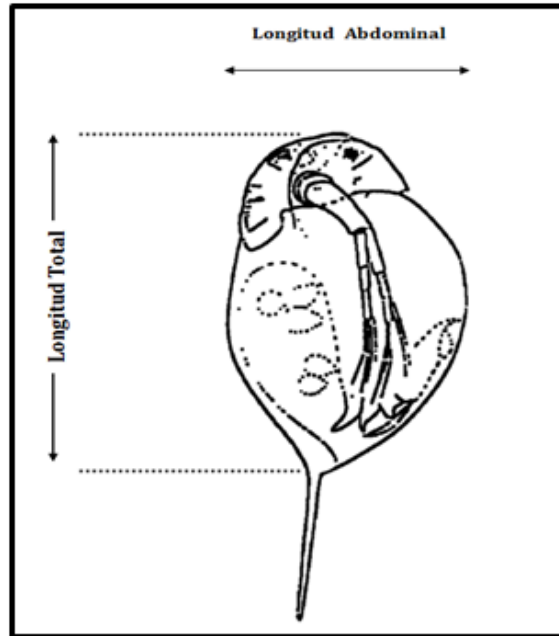
**Tabla 5.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad crónica con *Daphnia magna*.

<b>Bioensayo Crónico</b>	<b>Características</b>
Duración de la prueba	21 días
Temperatura	20 ± 0,2° C
Fotoperíodo	16 horas luz; 8 horas oscuridad
Régimen de alimentación	Cada 48 h
Tamaño de la cámara de prueba	60 mL
Volumen de la solución de prueba	50 mL
Edad de los organismos	Neonatos de 24 horas
Número de organismos por cámara	1 neonato
Número de réplicas por concentración	10
Agua de dilución	Agua reconstituida Dureza: 250 mg/L ± 25 mg/L expresada como CaCO <sub>3</sub>
pH agua dilución	7,8 ± 0,2
Oxígeno disuelto	Sobre un 80 % de saturación
Efecto	Reproducción y crecimiento
Criterio de aceptabilidad	Sobrevivencia de Controles sobre 90 %

#### **4.5.1. Tasa de Crecimiento Alométrica (TCA)**

Para evaluar el efecto del efluente de celulosa Kraft sobre el crecimiento del cuerpo de los organismos de *D. magna*, se fotografiaron los organismos al día 7 y 21 de haber comenzado el ensayo crónico. El registro fotográfico se realizó bajo el microscopio óptico modelo Carl Zeiss 426126 con cámara fotográfica acoplada a la lupa, luego se midió la longitud desde la

cabeza hasta la base del apéndice motor (espinas; cola) y la cavidad abdominal (Figura 3) justo en la mayor longitud lateral de los daphnidos, utilizando un ocular milimetrado (micrómetro) que fue incorporado al microscopio.



**Figura 3.** Relación abdomen /cuerpo en *Daphnia magna*, denominado Tasa de relación alométrica (TCA).

$$\%TCA: \quad [(LT / LA)-1] \times 100\% \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

**TCA:** Tasa de Crecimiento Alométrico.

**LA:** Longitud Abdominal

**LT:** Longitud Total

La tasa de crecimiento alométrico fue determinada de acuerdo a la Lopez *et al.* (2011), según la ecuación 1.

Las diferencias morfológicas fueron analizadas con los test estadísticos Dunnett's y Tukey en el programa estadístico "Toxstat".

Donde % TCA corresponde a la proporción entre el crecimiento del largo del cuerpo y ancho del cuerpo, expresado como porcentaje. Los datos fueron procesados estadísticamente, chequeando normalidad ( $\chi^2$  test) y homogeneidad de varianzas (Bartlett's test). La significancia de diferencias en parámetros de crecimiento aló métrico y reproductivos fue determinado por ANOVA seguido de Tukey's test, todo realizado con el paquete estadístico TOXSTAT (USEPA 1994).

#### **4.6. Caracterización físico-químico del efluente**

Se realizó la caracterización físico-química del efluente secundario de celulosa Kraft mediante DQO (Demanda Química de Oxígeno), DBO<sub>5</sub> (Demanda Biológica de Oxígeno disuelto a los 5 días) y fenoles totales de acuerdo con estándar methods (APHA – AWWA – WPCF, 1985). Nitrógeno total (NT) y fósforo total (PO<sub>4</sub><sup>-2</sup>-P) mediante kit espectrocuant NOVA-60 de Merck. Se determinó la medición del color mediante longitud de onda de A 400nm, lignina mediante UV 280nm y 272nm, compuestos aromáticos UV 254nm según Çeçen, (2003) y Fenoles Totales UV 215nm, Todas la muestras fueron filtradas en membranas Wathman 0.45 µm y medidas en un termo - espectrofotómetro Génesis 10UV Unicam..

## RESULTADOS

### 5.1 Caracterización fisicoquímica de efluente secundario de celulosa Kraft

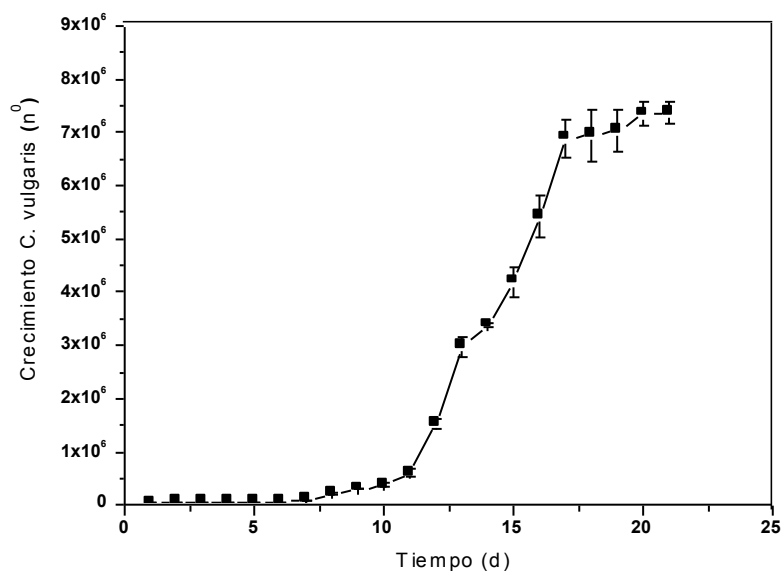
En La Tabla 6, se presentan los resultados de los análisis físico-químicos del efluente de celulosa Kraft. Se registro presencia de materia orgánica de tipo biodegradable y recalcitrante, en concentraciones promedio de 21,67 mg L<sup>-1</sup> y 321,50 mg L<sup>-1</sup>, para DBO<sub>5</sub> y DQO, respectivamente, además de compuestos fenólicos totales con un promedio de 156,30 medidos en Absorbancia, lignina 0,13 medidos en Absorbancia. , Ácidos. Lignosulfónicos 0,80 Absorbancia. También se determino el pH, dureza, conductividad con un valor promedio de 7,88; 68,50 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> y 1635,00 mS cm<sup>-1</sup> respectivamente.

**Tabla 6.** Caracterización de efluente de celulosa Kraft.

Parámetro	Unidad	Promedio
pH		7,88 ± 0,43
DQO (T)	mg O <sub>2</sub> mg L <sup>-1</sup>	321,50 ± 1,06
DBO <sub>5</sub>	mg O <sub>2</sub> mg L <sup>-1</sup>	21,67 ± 1,1
Lignina (UV 272 nm)	absorbancia	0,14 ± 0,00
Lignina (UV 280 nm)	absorbancia	0,13 ± 0,00
Ác. Lignosulfónico (UV 346 nm)	absorbancia	0,80 ± 0,04
Color (A <sub>440nm</sub> )	absorbancia	0,14 ± 0,00
Fenoles totales (UV 215 nm)	mg L <sup>-1</sup>	156,30 ± 0,00
Fósforo total	mg L <sup>-1</sup>	0,55 ± 0,21
Nitrógeno total	mg L <sup>-1</sup>	1,35 ± 0,07
Dureza	mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>	68,50 ± 0,35
Conductividad	mS cm <sup>-1</sup>	1635,00 ± 38,89

## 5.2 Curva de crecimiento con *Chlorella vulgaris*

En la Figura 4, se observa la curva de crecimiento de *C. vulgaris* en el medio EPA x 5, La cepa tuvo una cinética de crecimiento óptima, con una fase de adaptación (10 d aprox). Posteriormente una fase exponencial (10 d aprox.) y finalmente una fase estacionaria, posterior al día 20. Determinando para el día 20 un recuento de células de  $7,35 \times 10^5$ , número considerado óptimo para la determinación de ingesta de *D. magna*.



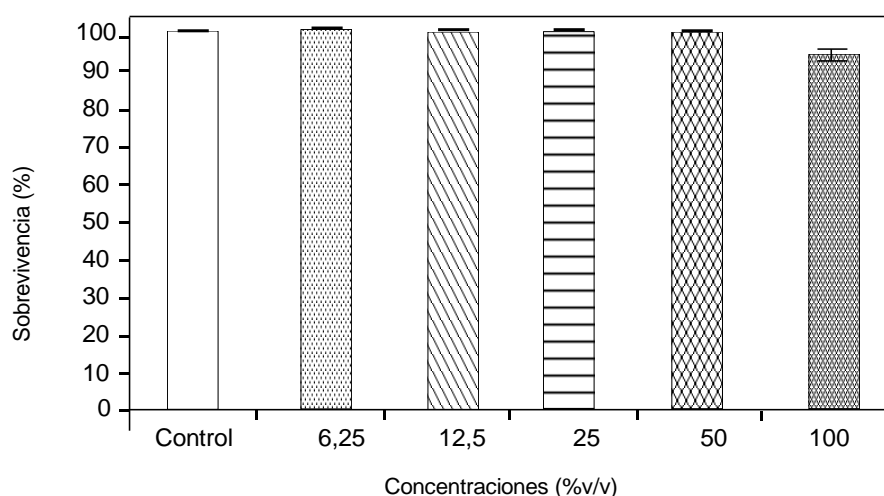
**Figura 4:** Curva de crecimiento para *Chlorella vulgaris*.

## 5.3 Ensayos de toxicidad

### 5.3.1 Toxicidad aguda

Con el propósito de determinar presencia de toxicidad aguda en el efluente secundario de celulosa Kraft en estudio, se determinaron valores de  $LC_{50}$  (concentración del efluente en la que se muere el 50% de la población de organismos de prueba) y así evitar posteriormente en los ensayos subletales y crónicos se registre mortalidad de organismos. La Figura 5, muestra que el efluente secundario de celulosa Kraft no presenta toxicidad aguda, por lo que no fue posible calcular el  $LC_{50-48h}$ . No obstante, se observa que a una concentración

del 100 % del efluente, existe una leve disminución de la sobrevivencia de *D. magna* (4%), aunque esta toxicidad no es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5:** Sobrevivencia de *Daphnia magna* expuesta a diferentes concentraciones de efluente secundario de celulosa Kraft.

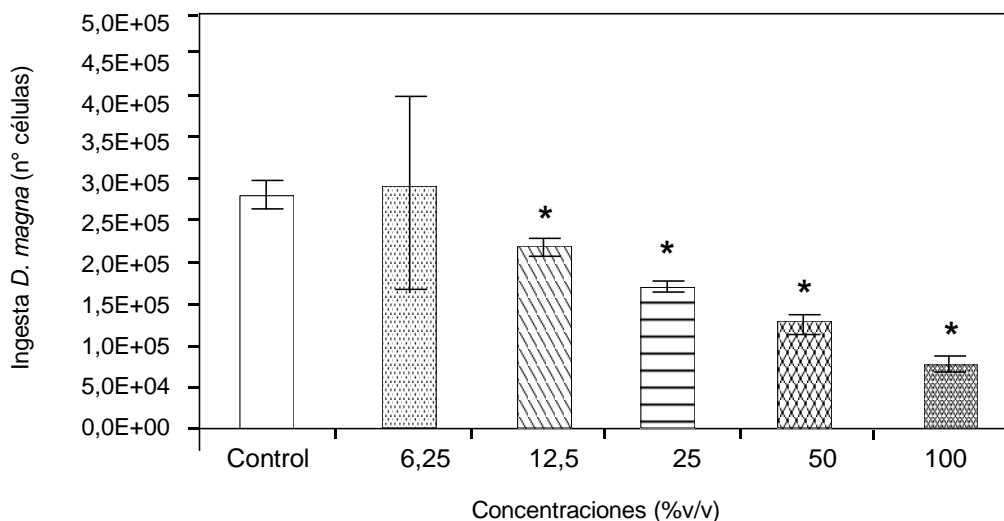
#### 5.4. Determinación de toxicidad subletal en *Daphnia magna*

##### 5.4.1 Ensayos subletales: Feeding assay

En la Figura 6, se muestra la ingesta de *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de efluente de celulosa Kraft, en ensayos de alimentación con *C. vulgaris*. Las barras muestran que a menores concentraciones de efluente los organismos de prueba son capaces de ingerir más microalgas que a las concentraciones mayores. En el control los organismos ingirieron el 55% de las células de microalgas agregadas al efluente de celulosa. Similar comportamiento tuvieron en la concentración más baja (6,25 %v/v) de efluente de celulosa Kraft, a la cual ingirieron un 58% del total de células agregadas. El patrón de ingesta que tuvo *D. magna* a las mayores concentraciones de efluente de celulosa Kraft fue disminuyendo en su comportamiento de ingesta de la microalga de forma inversamente proporcional a las concentraciones de efluente, así se muestra claramente en las barras de la figura, llegando a ingerir solo un 12% en la mayor concentración de efluente (100%v/v). Finalmente se descata que el control en blanco (agua reconstituida) con algas no tuvo



variaciones en el crecimiento de la microalga *C. vulgaris*, resultado importante a la hora de descartar falsos positivos en este ensayo.

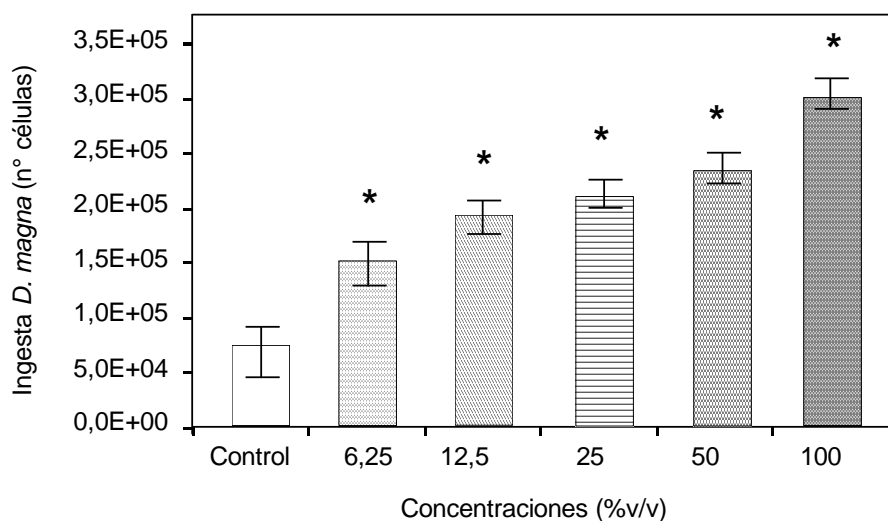


**Figura 6:** Número de células de *C. vulgaris* ingestadas por *D. magna* en ensayos de alimentación de 24 h de exposición a diferente concentraciones de efluente secundario de celulosa Kraft.

#### 5.4.2 Ensayos subletales: Feeding assay Post-exposure

La Figura 7 muestra la ingesta de *D. magna* en ensayos subletales de alimentación con la microalga *C. vulgaris*. En este ensayo post-exposición al efluente de celulosa, se puede apreciar que el comportamiento de *D. magna* fue distinto al ensayo de feeding assay o de exposición directa mostrado en la Figura 10. Se puede deducir que los organismos del control ingirieron un 14% de las células de microalgas agregadas a agua reconstituida, en cambio para las concentraciones de efluente de celulosa Kraft, la ingesta incremento progresivamente desde un 30% a 61%, desde 6,25 al 100. Debido a esto, la tendencia del comportamiento de ingesta fue directamente proporcional a las concentraciones del efluente. Finalmente se descata que el control en blanco (agua reconstituida) con algas no

tuvo variaciones en el crecimiento de la microalga *C. vulgaris*, resultado importante a la hora de descartar falsos positivos en este ensayo.

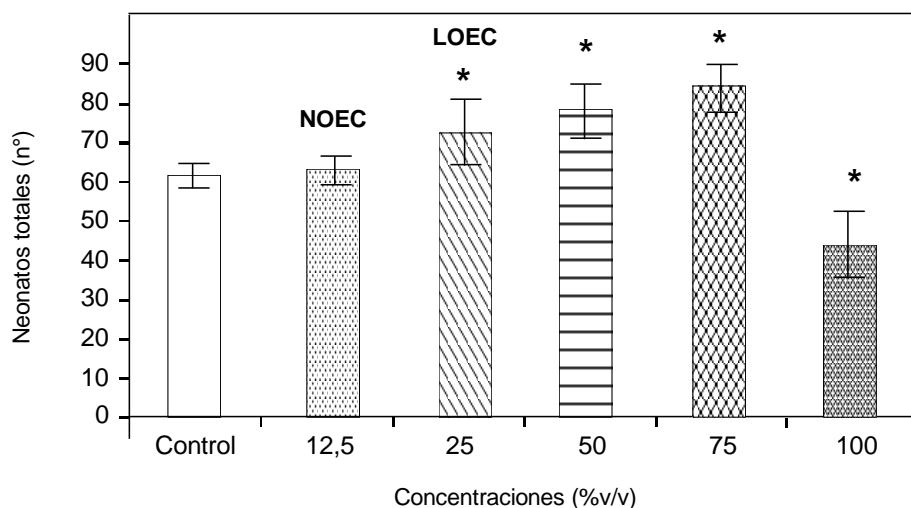


**Figura 7:** Número de células de *C. vulgaris* ingestadas por *D. magna* en 4h post-exposición a diferente concentraciones de efluente secundario de celulosa Kraft en ensayos de alimentación de 24 h.

### 5.5. Toxicidad crónica con efluente de celulosa

La toxicidad crónica fue evaluada mediante la producción del número de neonatos, NOEC (No observed effect concentration) y la LOEC (Lowest observed effect concentration), y TCA en *D. magna*. La Figura 8, muestra la producción de neonatos en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del efluente secundario de celulosa Kraft en comparación a un control, registrando un incremento en la producción de neonatos entre las concentraciones 25, 50 y 75 % respectivamente, con diferencia estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, para la concentración del 100 % se obtuvo una disminución de la producción de neonatos con respecto al control de un 26 % ( $p < 0,05$ ) por otro lado. Los valores de la máxima concentración de efluente que no causó efecto (NOEC) en *Daphnia magna* fue en 12,5%v/v y la concentración menor a la cual se observó un

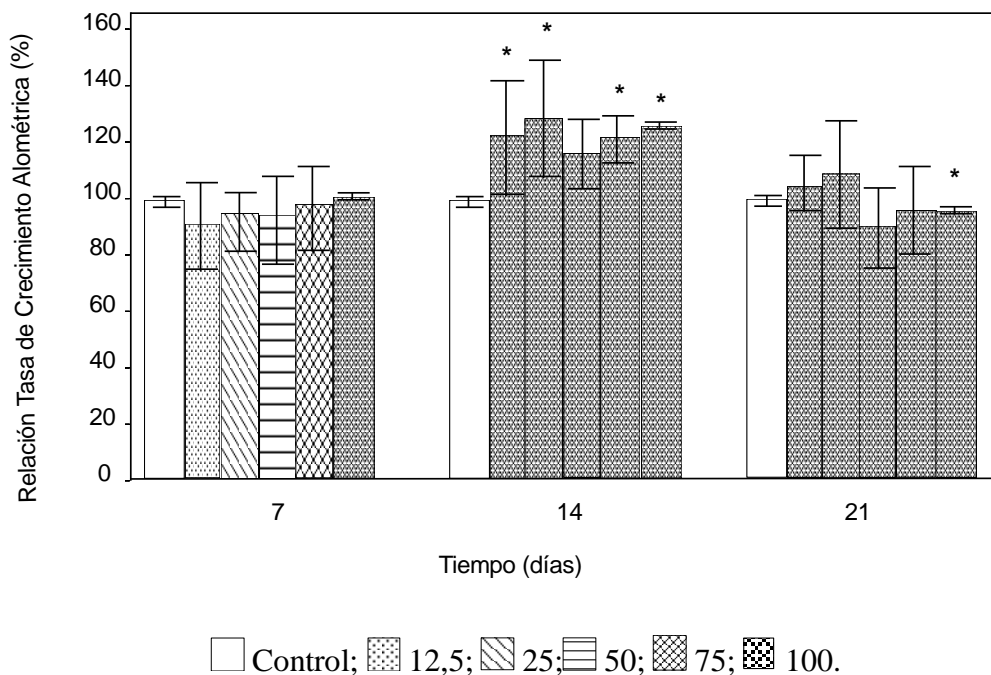
efecto (LOEC) en los organismos de prueba se encontró en la concentración del 25% v/v del efluente de celulosa Kraft.



**Figura 8:** Producción de neonatos de *D. magna* a diferentes concentraciones de efluente secundario de celulosa Kraft.

Finalmente la toxicidad crónica fue evaluada mediante la TCA en las mismas concentraciones mencionadas para la producción de neonatos en el efluente de celulosa Kraft (Figura 9). Para evaluar la actividad estrogénica sobre la morfología de *Daphnia magna*, se realizó un bioensayo crónico con efluente secundario de celulosa Kraft en concentraciones inferiores a  $CL_{50}$ , previamente determinada. Determinando la longitud total del cuerpo (LT) y la longitud abdominal (LA). Para la obtención de TCA, observando que los 7 primeros días se registró un mayor crecimiento de LT en todas las concentraciones de prueba. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ellas. En el día 14 se observa que la longitud total aumentó, disminuyendo la longitud abdominal por lo tanto se hizo más grande la relación LT/LA en comparación al control. Este fenómeno se repitió en cada una de las concentraciones de prueba (12,5; 25; 50; 75; 100%). Siendo estadísticamente significativos para las dos concentraciones más pequeñas (12,5 y 25%) y para las dos más altas (75 y 100%). Finalmente en el día 21 las relación LT/LA se

incrementó para las menores concentraciones (12,5 y 25%) y disminuyó para la concentración de 50, 75 y 100%, siendo sólo esta última estadísticamente significativa.



**Figura 9.** Tasa de crecimiento alométrica al cabo de 7, 14 y 21 días para *D. magna* expuesta a efluente secundario de celulosa Kraft.

La Tabla 7 muestra la toxicidad crónica en respecto del comportamiento reproductivo y de crecimiento en *D. magna* a través de la determinación la longitud del cuerpo, día primera camada, número de camadas por adulto, número de neonatos por camadas, neonatos totales por adulto, día primera muda y mudas totales por adulto para el efluente de celulosa Kraft, obteniendo la primera camada en el grupo control, correspondiendo al día  $7,5 \pm 0,71$ . Mientras que para las concentraciones del efluente correspondió al día  $8,0 \pm 0,71$ , para 12,5% y al día  $8,5 \pm 0,71$  para 25 y 50% y al día  $9,0 \pm 1$  para 75 y 100%.

Para el caso del número de camadas totales por adultos se obtuvo que para el control correspondió a  $8,10 \pm 0,57$  n° de camadas, encontrándose que en la concentración más baja

de efluente 12,5%, el número de camadas aumento en un 12%. Diferente fueron los valores obtenidos para las otras concentraciones de efluente (25; 50, 75 y 100%), ya que en todas ellas disminuyó en número de camadas en 8, 5, 13 y 35%, siendo estas dos últimas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en comparación al control.

Los resultados obtenidos en cuanto a los neonatos por camadas, registraron que entre las concentración de 25, 50 y 75% de efluente, hubo un aumento entre 30, 34 y 55% de neonatos por cada camada respectivamente, en la máxima concentración del 100% de efluente también hubo un aumento del 15% , en los cuales todos los resultados resultaron ser estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ), sin embargo en cuanto a la mínima de efluente (12,5 %) se registro una disminución del 10% en el número de neonatos por camadas sin significancia estadística ( $p > 0,05$ ).

En relación a los neonatos totales por adulto se obtuvo que en las concentraciones de 25, 50 y 75% de efluente hubo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) desde 17, 26 y 36% respectivamente. En cuanto a la menor concentración de efluente probada (12,5%) no tuvo aumento significativo ( $p > 0,05$ ) en este parámetro. Por último en la máxima concentración del 100% de efluente, el numero de neonatos por adulto se vio disminuido significativamente ( $p < 0,05$ ) en un 28% con respecto al control.

El registro del día de la primera muda no presentó variación en todas las concentraciones evaluadas, ya que en todas se obtuvo la primera muda al día 2 de iniciado el experimento. Respecto al total de mudas registrado hasta el día 21, día de termino del experimento se observó que todas las concentraciones hubo un aumento en el total de mudas, sin embargo solo en las concentraciones del 50 y 75% de efluente se observó el mayor aumento de mudas entre 17 y 31% respectivamente, siendo estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

**Tabla 7:** Parámetros crónicos utilizados sobre *D. magna* expuesta a distintas concentraciones de efluente de celulosa Kraft

<b>Efluente secundario (%v/v)</b>	<b>Longitud (mm)</b>	<b>Día primera camada</b>	<b>Camadas por adulto</b>	<b>Neonatos por camadas</b>	<b>Neonatos totales por adulto</b>	<b>Día primera muda</b>	<b>Mudas totales por adulto</b>
Control	3,19 ± 0,13	7,50± 0,71	8,10± 0,57	7,63± 0,63	61,8± 2,44	2	9,5±1,08
12,5	3,46 ± 0,11*	8,00± 0,71	9,10± 0,74*	6,90± 0,52	63,4± 3,50	2	10,4±0,52
25	3,39 ± 0,11*	8,50± 0,71	7,50± 0,97	9,96± 1,59*	72,40± 8,00*	2	10,5±1,08
50	3,48 ± 0,11*	8,50± 0,71	7,70± 0,48	10,25± 0,78*	78,00± 6,41*	2	11,1±0,99 *
75	3,57 ± 0,17*	9,00± 1,0	7,10± 0,74*	11,90± 1,04*	84,10± 6,57*	2	12,4±0,69 *
100	3,36 ± 0,14*	9,00± 1,0	5,20±1,14*	8,84±2,66*	44,50±8,18*	2	9,5±0,79

\*: Cifras estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0,05$ ), evaluadas en el test de Dunnett.

## DISCUSION

La caracterización físico-química del efluente de celulosa Kraft, señala que la concentración de materia orgánica presente corresponde a compuestos fácilmente biodegradables tales como carbohidratos y ácidos orgánicos (Diez *et al.*, 2002), donde la fracción DBO<sub>5</sub>/DQO, al ser inferior a 0,3 corresponde a materia orgánica no biodegradable, lo que confirma que el efluente utilizado tuvo un tratamiento biológico (Sponza, 2003). Esta fracción daría cuenta de la presencia de compuestos recalcitrantes como DQO, mencionando entre estos los compuestos fenólicos totales con valores en promedio de 156,3 mg L<sup>-1</sup>. Valores bajos, si se comparan con estudios previos realizados en efluentes de la industria de celulosa Kraft, con un rango entre 248,70 – 717,61 mg L<sup>-1</sup> (Villamar *et al.*, 2009, Pozo *et al.*, 2012). Registrando además derivados de lignina contenidos en esta fracción recalcitrante, con valores de absorbancia entre 0,14 - 0,13, además de color (0,14). Pozo *et al.* (2012), obtuvieron valores entre 0,244 - 0,307 y 0,20, para derivados de lignina y color, respectivamente. Además, se determinaron valores promedios de 7,88, 68,5 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> y 1635,00 mS cm<sup>-1</sup>, para pH, dureza y conductividad, respectivamente. Importante de considerar, los parámetros antes mencionados para la realización de ensayos de toxicidad aguda, subletal y crónica con *D. magna*. Tortorelli *et al.* (1990), mencionan que para evitar mortalidad en *D. magna*, se requieren rangos óptimos de pH entre 7 – 9, los cuales también está dentro de los rangos óptimos sugeridos por la NCh 2083 (1999), mientras que los valores registrados en este estudio para dureza y conductividad para trabajar en bioensayos con efluentes no están contemplados dentro de dicha norma.

Una vez realizada la caracterización físico-química, se realizaron los ensayos de toxicidad aguda con *D. magna*, no encontrando valores de LC<sub>50</sub>. Lo antes mencionado se debe a que este efluente de celulosa Kraft, corresponde a un efluente tratado biológicamente, lo cual ha sido también corroborado por estudios previos realizados por Chamorro *et al.* (2010) y López *et al.* (2011).

Otros estudios de toxicidad probados en este trabajo, fueron en función del efecto en la alimentación en *D. magna* con el fin de determinar el efecto de compuestos activos en el tiempo (24 h). Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad subletal, demostraron que los comportamientos de ingesta alimentaria de *D. magna* fueron distintos entre Feeding assay (exposición directa a efluente) y Feeding assay post-exposure. Obteniendo para Feeding assay una disminución progresiva en el consumo de *C. vulgaris*, de un 13 % para la concentración 12,5 % v/v y de un 44% para el 100 % v/v de efluente de celulosa Kraft. Este comportamiento indicaría que tal efecto se debe a la presencia de materia orgánica disuelta presente en este efluente (Nikkila and Kukkonen, 2001). Martin-Creuzburg *et al.* (2006), mencionan que dáfidos se alimentan de una amplia gama de partículas (diferentes tamaños), siendo incapaz de seleccionar de acuerdo a la calidad nutricional. Mientras que para el Feeding assay post-exposure dicho comportamiento de ingesta alimentaria fue diferente debido a que *D. magna*, ingirió un mayor número de células de *C. vulgaris*, con un consumo máximo de *C. vulgaris* del 61 % para el 100 % v/v de efluente de celulosa Kraft. Becker and Boersma (2003), mencionan que *D. magna* al ser expuesta a una situación stress alimenticio y posteriormente al ser alimentada, realizan eficientemente una mayor ingesta de moléculas alimentarias debido a señales químicas externas del medio rico en alimentación, para ser utilizado en su ciclo de vida. Por otra parte, se ha demostrado que los contaminantes orgánicos e inorgánicos son capaces de alterar las tasas de alimentación de *Daphnia sp.* Un proceso que puede estar relacionado a la absorción de contaminantes por las microalgas o partículas de alimento ingerido (Barata *et al.*, 2004,2006). Barata and Bairt. (2000), sugieren que las sustancias tóxicas pueden tener influencia sobre procesos energéticos de los organismos, siendo ésta una forma efectiva para predecir efectos subletales, que pueden traducirse en el comportamiento de alimentación.

Con el propósito de complementar las respuestas obtenidas a través de los ensayos subletales y los ensayos crónicos, en cuanto a la presencia de compuestos activos en estos efluentes, se determinó la Tasa de Crecimiento Alométrica (TCA) la cual relaciona la longitud total de *D. magna* con la longitud abdominal según López *et al.* (2011). Por otra parte, Olmstead and LeBlanc (2000), indican que *D. magna* al ser expuesta a compuestos activos genera un aumento en la longitud abdominal de dáfidos, lo cual es significativamente superior al



aumento provocado en la longitud del cuerpo de estos organismos. En los resultados obtenidos en estudio, se observó que durante los primeros 7 días de exposición de *D. magna* al efluente de celulosa Kraft, hubo un aumento en la longitud abdominal con respecto a la longitud del cuerpo y por ende una disminución de la TCA entre 0,8 – 9,3 % entre las concentraciones de 12,5 – 100 %v/v de efluente. Sin embargo, en el día 14, existe un incremento de la longitud total con respecto a la longitud abdominal y por ende un aumento de la TCA, con % entre 16 – 28 % a las concentraciones 12,5 – 100 %v/v de efluente con diferencias significativas con respecto al control para 12,5, 25, 75 y 100 % v/v ( $p < 0,05$ ). Esta explicación podría deberse a que los organismos pudieron haber puesto una camada de neonatos previa a dicha determinación en las concentraciones de 25, 50 y 75%. Finalmente la TCA en el día 21, aumentó entre un 8 - 9% para las concentraciones de 12,5 y 25%, respectivamente. Sin embargo, para las concentraciones entre 50 - 100%, la TCA disminuye hasta un 4,1 %, con diferencias significativas con respecto al control para el 100 % ( $p < 0,05$ ). Si bien los resultados de TCA obtenidos en este estudio demuestran presencia de compuestos con toxicidad crónica, estos no reflejan una tendencia tal como la propuesta por. Olmstead and Leblanc. (2000)López *et al.* (2011), estudiaron distintas combinaciones de efluentes de celulosa Kraft (*P. radiata*, mezcla *P. radiata* 50%: *Eucalyptus globulus* 50%) con compuestos activos ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol), registrando reducciones de TCA del 17 % y 27% en el día 14 y 21. Mientras que Xavier *et al.* (2005), observaron incrementos del largo del cuerpo y de la longitud abdominal del 20% y 2%, cuando *D. magna* fue expuesta a concentraciones de efluentes de celulosa Kraft del 10% y 20%, respectivamente. Sin embargo, estos autores tampoco encontraron un patrón de estrogenicidad con la TCA, a lo cual López *et al.* (2011) explica que las alteraciones de la forma del cuerpo aparentemente no tiene consecuencias en la perpetuación de la especie, aunque es necesario verificar lo anterior con estudios multigeneracionales, con el fin de descartar consecuencias a largo plazo sobre la población.

Esta toxicidad crónica se ve reflejada en la producción de neonatos, neonatos por camadas y el número de mudas, registrando un incremento, correspondiendo a 72,4, 9,96 y 10,5, para la concentración del 25 %, a 78,0, 10,2 y 11,1 para el 50 % y del 84,1, 11,9 y 12,4, para el 75 % con diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, los resultados de este estudio señalan que a la concentración del 100 %, existe un efecto inhibitorio en la

producción de neonatos. López *et al.* (2011), señala que a concentraciones > 50 % de efluentes de celulosa Kraft, generan una inhibición de la producción de neonatos de hasta un 69 %, sugiriendo que este efecto es producido por la presencia de componentes hormonales que a bajas concentraciones estimulan la reproducción pero a mayor concentración se tornan inhibidores. Tortorelli *et al.* (1990), mencionan que el número de neonatos producidos por *D. magna* varía entre cada especie y de acuerdo al estado del individuo y edad, sin embargo en *D. magna*, puede producir normalmente entre 6 - 10 neonatos por camada. Además, Xavier *et al.* (2005), obtuvo un efecto positivo en la producción de neonatos (aprox. 40 individuos) a una concentración del 10 %. Por otra parte, Gaete *et al.* (1996), observó un aumento del 20 % en la producción de neonatos en *D. pulex*, expuesta a un efluente de celulosa Kraft al 100 %, explicando dicho comportamiento, a la presencia de nutrientes en este tipo de efluentes y por ende los organismos expuestos lograrían un mejor estado nutricional. Además Chamorro *et al.* (2005) y Xavier *et al.* (2005), señalan que este tipo de efluentes, presentan compuestos activos como fitoesteroles, en los cuales ha sido verificada su potencial actividad hormonal debido a su similitud en estructura con el colesterol permitiéndoles participar en rutas endocrinas (Fernández *et al.*, 2003) y por ende con un aumento en la producción de neonatos. Mientras que Martin-Creuzburg *et al.* (2003), señalan que  $\beta$ -sitoesterol, estigmasterol, producen un aumento en la longitud total del cuerpo (15 %) y aumento en la producción de neonatos (30 %) en *D. galeata*, debido al suministro de  $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol en la dieta compuesta además por cianobacterias, como única fuente de carbono. Además, Martin-Creuzburg *et al.* (2006), mencionan que la mezcla de materia orgánica y fitoesteroles como  $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol, permitirían la obtención directa de carbono como fuente energética, mientras que los fitoesteroles actuarían como precursores para la bioconversión de colesterol. Por otra parte, estudios de Von Elert *et al.* (2003), demostraron que la ausencia de fitoesteroles en la dieta de *D. pulex* limita la transferencia de carbono desde el medio al organismo. En cuanto a la producción de mudas, estudios previos sugieren que la producción de estas o ecdisis está directamente relacionada con el crecimiento en *D. magna* ya que al generarse la ecdisis, permite a un crecimiento en *D. magna* (Gaete *et al.*, 1999; Bec *et al.*, 2003). Finalmente cabe destacar que parámetros tales como producción de neonatos, crecimiento, mudas o ecdisis y alteraciones del tipo endocrinas son buenos indicadores para evidenciar efectos de la exposición a sustancias tóxicas presente en efluentes. Sin embargo, no todos los procesos de

estimulación de camadas, individuos y crecimiento están siempre relacionados con compuestos hormonales, sino que también podrían estar relacionados simplemente con procesos energéticos en cuanto a la eficiencia de carbono desde el medio al organismo (Barata *et al.*, 2004; 2006; 2008).

## CONCLUSIONES

El efluente de celulosa Kraft no presenta toxicidad aguda sobre *D. magna*, por lo que no fue posible determinar LC<sub>50</sub>.

El efluente de celulosa Kraft produce un efecto subletal en *D. magna* dada la alteración en el comportamiento alimentario luego de la exposición directa en los ensayos Feeding assay y Feeding assay Post- exposure, ensayos que podrían ser considerados como buenos indicadores para evidenciar efectos de la exposición a sustancias tóxicas presente en efluentes de celulosa Kraft.

El efluente de celulosa Kraft presentó toxicidad crónica sobre *D. magna*, evidenciando efectos sobre las características sexuales secundarias tales como: reproducción, camadas, mudas y TCA.

Por todo lo antes mencionado se acepta la hipótesis debido a que en esta investigación, se demostró que el efluente de celulosa Kraft presentó efectos a nivel subletal y crónicos en *D. magna* sobre el comportamiento alimenticio, mudas y TCA.

## LITERATURA CITADA

- Altesor, A. Eguren, G. Mazzeo, N. Panario D.& Rodriguez, C. 2008. La industria de la celulosa y efectos: certezas e incertidumbre. Asociación Argentina de Ecología Ecología Austral. 18:291-303.
- ASTM 1988. Standart guide for renewal life-cycle toxicity tests with *Daphnia magna* E 1193-87. Annual Book of American Society for Testing and Materials- ASTM Standards. Philadelphia, PA. p 1- 17.
- Becker, C.& Boersma, M. 2003. Resource quality effects on life histories of *Daphnia*. Limnology.Oceanography. 48:700–706.
- Barata, C. & Baird, D. 2000. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from short-duration chronic tests with *Daphnia magna* Straus. Aquatic. Toxicological. 48: 195–209.
- Barata, C. Medina, M. Telfer, T. & Baird, D. 2002. Determining demographic effects of cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa*: stage-specific short tests versus life-table tests.. Environmental Contamination Toxicology 43: 373–378.
- Barata, C. Porte, C. & Donald, J.B. 2004. Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates: A Review. Ecotoxicology 13: 511–517.
- Barata, C. Damasio, J. López, M. Kuster, M. López del Alda, M. Barceló, D. Riva, M and Raldua, D. 2006. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. Environmental Toxicology and Chemistry 26: 370-379-
- Barata, C. Alañon, P. Gutiérrez- Alonso, S. Riva, M.C. Fernández, C. & Tarazona, J.V. 2008. A *Daphnia magna* Feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for environmental Risk Assessment of toxic effluents. Science of the total Environment 405: 78-86.
- Bec, A. Desvillettes, C. Vera, A. Fontvieille, D. Bourdier, G. 2003. Nutritional value of different food sources for the benthic *Daphnidae* *Simocephalus vetulus*: role of fatty acids. Archivment Hydrobiological 156:145—163
- Belmonte, M. 2004. Comportamiento de los ácidos resínicos en un sistema de tratamiento biológico aeróbico. Tesis presentada en la Facultad de Ciencias Naturales y

Oceanográficas para optar al grado de Biólogo, Universidad de Concepción, Chile, 71 pp.

- Belmonte, M. Calderón, M. Chamorro, S. Videla, S. & Vidal, G. 2006. Gestión ambiental de la industria de celulosa en Chile. XXX Congreso de la Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS). Punta del Este (Uruguay), 27-30.
- Çeçen, F. 2003. The use of UV-VIS measurements in the determination of biological treatability of pulp bleaching effluents. In: 7th International Water Association Symposium on Forest Industry Wastewaters. 135-142.
- Chamorro, S. Xavier, C. Vidal, G. 2005. Behavior of aromatic compounds contained in kraft mill effluents treated by aerated lagoon. *Biotechnology Progress* 21: 1567-1571.
- Chamorro, S. Xavier, C. Hernández, V. Becerra, J. & Vidal, G. 2009. Aerobic removal of stigmaterol contained in kraft mill effluents. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(2): 1-7.
- Chamorro, S. Monsalvez, E. Hernández, V. Becerra, J. Mondaca, M. Piña, B. & 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. 2011. Evaluación de la actividad estrogénica presente en efluentes de celulosa Kraft, tratados mediante un sistema biológico, a través de ensayos con *Saccharomyces cerevisiae* recombinante y *Daphnia magna*. Centro de Ciencias Ambientales EULA- Chile 182pp.
- Chiang, G. Munkittrick, K. Orrego, R. & 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): 43-44.
- Diez, M. Castillo, G. Aguilar, L. Vidal, G. & Mora, M. 2002. Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus radiata* kraft mill wastewater. *Bioresource Technology*, 83: 131- 138.
- Environmental protection Agency (E.P.A.), 1993, La Comunidad Económica Europea (C.E.E.) y la Organisation for Economic Cooperation and Development (O.E.C.D.).
- Environmental Protection Agency. (1999). Systematics, ecology, life history and culture methods *Daphnia* (*D. pulex* and *Ceriodaphnia*). 131-147.

- Fernández-Casalderrey, A. Ferrando, M.D. & Andreu-Moliner, E. 1994. Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology Environment Safety* 27(1): 82-89.
- Fernandez, M.; Ikonomu, M. and Buchanan, I.2003. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewater. *Science of the Total Environment* 313:250-269.
- 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
- Ferrando, M.D. Sancho, E. & Andreu-Moliner, E. 1996. Chronic toxicity of fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), a rotifer (*Brachionus calyciflorus*), and the cladoceran (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35, 112–120.
- Gaete, H. Larraín, A. Baeza, J. Rodríguez, J. & Bay- Schmith, E. 1996. Efecto de aguas receptoras de efluentes de industrias de celulosa localizadas en la cuenca del río Biobío (Chile, Central) sobre la tasa de crecimiento de la microalga *Selenastrum capricornatum* y reproducción del cladóceros *Daphnia magna*. *Revista Investigación ciencia y tecnología y ciencias marinas. Iquique-Chile* 4:1-3
- Gaete, H. Larraín, A. Bay-Schmith, E. Cifuentes, A. Rodríguez, J. & Baeza, J. 1999. Chronic toxicity and physico-chemical characteristics of the receiving water of pulp mill effluents locate in the Biobio river basin (Central Chile). *Ecotoxicology Environment Restoration* 2 (2): 67–74.
- Goulden, C.E. Comotto, R.M. Hendrickson, J.A. Jr. Horning, L.L. & Johnson, K.L. 1982. Procedures and Recomendations for the Culture and Use of *Daphnia* in Bioassay Studies. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference*, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, eds., American Society for Testing and Materials pp. 139-160.
- 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. *J. Toxicol Environ Health Part B* 9:341-356.

- Hill, R. Wyse, G. & Anderson, M. 2004. Fisiología animal. Editorial Panamericana S.A. Madrid. España, 1038pp.
- Kamaya, Y. Tokita, N. & Suzuki, N. 2005. Effects of dehydroabietic acid and abietic on survival, reproduction, and growth of crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, 83-88.
- Karels, A. Markkula E., Oikari, A. 2001. Reproductive, biochemical, physiological, and population responses in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) downstream of two elemental chlorine-free pulp and paper mills. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1517-1527.
- Kostamo, A. & Kukkonen, J.V.K. 2003. Removal of resin acids and sterols from pulp mill effluents by activated sludge treatment. *Water Research* 37(12): 2813-2820.
- Kostamo, A. Holmbom, B. & Kukkonen, J. 2004 Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mills and mechanical pulp mills. *Water* 38, 972-982.
- La Fleur, L.E. 1996. Sources of pulping and bleaching derived chemical in effluents. In: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, M. R. Servos, K. R. Munkittrick, J. H. Carey, G. J. Van der Kraak, (Eds.), St Lucie Press, Delray Press, FL. 21- 31 pp.
- Latorre, A. Rigol, A. Lacorte, S. & Barceló, D. 2003. Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of fatty and resin acids in paper mill process water. *Journal Chromatography A*. 991:205-215.
- Lampert, W. 1987. Feeding and nutrition in *Daphnia*. *Mem Ist Ital Idrobiol*, 45:143-192.
- Larraín, A. 1996. Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. *Cience. Technology.. CONAMA (Nº especial)* 39-47.
- Larsson, D., Hallman, H. Forlin, L. 2000. More male fish embryos near a pulp mill. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 2911-2917.
- Lewis, M., & Maki, A. 1981 "Effects of Water Hardness and Diet on Productivity of *Daphnia magna* Strauss, in Laboratory Culture", *Hydrobiology*, 85: 175-179.



- López, D. Chamorro, S. Silva, J. Bay-Schmith, E. & Vidal, G. 2011. Chronic Effects of *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* Kraft Mill Effluents and Phytosterols on *Daphnia magna*. *Bull Environ Contamination Toxicology* 87: 633–637.
- Lowell, R.. & Culp, J.. 2003. Advances in study designs and measurement endpoints used in the environmental effects monitoring program. In: K. Hedley, S. Roe and A.J. Niimi (eds.). 2003. Proceedings of the 30th Annual Aquatic Toxicity Workshop: September 28 to October 1, 2003, Ottawa, Ontario. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2510: 158 pp.
- Martin-Creuzburg, D.& Von Elert, E. 2003. Impact of 10 sterols on growth and reproduction of *Daphnia galeata*. *Journal of Chemical Ecology* 30:483-500
- Martin-Creuzburg, D. Bec, A. Von Elert, E. 2006. Supplementation with sterols improves food quality of a ciliate for *D. magna*. *Protist* 157: 477-486.
- McMaster, M. Hewitt, L. & Parrott, J. 2006. A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluent in Canada: field studies and mechanistic research. *J. Toxicology Environment Health, Part B, Critical Reviews* 9(4): 313-339.
- NCh 2083- Norma Chilena Oficial 1999. Bioensayos de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Instituto Nacional de Normalización, 1ª ed.- Chile.
- Nikkilä, A. & Kukkonen, K. 2001. Effects of dissolved organic material on binding and toxikinetics of pyrene in the waterflea *Daphnia magna*. *Environment Contamination Toxicology* 40:333-338.
- Olmstead, A. & LeBlanc, G. 2000. Effects of endocrineactive chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*. *Environment Toxicology Chemistry* 19:2107–2113.
- Oñate, E. 2006. Evaluación de la genotoxicidad de fitoesteroles presentes en efluentes de la industria de celulosa Kraft blanqueada. Seminario de título, presentado para optar al grado de Químico Marino. Facultad de Ciencias, de la Universidad Católica de la Santísima Concepción 87 pp.

- Orrego, R. Jiménez, B. Bordajandi, L. Gavilán, J. Inzunza, B. Abad, E. González, M. Rivera, J. & Barra, R. 2005 EROD induction and PCDD/F levels in fish liver from the Biobio River in Chile. *Chemosphere* 60: 829–835.
- Orrego, R. Burgos, A. Moraga, G. Inzunza, B. Gonzales, M. Valenzuela, A. Barra, R. & Gavilán, J. 2006. Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): biomarker responses along a pollution gradient in the biobio river, Chile. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(9): 2280-2287.
- Orrego, R. Guchardi, J. Hernandez, V. Krause, R. Roti, L. Armour, J. Ganeshakumar, M. & Holdway, D. 2009. Pulp and paper mill effluent treatments have differential endocrine-disrupting effects on Rainbow trout. *Environment Toxicology and Chemistry* 28: 181-18.
- Orrego, R. Guchardi, J. Krause, R. & Holdway, D. 2010. Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 99: 160–167.
- Peng, G. & Roberts, J. 2000. Solubility and toxicity of resin acids. *Water Research*, 34: 2779-2785.
- Pokhrel, D & Viraraghavan, T. 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater- a review. *Science Total Environment* 333: pp. 37-58.
- Pozo, G. Villamar, A. Martínez, M. & Vidal, G. 2012. Effect of organic load and nutrient ratio on the operation stability of the moving bed birreactor for kraft mill wastewater treatment and the incidente of polyhydroxyalnoate biosynthesis. *Water Science & technology* 66(2): 370 – 376.
- Quinn, B. Booth, M. Delfino, J. Holm, S. & Gross, T. 2003. Selected resin acids in effluent and receiving waters derived from a bleached and unbleached kraft pulp and paper mill. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (1): 214-218.
- Rintala, J. & Puhakka, J. 1994. Anaerobic treatment in pulp and paper mill-waste management: a review. *Bioresource Technology* 47: 1-18.
- Rodríguez, R. 2004. *Metabolismo de las toxinas ambientales*. Primera edición. Colección: La ciencia para todos, Consejo nacional de ciencia y tecnología. México. 120pp.
- Rosa, R. Moreira-Santos, M. Lopes, I. Silva, L. Rebola, J. Mendonça, E. Picado, A. & Ribeiro, R. 2010. Comparison of a test battery for assessing the toxicity of a bleached-kraft

- pulp mill effluent before and after secondary treatment implementation. *Environmental Monitoring and Assessment* 161 (1-4): 439-451.
- Scroggins, R. & Miller, J. 2000. Summary of sublethal toxicity test results from the second cycle of the pulp and paper Environmental Effects Monitoring Program. In: K.C. Penney, K.A. Coady, M.H. Murdock, W.R. Parker and A.J. Niimi (eds.). *Proceedings of the 27th Annual Aquatic Toxicity Workshop St. John's, Newfoundland. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 2331: 139 pp.
- Sponza, D. 2003. Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54:74-86.
- Tortorelli, M. Di Marzio, W. Sáenz, M. & Alberdi, J. 1090. *Ensayos ecotoxicológicos con organismos acuáticos para la evaluación de contaminación ambiental. Laboratorio de Ecotoxicología, Universidad de Luján. Argentina. 749pp.*
- Van Der Kraak, G. Hewitt, M. Lister, A. McMaster, M. & Munkittrick, K. 1998. Endocrine Toxicants and Reproductive Success in Fish. *Human and Ecological Risk Assessment* 7:1017-1025.
- Verta, M. Ahtiainen, J. Nakari, T. Langi, A. & Talka, E. 1996. The effect of waste constituents on toxicity of TCF and ECF pulp bleaching effluents. In: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, M.R. Servos, K. R. Munkittrick, J. H. Carey, G.F. Van der Kraak, (Eds), St Lucie Press, Delray Press, FL. pp. 41-51.
- Vidal, G. Belmonte, M. Calderón, M. & Chamorro, S. 2007. Significativos avances ambientales registra en Chile la industria de celulosa kraft blanqueada. *Induambiente* 15(87): 6-30.
- Videla, S. & Diez, C. 1997. Experiences of wastewater treatment in Chilean forest industry. *Water Science Technology* 35: 221-226.
- Videla, S. Navarrete, P. & Vidal, G. 2004. Environmental issues of the Chilean Forest Industry Seventh International Water Association Symposium of Forest Industry Wastewaters, Seattle (USA), June 1-4.
- Villamar, C. Jarpa, M. Decap, J. & Vidal, G. 2009. Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents

- from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus*. *Water Science & Technology* 59 (3): 507 – 514.
- Villarroel Utrillas, M. Sancho, M. Ferrando, D. & Andreu, E. 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53: 857 - 864.
- Von Elertt. E. Martin- Creuzburgd, D. & Le Coz, J. 2003. Absence of sterols constrains carbon transfer between cyanobacteria and a freshwater herbivore (*Daphnia galeata*). *Proc. R. Soc. London. B Biological* 270:1209–1214.
- Xavier, C. Chamorro, S. & Vidal, G. 2004. Efeito da Degradação e da toxicidade de fitoesteroles presentes em efluentes de celulose kraft tratados em sistemas de lagoas aereadas *Ciencias e tecnología en residuos e desenvolviment Sustentable & NISAM Brasil, Florianópolis: 17-20 de Octubre.*
- Xavier, C. Chamorro, S. & Vidal, G. 2005. Chronic effects of Kraft mill effluents and endocrine active chemical on *Daphnia magna*. *Bull Environment Contamination Toxicology* 75:670–676.
- Xavie,r C. Belmonte, M. Chamorro, S. Oñate, E. Mondaca, M. & Vidal, G. 2006. Kraft pulp mill effluent treated by activated sludge and aerated lagoon. Evaluation by ultrafiltration, toxicity and genotoxicity assays. 8º Simposio da IWA em Efluentes da Indústria Florestal, Vittoria (Brasil), 9 -12 de Abril.