



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Obtención de Polihidroxicanoatos (PHA) como
subproducto de un sistema de tratamiento de biomasa adherida
y su incidencia en la eliminación de compuestos disruptores
endocrinos presentes en efluentes de la industria papelera**

Presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción,
para optar al título de Bioingeniero

ROCIO CAMILA BELEN BAEZA NEIRA

Tutora: Dra. Gladys Vidal

Concepción, 2011

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	9
1.1 Industria del papel en Chile	9
1.2. Proceso productivo	10
1.2.1. Materia prima	10
1.2.2. Producción de papel.....	12
1.3. Aspectos ambientales del proceso	13
1.4. Efluentes de la industria del papel	14
1.5. Producción de polihidroxiclcanoatos (PHAs)	15
1.6. Disrupción endocrina en efluentes de la industria del papel	19
1.7. Detección de disrupción endocrina mediante biosensores	24
1.7.1. Fundamentos de la utilización de levaduras como biosensores	24
1.7.2. Aplicación de biosensores para detección de disrupción endocrina.....	25
2. METODOLOGIA	28
2.1. Influyente	28
2.2. Caracterización del reactor MBBR.....	28
2.2.1. Operación del reactor.....	29
2.2.2. Caracterización microscópica.....	29
2.3. Métodos analíticos	30
2.3.1. Parámetros fisicoquímicos.....	30
2.3.2. Determinación de la actividad heterótrofa de la biomasa.....	30
2.3.3. Biosíntesis de PHAs	31
2.3.4. Extracción en fase sólida (SPE: Solid Phase Extraction).....	32
2.3.5. Yeast Estrogen Screen (YES).....	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Caracterización fisicoquímica del influente	33
3.2. Operación del reactor MBBR	34
3.2.1. Caracterización del inóculo	34
3.2.2. Parámetros operacionales	34

3.3. Parámetros de eficiencia de operación.....	36
3.4. Evolución y caracterización de la biomasa bacteriana	38
3.5. Acumulación de PHA	40
3.6. Utilización de biosensores para evaluar la presencia de disrupción endocrina	43
3.7. Realización del ensayo YES	45
3.7.1. Prueba de la cepa con patrones.....	45
3.7.2. Ensayos de toxicidad de las muestras	46
3.7.3. Ensayos YES con muestras	47
4. DISCUSION	49
4.1. Caracterización fisicoquímica del influente	49
4.2. Operación del reactor continuo MBBR	50
4.2.1. Parámetros operacionales y de eficiencias de eliminación de materia orgánica y compuestos fenólicos.....	50
4.2.2. Evolución de la biomasa durante la operación del reactor	51
4.2.3. Acumulación de PHAs	53
4.3. Incidencia del tratamiento MBBR sobre la eliminación de disrupción endocrina en efluentes de papelera.....	54
5. CONCLUSIONES	57
6. AGRADECIMIENTOS	58
7. BIBLIOGRAFIA	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso productivo Termomecánico (TMP) y RILES generados en el proceso. MP: Máquina papelerera.....	13
Figura 2. Estructura general de los PHAs.....	16
Figura 3. Mecanismo de biosíntesis de ms-PHA desde carbohidratos	18
Figura 4. Esquema de la interacción estrógeno-receptor dentro de la célula	21
Figura 5. Funcionamiento del ensayo YES en presencia de estrógeno	25
Figura 6. Diseño de reactor MBBR	28
Figura 7. Evolución del pH de influente (▲), pH de efluente (○) y oxígeno disuelto (■) durante el periodo del reactor.....	35
Figura 8. Eficiencia de eliminación de DQO (□), DBO ₅ (▲) y compuestos fenólicos totales (●) durante el periodo de operación.....	36
Figura 9. Relación entre IVL y relación Alimento/Microorganismo	38
Figura 10. Microorganismos bioindicadores presentes en el sistema.....	39
Figura 11. Porcentaje de células que acumularon PHA durante los 170 días de.....	41
Figura 12. Acumulación de PHA en las distintas cargas orgánicas y relación de nutrientes administradas.	42
Figura 13. Curva de crecimiento de cepa <i>Sacharomices cerevisiae</i> recombinante	43
Figura 14. (A) Cultivo en placas de la cepa. (B) Ensayo con X-Gal.....	44
Figura 15. Curva patrón de ensayo YES.....	45
Figura 16. Curvas de toxicidad	46
Figura 17. Ensayo con Influyente (SPE)	48
Figura 18. Curva de el ensayo con Efluente (SPE).....	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas de producción papelera en Chile.....	10
Tabla 2. Principales constituyentes de la madera y compuestos extractivos en <i>Eucaliptus globulus</i> y <i>Pinus radiata</i>	11
Tabla 3. Comparación de propiedades fisicoquímicas de Polipropileno.....	17
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos disruptores endocrinos	20
Tabla 5. Efectos de compuestos disruptores endocrinos en distintas especies.....	23
Tabla 6. Plan de trabajo y operación del reactor MBBR.....	29
Tabla 7. Caracterización fisicoquímica del influente de papelera.....	33
Tabla 8. Caracterización del inóculo.	34
Tabla 9. Operación del reactor MBBR.....	35
Tabla 10. Concentraciones de entrada y salida del reactor de DQO, DBO ₅ y Fenoles totales (UV _{215nm}).	37
Tabla 11. Recuentos de células vivas y muertas en cada etapa	40
Tabla 12. Densidad óptica promedio de cada una de las muestras.....	47

ABREVIATURAS

CDE	Compuesto Disruptor Endocrino	
DBO ₅	Demanda Biológica de Oxígeno	(mg/L)
DQO	Demanda Química de Oxígeno	(mg/L)
DO	Densidad Optica	
E2	17-β-Estradiol	
IVL	Indice Volumétrico del Lodo	(Sol. sed/g SSV)
MBBR	Moving Bed Biofilm Reactor	
NT	Nitrógeno Total	(mg/L)
OD	Oxígeno Disuelto	(mg/L)
PHA	Polihidroxialcanoatos	
PT	Fósforo Total	(mg/L)
SST	Sólidos Suspendidos Totales	(mg/L)
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles	(mg/L)
ST	Sólidos Totales	(mg/L)
SV	Sólidos Volátiles	(mg/L)
TMP	Pulpaje Termomecánico	
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico	(d)
VCO	Velocidad de Carga Orgánica	(kg DBO ₅ /m ³ ·d)
YES	Yeast Estrogen Screen	

RESUMEN

Los efluentes de la industria papelera se caracterizan por presentar altas concentraciones de carga orgánica fácilmente biodegradable, lo que se refleja en una Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅) superior a 770 mg/L. La cual puede ser utilizada por los microorganismos de un reactor de biopelícula de lecho móvil (MBBR), en la formación de polihidroxialcanoatos (PHAs). Los PHAs son poliésteres que se acumulan en las células en forma de gránulos intracelulares como reserva de carbono y energía. Los PHAs, poseen características físicas y térmicas, que permiten su utilización como bioplástico y pueden considerarse como una alternativa a los plásticos convencionales. Se estudiaron las condiciones óptimas de nutrientes para la conversión de materia orgánica del efluente a PHAs y la eficiencia de eliminación de DQO y DBO₅ con distintas condiciones de nutrientes aplicadas (100:5:1 y 100:1:0,3). Se aplicaron VCO de 0,81 a 2,83 kg DBO₅/m³·d. El sistema MBBR obtuvo máximas eficiencias de eliminación de materia orgánica de 79,22% y 97,01% de DQO y DBO₅ a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes de 100:5:1, obteniendo además el mayor porcentaje de células que acumulan PHAs (88,11%) e intensidades de fluorescencia (122,68) a esta VCO y relación de nutrientes. No encontrando diferencias significativas al cambiar la relación de nutrientes de 100:5:1 a 100:1:0,3. Bajo estas condiciones de estudio, se evaluó la eficiencia de eliminación de actividad estrogénica del efluente de papelera mediante *Saccharomyces cerevisiae* recombinante con el bioensayo Yeast Estrogen Screen (YES). Obteniendo valores de actividad estrogénica de 0,307 Eq. E2 ng/L en el influente la cual fue eliminada en el MBBR a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d.

ABSTRACT

The effluents from the paper industry are characterized by high concentrations of readily biodegradable organic load, which is reflected in a biological oxygen demand (BOD₅) higher than 770 mg/L. Which can be used by the microorganisms in a moving bed biofilm reactor (MBBR) in the formation of polyhydroxyalkanoates (PHAs). PHAs are polyesters which accumulate in cells as intracellular granules as a carbon and energy store. PHAs have physical and thermal characteristics that allow its use as bioplastic as an alternative to conventional plastics. We studied the optimal conditions of nutrients for the conversion of organic matter in the effluent to PHAs and the removal efficiency of COD and BOD₅ with different nutrient conditions applied (100:5:1 y 100:1:0,3). The removal efficiencies of organic matter was 79.22% and 97.01% of COD and BOD₅ at OLR of 0.81 kg DBO₅/m³·d and nutrient ratio 100:5:1. Under this conditions we also obtained the higher percentage of cell accumulation of PHAs (88,11%). There was no significant differences by changing the ratio of nutrients from 100:5:1 to 100:1:0,3. We studied the removal efficiency of estrogenic activity in this effluent using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with the bioassay Yeast Estrogen Screen (YES). Obtaining values of estrogenic activity of 0.307 Eq. E2 ng/L in the influent which was eliminated in the MBBR at OLR of 0.81 kg·d DBO₅/m³.

1. INTRODUCCION

1.1 Industria del papel en Chile

El sector forestal en Chile, representa el 3,1% del PIB nacional (CORMA, 2010) donde el 36%, corresponde al Sector Industrial Forestal de la Industria del Papel. En Chile, la Industria de Papel se encuentra enfocada principalmente al mercado interno y en menor porcentaje a exportaciones a países de Sudamérica como: Argentina, Perú, Colombia y México (Diagnóstico APL, 2005).

Su desarrollo se da preferentemente en la Zona Centro Sur y Zona Sur del país, principalmente debido a que las especies utilizadas como materia prima (*Pinus radiata* y *Eucaliptus globulus*) poseen gran adaptación a las condiciones climáticas y de suelo de estas zonas. Chile cuenta con 2,3 millones de hectáreas de plantaciones forestales, donde el 40% de éstas, se encuentra en la Región del Biobío, 20% en la Región del Maule y 20% en la Región de la Araucanía (INFOR, 2007).

En la actualidad, existen 11 plantas productoras de papel, cuatro de ellas están ubicadas en la región del Biobío (principalmente productoras de papel de diario), cuatro en la Región Metropolitana y una en la Sexta, Séptima y Décima región (Tabla 1). La mayor industria productora de papel, corresponde a empresas CMPC, que cuenta con seis plantas a lo largo de Chile, totalizando el 72% de la producción nacional, seguida por Norske Skog (10,5%) y Compañía Papelera del Pacifico (5,2%) (Diagnóstico APL, 2005).

Tabla 1. Plantas de producción de papel en Chile

Empresa	Ubicación	Producción		
		(miles ton /año)	Tratamiento	Descarga
Cartulinas CMPC S.A.	Maule, VII Región	360	TP, TS	Río Maule
Cartulinas CMPC S.A.	Valdivia, X Región	70	TP, TS	Río Calle Calle
Inforsa S.A. CMPC	Nacimiento, VIII Región	195	TP, TS (MBBR)	Río Vergara
Papeles Cordillera S.A.	Puente Alto, RM	320	TP, TS (BAS), TT (Desinfección)	Río Maipo
CMPC S.A.	Laja, VIII Región	80	TP, TS	Río Biobío
CMPC S.A.	Talagante, RM	33	TP, TS (LA)	Río Maipo
Papeles Norske Skog SA	San Pedro de la Paz, VIII Región	120	TP, TS (LA)	Río Biobío
Cía. Papelera del Pacífico	San Francisco de Mostazal, VI Región	60	TP, TS	Estero Tronco
Carrascal S.A.	Quinta normal, RM	45	TP (DAF)	-
Forestal y Papelera Concepción S.A.	Coronel, VIII Región	50	TP, TS (LA), TT	Fuera ZPL
Papeles Industriales S.A.	Lampa, RM	57	(Desinfección)	Estero Lampa

TP: Tratamiento primario; TS: Tratamiento secundario; TT: Tratamiento terciario; MBBR: Moving Bed Biofilm Reactor; LA: Lodos activados; BAS: Biofilm aerated sludge; DAF: Dissolved air flotation (INFOR, 2007).

1.2. Proceso productivo

1.2.1. Materia prima

El 98% de las especies utilizadas en la industria del papel como materia prima, corresponde a plantaciones forestales de especies foráneas: *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus* (CORMA, 2010).

La Tabla 2, muestra el porcentaje de los principales constituyentes de la madera son celulosa, hemicelulosa, lignina (polímero aromático de cadena larga que le da resistencia mecánica a la madera) y compuestos extractivos. Estos últimos corresponden a compuestos mayoritariamente lipofílicos y de bajo peso molecular como: taninos, aceites, ácidos resínicos, grasas, fitoesteroles, ceras y terpenos, compuestos encargados del almacenamiento de nutrientes y protección de ataques microbianos, entre otros (Dorado y col., 2000).

Como se observa en la Tabla 2, el tipo de compuestos extractivos presente en la madera, varía dependiendo de la materia prima que se utilice. Debido a su naturaleza lipofílica, estos compuestos tienden a acumularse en las maquinarias del proceso de producción de papel, formando depósitos llamados “pitch” que afectan el correcto funcionamiento de las maquinas generando pérdidas económicas y técnicas en el proceso (Gutiérrez y col., 1998).

Tabla 2. Principales constituyentes de la madera y compuestos extractivos en *Eucalyptus globulus* y *Pinus radiata*

Constituyente madera	Eucalipto (%)	Pino (%)	Referencia
Celulosa	43,0 - 50,0	42,0 - 46,0	1 – 2
Hemicelulosa	25,0	35,0	1 – 2
Lignina	25,0 - 31,0	17,0 - 26,0	1 – 2
Compuestos extractivos	0,5 - 7,0	0,2 - 3,2	
Ácidos grasos	14,0 - 27,7*	4,0*	3 – 4
Ácidos resínicos	N.D.	8,9*	3 – 4
Ceras	2,8 - 5,8*	1,6*	3 – 4
Triglicéridos	6,7 - 13,2*	7,3*	3 – 4
Esteroles	32 - 51,7*	1,2*	3 – 4

*: mg / 100 g madera. (1) LaFleur, 1996; (2) Rosa y col., 2010; (3) Gutiérrez y col., 1998; (4) Del Rio y col., 2000.

1.2.2. Producción de papel

El proceso productivo del papel requiere de una etapa de producción de pulpa, la cual puede obtenerse mediante procesos químicos o mecánicos. En la producción química, los trozos de madera se mezclan con agua y productos químicos hasta separar las fibras de celulosa. Mientras que en la producción mecánica, las fibras se separan por trituración de la madera, sometiéndola a altas temperaturas y presiones. La pulpa obtenida en este caso presenta residuos de lignina, hemicelulosas, resinas y otros. La reducción mecánica se puede realizar bajo distintos procesos, tales como: refinador de pulpa mecánica (RMP), pulpaje termomecánico (TMP) o desfibrador presurizado (PGW).

En la Figura 1, se muestra el proceso TMP, el cual consta de una primera etapa de Planta de Madera, donde se ablandan las astillas con vapor de agua para facilitar la separación de las fibras. Posteriormente, se introducen las astillas a presión en una zona entre dos discos rotan en direcciones opuestas a muy corta distancia. La acción de una serie de ranuras y barras sobre la superficie de estos discos separa las fibras (Planta TMP). Pudiendo obtener hasta tres estaciones de refinado en serie. Una vez obtenida la pulpa, ésta es clasificada y filtrada de impurezas para posteriormente pasar a una Máquina Papelera (MP-1 y MP-2), que formará la hoja de papel. La cual pasará por cilindros alimentados con vapor, obteniendo una hoja de papel con un 8% de humedad. Finalmente, ésta pasa por baterías de acero lisas que giran alisando su superficie enrollando finalmente el papel en una barra de acero, el cual será embalado y almacenado en bodegas (Papelnet, 2010).

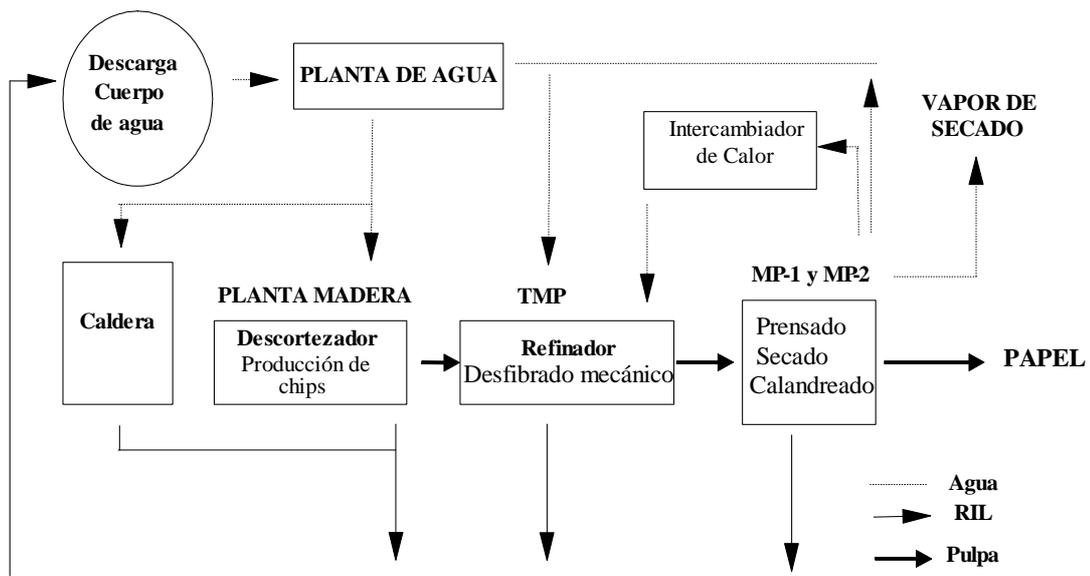


Figura 1. Proceso productivo Termomecánico (TMP) y RILES generados en el proceso. MP: Máquina papelera.

1.3. Aspectos ambientales del proceso

La principal problemática ambiental relacionada a la industria papelera son los residuos industriales (RILES). Debido a que el agua se utiliza en distintos procesos, tales como transporte de las materias primas y aditivos, fluido de intercambio de calor, producción de vapor y agente lubricante, entre otras (Salomé y Goikoetxea, 2006). Proceso en el cual además se generan emisiones atmosféricas como: vapor de agua y material particulado proveniente de la combustión de la madera en las calderas y residuos sólidos (cenizas, corteza sucia, chatarra, etc) (Pokhrel y Viraraghavan, 2004).

La preocupación por el cuidado y la conservación del medio ambiente ha sido entendida por la industria y actualmente se trabaja en minimizar la cantidad de agua utilizada y en reutilizar los recursos y la energía, lo que se refleja en los sistemas de gestión ambiental aplicados, tales como Acuerdos de Producción Limpia y Certificaciones ISO 14001, las que además brindan un respaldo internacional a la industria. Muy importante en el ahorro de recursos, en el caso de aguas, es la aplicación de la mejor tecnología disponible (BAT: Best Available Technology), lo que permite mantener o mejorar la eficiencia de producción y aumentar su compromiso con el cuidado del medio ambiente.

Salomé y Goikoetxea, (2006), exponen un ejemplo de esto al mencionar que en la producción de papel periódico se utilizan 30 m³ de agua/ton de papel mediante tecnologías antiguas. Sin embargo, mediante la utilización de la mejor tecnología disponible, es posible reducir este gasto entre 10 - 15 m³/ton de papel.

1.4. Efluentes de la industria del papel

La industria papelera genera grandes volúmenes de efluentes, entre 10 - 70 m³/ton de papel (Rintala y Puhakka, 1994; Lacorte y col., 2003). Las características y compuestos presentes en este tipo de efluentes, dependerán del tipo de materia prima (*Pinus radiata*, *Eucaliptus globulus* o mixto), de la tecnología utilizada y del tratamiento aplicado (Hewitt y col., 2003; Lacorte y col., 2003).

Estos efluentes, previo al sistema de tratamiento se caracterizan por presentar altas concentraciones de carga orgánica fácilmente biodegradable tales como carbohidratos simples y de cadena corta, lípidos y péptidos, lo que se refleja en una Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅) superior a 770 mg/L. Además, la lignina, sólidos suspendidos, ácidos grasos y ácidos resínicos generan una alta concentración de compuestos recalcitrantes que requieren de agentes oxidantes para su reducción generando concentraciones de Demanda Química de Oxígeno (DQO), superiores a 1900 mg/L (Ali y Sreekrishnan, 2001).

El tratamiento de estos efluentes consta de sistemas de tratamientos primarios y secundarios. Los tratamientos primarios se encargan de la remoción de sólidos suspendidos (80 – 90%), neutralización y disminución de temperaturas. Posteriormente, se realiza un tratamiento secundario, en el cual los microorganismos presentes utilizan materia orgánica biodegradable como fuente de nutrientes y energía para su propagación (Thompson y col., 2001; Latorre y col., 2007). Dentro de los tratamientos secundarios, se mencionan sistemas de tipo aeróbico o anaerobio, siendo más común los de tipo aeróbicos de tipo convencional como lodos activados y lagunas aireadas. Con eficiencias de eliminación de DBO₅ entre 73 - 92% y mayor al 90%, respectivamente. Mientras que para el caso de DQO, estos se encuentran entre 50 - 92% y 40 - 60% respectivamente (Belmonte y col., 2005; Schnell y col., 2000; Stuthridge y col., 1991; Thompson y col., 2001; Welander y col., 1997).

En la actualidad, la industria ha comenzado a utilizar tratamientos de biomasa adherida como el sistema MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor), por las ventajas que presenta. Entre ellas, requiere menor volumen de reactor ya que la biomasa crece como biopelícula en carriers, los cuales permiten que el crecimiento de la biomasa se de en una mayor area superficial, favoreciendo el crecimiento de biopelículas en el soporte. Otorgándoles una mayor resistencia a alteraciones del medio, evita recirculación de lodos y posee la capacidad de eliminar altas concentraciones de contaminantes, al permitir una alta concentración de biomasa por inmovilización. Estudios realizados, han determinado eficiencias en eliminación de DBO₅ entre 85 - 99%, mientras que para el caso de la DQO del 24 - 85% (Magnus y Carlberg, 2000; Odegaard, 2000; Pokhrel y Viraraghavan, 2004).

1.5. Producción de polihidroxicanoatos (PHAs)

Otro de los inconvenientes asociados al tratamiento de estos efluentes, consiste en controlar grandes concentraciones de biomasa generada en los sistemas de tratamiento secundario. Correspondiendo aproximadamente a la mitad de la DBO₅ de entrada al tratamiento (Metcalf y Eddy, 1995). Constituyendo un costo para la industria ya que deben ser tratados y llevados a disposición.

Es por esto que se plantea la producción de PHAs con el fin de otorgar un valor agregado a estos lodos generados. Los PHAs son poliésteres, sintetizados por más de 300 cepas bacterianas en forma de gránulos citoplasmáticos como reserva de carbono y energía bajo condiciones adversas de crecimiento tales como exceso de fuente de carbono y escasas de nutrientes como nitrógeno y fósforo (Chen, 2010).

La Figura 2 indica la estructura general de los PHAs donde n puede ser n = 1 con un grupo R= Hidrógeno, metil, etil, propil, butil, pentil, hexil, heptil, octil o nonil; n=2 con R=Hidrógeno ó n=3 con R=Hidrógeno.

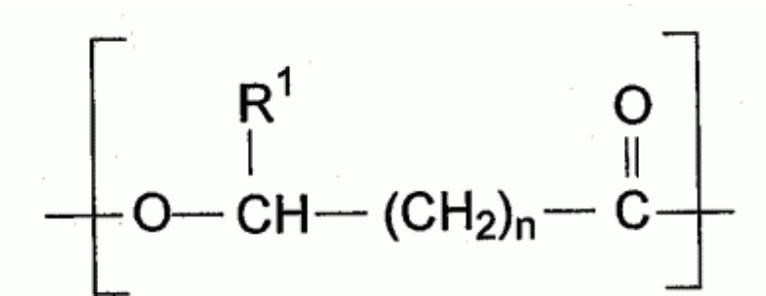


Figura 2. Estructura general de los PHAs

Los PHAs se dividen, además, en dos categorías según el número de carbonos en el monómero. PHAs de cadena corta (scl), los cuales tiene entre 3 - 5 átomos de carbono y PHAs de cadena mediana (mcl) con 6 – 14 átomos de carbono. Éstos pueden generar copolímeros que presentan características superiores con respecto a polímeros que sólo contienen unidades de cadena corta o media.

Las características físicas, mecánicas y térmicas que presentan los PHAs, han permitido que éstos sean considerados como una alternativa biodegradable para la producción de bioplásticos. En la Tabla 3 se presenta una comparación entre Poli (3HB), un PHA que con n=1 y R= metil y un plástico sintético como el polipropileno. La producción de PHAs se ha estudiado desde hace más de 80 años, sin embargo, ha cobrado especial importancia recientemente debido a problemáticas ambientales relacionadas con la utilización de petróleo para la producción de plásticos convencionales y al incremento de los costos (Keshavarz y Roy, 2010).

Tabla 3. Comparación de propiedades fisicoquímicas de Polipropileno (derivado de petróleo) y PHAs

Propiedad	Poli (3HB)	Polipropileno
Temperatura de Fusión (°C)	177	176
Temperatura de Transición vítrea (°C)	4	-10
Cristalinidad (%)	80	70
Fuerza Tensil (MPa)	40	38
Elongación al quiebre (%)	6	-

Poli(3HB): Poli(3-hidroxibutirato). Chen, 2010.

El mecanismo de biosíntesis de los PHAs deriva de intermediarios de la síntesis de ácidos grasos (Figura 3). Su producción dependerá de factores como el tipo de sustrato, temperatura, cantidad de sustrato (favorecido en exceso de fuente de carbono), tipo de bacteria y enzimas especializadas para la síntesis de PHAs que éstas posean (Nelson y Cox, 2008). El almacenamiento de PHAs se da preferentemente luego de períodos de “hambruna” de la célula ya que la célula se limita el crecimiento celular y favorece el almacenamiento de la fuente de carbono porque la cantidad de enzimas y ARN requerido para esos procesos es menor (Dias y col., 2006).

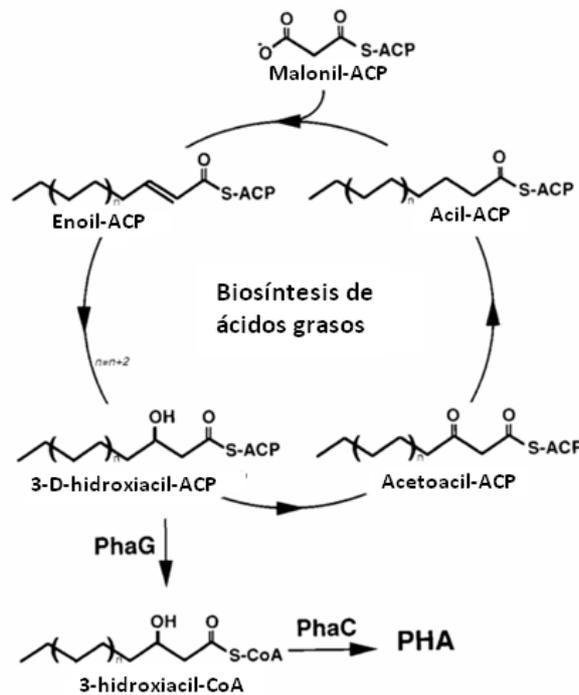


Figura 3. Mecanismo de biosíntesis de ms-PHA desde carbohidratos
Modificado de Chen, 2010.

Estudios realizados en la producción de PHAs han utilizado cultivos puros de bacterias (*Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Paracoccus denitrificans* y *Escherichia coli* recombinante, entre otras) y fuentes de carbono concentradas tales como glucosa, lo que incrementa el costo para su producción y logrando porcentajes de acumulación entre 76 – 90% en peso seco del lodo mediante reactores batch (Tobella y col., 2005; Silva y col., 2007; Wang y Lee, 1997).

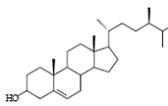
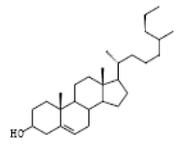
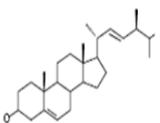
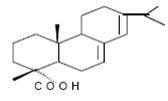
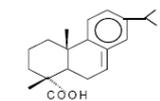
Debido a lo anterior, es que se ha estudiado la producción de PHAs a partir del tratamiento secundario de efluentes de la industria forestal de celulosa y papel. Pozo y col., (2011), realizó ensayos en batch con cultivos mixtos y efluentes de celulosa kraft con limitación de nutrientes logrando acumulaciones de 26 – 30% de células que acumulan PHAs. Mientras que en la industria papelera, Bengston y col., (2008), utilizó reactores de tipo batch con limitación de nutrientes, logrando una acumulación de 43 – 48% y sin limitación de nutrientes del 32% en peso seco del lodo.

La utilización de efluentes provenientes de la industria papelera propone un ahorro en la fuente de carbono, presentando valores de DBO₅ superiores a 770 mg/L y cultivos mixtos de bacterias donde no será necesario una esterilización del medio, disminuyendo los requerimientos de control del equipamiento tales como esterilización de éstos (Chanprateep, 2010). Actualmente, existe un interés por producción de PHAs mediante cultivos mixtos debido a que considera una simplificación en los procesos de control en los sistemas de tratamiento, mejora en la utilización de desechos y disminución en costos de esterilización. Demostrando bajo estas condiciones acumulación del 48% en peso seco del lodo (Takabatake y col., 2002; Bengsston y col., 2008).

1.6. Disrupción endocrina en efluentes de la industria del papel

La gran mayoría de los estudios basados en la industria forestal en vía a detectar los posibles efectos generados por compuestos disruptores endocrinos han sido desarrollados en celulosa kraft, donde el proceso a diferencia del de producción de papel, adiciona químicos para el blanqueado de la pulpa (Ali y Sreekrishnan., 2001). En los últimos 25 años se ha logrado disminuir el impacto de estos efluentes a los ambientes acuáticos diseñando nuevos tratamientos y mejorando las tecnologías de producción de celulosa, a través de la sustitución de cloro molecular por dióxido de cloro (ECF: Elemental Chlorine Free) logrando de esta manera la disminución de toxicidad aguda (Hewitt y col., 2008). Sin embargo, existen evidencias que demuestran la persistencia de toxicidad crónica en organismos expuestos a efluentes de celulosa kraft (Orrego y col., 2009, 2010; Lopez y col., 2011; Xavier y col., 2005). Estos corresponden al tipo de disrupción endocrina, principalmente, debido a la presencia de compuestos extractivos de la madera, los cuales se comportan como compuestos disruptores endocrinos (CDEs) y que pueden poseer actividad estrogénica o antiestrogénica (Guzmán y Zambrano, 2007). Como lo muestra la Tabla 4, la actividad disruptora, se atribuye a la similitud estructural de ciertos compuestos extractivos de la madera con hormonas esteroides (Birkett y Lester, 2003).

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos disruptores endocrinos.

Compuesto	Estructura	Peso molecular	Log Kow	Solubilidad	Ref.
Fitosteroles					
Estigmasterol		412,7	10,3	< 0,0001	1 - 3
β -sitosterol		414,7	9,6	< 0,0001	1 - 2
Campesterol		400,7	-	< 0,0001	1 - 4
Ácidos resínicos					
Ácido abiético		302,5	4,6 - 7,5	2,75	5
Ácido dehidroabiético		300,4	5,7 - 7,2	5,11	5 - 6

Ref: Referencia; Log Kow: Coeficiente de partición octanol/agua

(1) Cook y col., 1997; (2) Güçlü-Üstündag y Temelli, 2004; (3) Khan y Hall, 2003; (4) Kamaya y col., 2005; (5) Lahdelma y Oikari, 2005; (6) Kiparissis y col., 2003

Como se encuentra representado en la Figura 4, al encontrarse un CDE (estrógeno) en el citoplasma, se une al receptor de estrógenos (ER), el cual cambia su conformación pudiendo ingresar al núcleo. Allí se une a un locus específico de la cromatina operando como activador transcripcional ya que aumenta la actividad de la RNA polimerasa favoreciendo la generación de RNAm que codifica para distintas proteínas ligadas al sistema endocrino (Nelson y Cox, 2005).

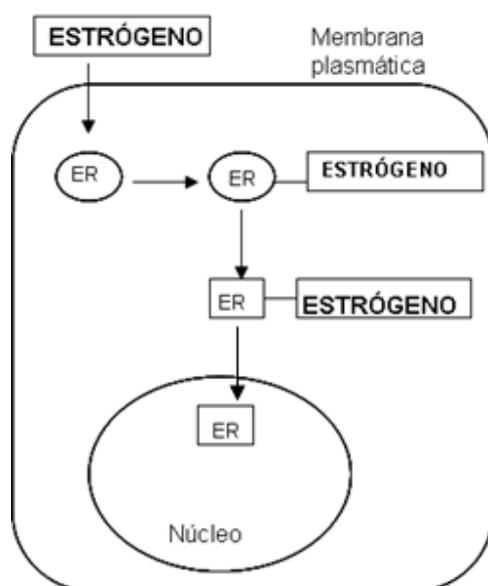


Figura 4. Esquema de la interacción estrógeno-receptor dentro de la célula Modificado de Nelson y Cox, 2005.

El origen de los CDEs puede ser estrógenos esteroidales naturales, estrógenos sintéticos, fitoestrógenos o múltiples químicos industriales (Auriol y col., 2006) cuyo efecto fenotípico sobre los organismos depende del estadio del desarrollo del organismo, tiempo de exposición, y dosis del compuesto (Guzmán y Zambrano, 2007). Algunos CDEs que se pueden encontrar en efluentes de papelera son: ácidos grasos (ácido palmítico, ácido oleico), ácidos resínicos (ácido abiético), esteroides (β -sitosterol, estigmastanol), ceras, entre otros (Latorre y col., 2003; Gutiérrez y col., 2006).

Los tratamientos biológicos implementados en la actualidad no son eficientes en eliminación de compuestos disruptores endocrinos (Latorre y col., 2003), debido principalmente a las propiedades fisicoquímicas que presentan como: baja solubilidad en

agua y coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}). Cuando los valores de $\log K_{ow} > 4$, existe tendencia de estos compuestos a bioacumularse o persistir en los organismos (biomagnificación) (Auriol y col., 2006). Acumulación que dependerá además de la edad, sexo y organismo expuesto (Geyer y col., 2000). Los más estudiados son los ácidos resínicos y fitosteroles (Tabla 4).

Los ácidos resínicos son terpenos tricíclicos, ácidos débiles, insolubles en agua, solubles en solventes orgánicos y neutros no polares, relativamente lipofílicos y poseen un alto coeficiente de partición octanol agua $\log K_{ow} > 4$ (Frigon y col., 1999; Belmonte y col., 2005). Por otro lado, los fitoesteroles poseen una estructura química muy similar al colesterol (núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno), son compuestos polares, poco solubles en agua (solubles en diclorometano y metil-terc-eter) y muy lipofílicos con valores de $\log K_{ow} > 6$ (Hewitt y col., 2000, Gúzman y Zambrano., 2007).

La Tabla 5, muestra los principales efectos de estos compuestos en peces, se ha observado disminución en el tamaño de las gónadas (Diniz y col., 2005), pérdida de fertilidad, bajo desarrollo de caracteres secundarios, menor producción de oocitos (McMaster y col., 1991), inducción de vitelogenina en machos y disminución de producción de hormonas sexuales, entre otras (Hewitt y col., 2008). Algunos estudios sobre efectos de efluentes de industrias papeleras con procesos productivos mecánicos integrados (TMP y PGW) en Trucha marrón (*Salmo trutta trutta*) mencionan la acumulación de ácidos resínicos en los efluentes generando daño celular, necrosis en células de hígado e inhibición en el crecimiento de los peces, así como también indican que la exposición a este tipo de efluentes durante el desarrollo y crecimiento de los peces afecta a futuro en la fertilidad y calidad de los huevos (Johnsen y col., 1998; Johnsen y col., 2000).

Tabla 5. Efectos de compuestos disruptores endocrinos en distintas especies

Especie	Efluente o Compuesto	Efecto	Referencia
<i>Oncorhynchus</i>			
<i>mykiss</i>	Celulosa Kraft	Disminución en tamaño de gónadas	1
		Reducción de hormonas sexuales	2
		Disminución tamaño de larvas	
		Inducción de actividad EROD en machos e inhibición en hembras	
<i>Oncorhynchus</i>			
<i>mykiss</i>	17 β -estradiol, estrona, 17 α -estinilestradiol	Inducción vitelogenina (VTG) en machos	2
<i>Daphnia</i>			
<i>magna</i>	Celulosa Kraft	Reducción en tasa de crecimiento alométrico	3
<i>Catostomus</i>			
<i>commersoni</i>	Celulosa Kraft	Bajo desarrollo de caracteres secundarios	4
		Menor producción de oocitos	
<i>Salmo trutta</i>			
	Papelera	Disminución niveles de testosterona	5 – 6
		Menor crecimiento	
		Disminución de fertilidad	
		Inhibición de actividad EROD en machos	
<i>Percillia</i>			
<i>gillissi</i>	Celulosa Kraft	Aumento en producción de esteroides (H)	7 - 8
<i>Trichomycterus</i>			
<i>areolatus</i>	Celulosa kraft	Inducción de madurez	7 - 8
		Sobreestimulación del sistema reproductor	
		Aumento tamaño de las gonadas	

(1) Van den Heuvel y Ellis, 2002; (2) Orrego y col., 2010; (3) López y col., 2011; (4) McMaster y col., 1991; (5) Johnsen y col., 2000; (6) Johnsen y col., 1998; (7) Chiang y col., 2009; (8) Chiang y col., 2011.

1.7. Detección de disrupción endocrina mediante biosensores

Detectar disrupción endocrina en efluentes de la industria del papel podría ser fundamental para evaluar sus posibles efectos en el ambiente acuático, de manera de prevenir que este tipo de compuestos llegue a afectar a la población. Por lo antes mencionado, el uso de biosensores como células o tejidos, sería altamente beneficioso ya que mediante el uso de éstos, se estaría evitando el sacrificio de organismos al ser utilizados como bioindicadores.

1.7.1. Fundamentos de la utilización de levaduras como biosensores

Un ejemplo de biosensor, corresponde a levaduras modificadas genéticamente (*Saccharomyces cerevisiae* recombinante) mediante el ensayo YES: (Yeast Estrogen Screen) el cual permite la detección de disrupción endocrina de tipo estrogénica (Routledge y Sumpter, 1996). El uso de una levadura presenta ventajas que facilitan su utilización, tales como: ser un hongo unicelular, poseer células de tipo eucarióticas, presentar ciclos de vida corto, gran capacidad de reproducción y fácil cultivo.

Otras características que avalan la utilización de levadura, es que estas no presentan otro tipo de receptor nuclear homólogo a los de vertebrados que pudiera interferir, además de que el plegamiento y modificaciones post-traduccionales de proteínas de vertebrados en levaduras, es bastante similar a la de mamíferos, lo que resulta bastante relevante ya que determina la especificidad del sistema, la cual se encuentra determinada por los elementos genéticos externos insertados en la levadura (Noguerol y col., 2006).

El bioensayo YES, descrito por Routledge y Sumpter (1996), consiste en la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante a nivel cromosomal con un gen receptor nuclear (hER- α) y con un plásmido que contiene elementos de respuesta estrogénicos (EREs) que controla la expresión del gen reportero (LacZ). Por lo tanto ante la presencia de un agente con potencial biológico en el medio (estrógeno), se activará la transcripción del receptor el cual funcionará como activador transcripcional de LacZ, que codifica para la síntesis de la proteína β -galactosidasa.

Cuya actividad enzimática, puede ser fácilmente detectada y cuantificada mediante el sustrato cromogénico clorofenol rojo-B-D-galactopiranosido (CPRG) el cual cambia de color amarillo a rojo (Figura 3) (Brix y col., 2010).

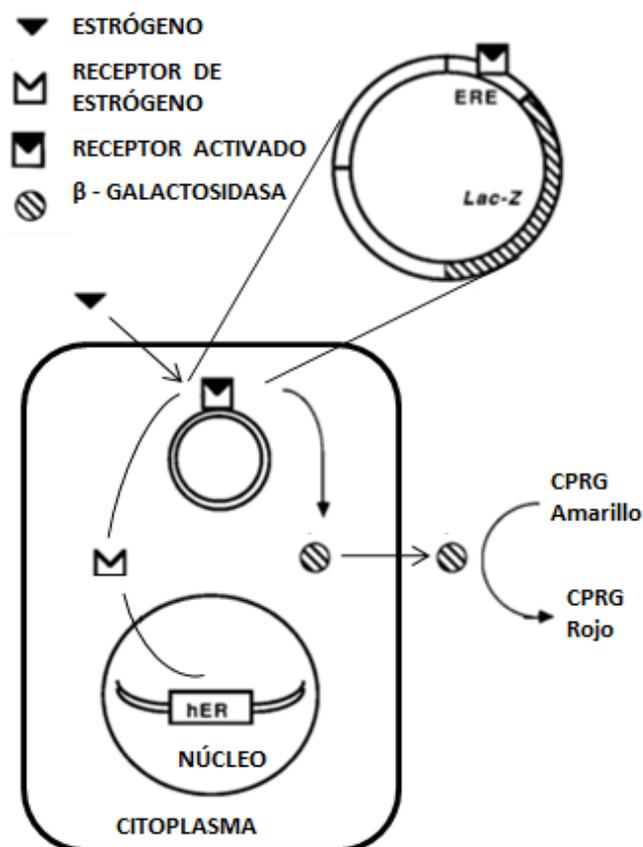


Figura 5. Funcionamiento del ensayo YES en presencia de estrógeno Modificado de Routledge y Sumpter, 1996.

1.7.2. Aplicación de biosensores para detección de disrupción endocrina

Estudios realizados en detección de disrupción endocrina por *Saccharomyces cerevisiae* recombinante por Chamorro y col. (2010), evaluaron mediante YES la presencia de compuestos estrogénicos en efluentes de celulosa kraft después de tratamiento secundario, en industrias con distintas materias prima: *Pinus radiata*, *Eucaliptus globulus* y combinación de estos dos. Los resultados obtenidos indicaron mayor actividad de

disrupción endocrina, en efluentes de *E. globulus* (1,475 ng/L de EE2 eq.), luego en efluentes mixtos (0,849 ng/L de EE2 eq.). Mientras que el de *P. radiata* (0,383 ng/L de EE2 eq.), presentó menor potencial. Por otro lado, Fernández y col., (2007), utilizó otro biosensor basado *Saccharomyces cerevisiae* recombinante para detección de disrupción endocrina conocido como RYA (Recombinant Yeast Assay) para detectar actividad estrogénica de efluentes de una planta de celulosa kraft luego de un tratamiento de lodo activado resultando una concentración de 40 - 82 ng/L de E2 eq. La diferencia de potencial estrogénico entre las distintas materias primas, se debe a su composición de compuestos extractivos, *E. globulus* presenta mayor cantidad de hidrocarburos y fitoesteroles y en menor medida presencia de triterpenos, esteroides y fenoles. Por lo que se espera encontrar en este tipo de efluente β -sitosterol, estigmastanol, escualeno, campesterol, fucosterol. En el caso del *P. radiata*, esta compuesto mayormente por ácidos resínicos, ácidos grasos, hidrocarburos y en menor medida esteroides por lo que es posible detectar en este efluente compuestos como el ácido abiético, ácido dehidroabiético, ácido pimárico, ácido abietánico, ácido sandaracopimárico, β -sitosterol y estigmasterol (Gutiérrez y col., 1998; Kostamo y col., 2004; Chamorro y col., 2009, 2010; Van den Heuvel y col., 2009; Xavier y col., 2009).

Pocos son los estudios en actividad estrogénica en efluentes de la industria de papel. Hamm y col. (2006), evaluaron efectos endocrinos en efluentes de 13 industrias papeleras con distintos procesos productivos y tratamiento de efluentes mediante YES. Mencionando que de las 16 muestras en estudio, 10 presentaron actividad estrogénica y destacando mayores índices de actividad en tres muestras. Una de ellas corresponde a una muestra de papelería que utiliza dos tercios de pulpa producida mecánicamente en un proceso integrado y las dos muestras restantes utilizan pulpa reciclada como materia prima. Sin embargo, no es posible comparar estos resultados con los obtenidos en ensayos realizados a efluentes de la industria celulosa ya que el sistema de medición de actividad estrogénica utilizado no corresponde a un sistema de medición universal. En este caso, se indica la tasa de inducción de β -galactosidasa obteniendo valores entre 2 – 2,8.

Hipótesis

El sistema de tratamiento de biomasa adherida MBBR es eficiente para la producción de Polihidroxialcanoatos (PHAs), teniendo incidencia en la eliminación de compuestos disruptores endocrinos presentes en efluentes de la industria papelera.

Objetivos generales

Evaluar la operación de un sistema MBBR para obtener PHAs y eliminar compuestos disruptores endocrinos en efluentes de la industria papelera.

Objetivos específicos

- Estudiar las condiciones óptimas de nutrientes para la conversión de materia orgánica del efluente a polihidroxialcanoatos (PHAs).

- Evaluar la eficiencia de eliminación de DQO y DBO₅ con las distintas condiciones de nutrientes aplicadas al sistema de tratamiento.

- Evaluar la eficiencia de un sistema de tratamiento MBBR para la eliminación de compuestos estrogénicos presentes en efluentes de la industria papelera mediante *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

2. METODOLOGIA

2.1. Influyente

Se utilizó un efluente proveniente de una planta productora de papeles y cartones. La cual utiliza como materia prima 95% *Pinus radiata* y 5% *Eucaliptus globulus* en un proceso productivo de tipo TMP (pulpaje termomecánico). Las muestras, fueron extraídas previo a dosificación de nutrientes. Se transportaron y almacenaron en bidones de 50 L de capacidad y refrigeraron a 4 °C en oscuridad.

2.2. Caracterización del reactor MBBR

Como se muestra en la Figura 6, se implementó un sistema MBBR el cual se encontraba en un tanque de vidrio de volumen útil de 0,850 L. Se utilizaron 100 soportes de tipo AMB (Assistin Moving Bed) de polietileno para permitir la adhesión de la biomasa. Estos soportes presentan una densidad de 0,95 g/ml y 850 m²/m³.

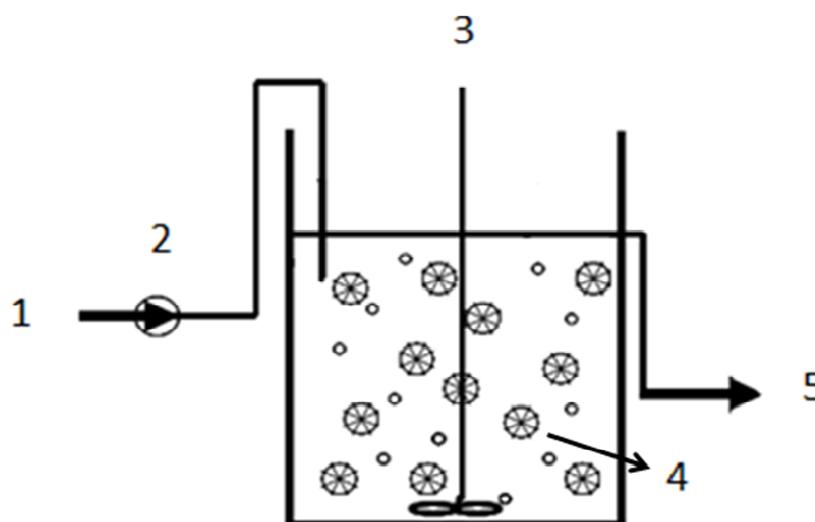


Figura 6. Diseño de reactor MBBR

1: Influyente; 2: Bomba peristáltica; 3: Difusor de oxígeno; 4: Carriers para el crecimiento de la biopelícula; 5: Efluente.

2.2.1. Operación del reactor

El sistema se operó en continuo y se alimentó con efluentes de la industria papelera a los cuales se les adicionó en una primera etapa Nitrógeno (NH_4Cl) y Fósforo (K_2HPO_4) para lograr una relación óptima de nutrientes de $\text{DBO}_5:\text{N}:\text{P}$ (100:5:1). El influente se mantuvo a una temperatura ambiente (18,90 – 24,12 °C) y una concentración de oxígeno disuelto entre 3,80- 6,60 mg/L. Se ajustó a un pH entre 7,42 – 7,69.

En la Tabla 6 se indica la estrategia de operación, la cual se realizó En distintos tiempos de retención hidráulica (TRH) de 48 y 14 horas y distintas relaciones de nutrientes para $\text{DBO}_5:\text{N}:\text{P}$, siendo la primera de 100:5:1 y la segunda que represente una limitación de nutrientes de 100:1:0,3.

El reactor se inoculó con una concentración de 5 gr SSV/L.

Tabla 6. Plan de trabajo y operación del reactor MBBR

Parámetro	Unidad	$\text{DBO}_5:\text{N}:\text{P}$		
Dosis de nutrientes	C:N:P	100 : 5 : 1		
Período	d	1-73	74-109	110-167
TRH	h	48	14	14
VCO	kg DBO_5/m^3 d	0,81	2,76	2,83

2.2.2. Caracterización microscópica

Para evaluar indicadores de calidad del lodo, se realizaron observaciones de la biomasa pluricelular en suspensión mediante microscopio óptico acoplado a una cámara. Se observaron protozoos, rotíferos y otros.

2.3. Métodos analíticos

2.3.1. Parámetros fisicoquímicos

Se realizaron caracterizaciones fisicoquímica tanto de influente como de efluente donde se determinaron los siguientes parámetros: DQO, DBO₅ y Compuestos fenólicos totales (UV₂₄₅) semanalmente y Nitrógeno total (NT) y Fósforo total (PT) del influente una vez al mes.

La DQO se determinó espectroscópicamente (660 nm) mediante el equipo (Spectronic unicam-Genesis 10 UV), después de 2 h de digestión a temperatura 150 °C con solución de dicromato de potasio y sulfato de plata. La DBO₅ se realizó utilizando el método de Winkler con un inóculo de 1 ml de aguas servidas, se empleó un volumen de muestra suficiente para que la concentración de oxígeno disuelto se reduzca a la mitad, durante cinco días de incubación a 20 °C (APHA, 1998). Por otro lado, los compuestos fenólicos totales se determinaron por absorbancia a 215 nm en cubeta de cuarzo.

Los análisis de Nitrógeno total y Fósforo total fueron medidos por Kits Merck Spectroquant-Nova 60

2.3.2. Determinación de la actividad heterótrofa de la biomasa

Se evaluó la actividad heterotrófica de la biomasa a través de análisis respirométrico en cada una de las etapas. Allí se determinó el consumo de oxígeno consumido por los microorganismos que degradan un sustrato orgánico, en este caso, correspondió a acetato (CH₃COONa).

Para realizar el análisis se lavó 3 veces el lodo con una solución de tampón fosfato en base a KH₂PO₄ y K₂HPO₄ DE pH 7. La concentración de biomasa utilizada fue de 0,8 a 1 gr SSV/L y un volumen de muestra de 10 ml. Se aireó la muestra hasta la saturación por 30 minutos para lograr una concentración de oxígeno de 7 – 8 mg/L.

El análisis respirométrico se basó en el protocolo de Mosquera y col. (2005), modificado a 20°C y mediciones cada 15 segundos.

2.3.3. Biosíntesis de PHAs

La acumulación de PHAs se determinó mediante espectrofluorimetría y citometría de flujo. En primer lugar se realiza una desfloculación del lodo bacteriano (pirofosfato de sodio 0,01% y lubrol 0,01%) (Gayford y Richards, 1970). Las muestras se midieron mediante densidad óptica (OD) a 600nm (UV-Vis Spectrophotometer, TU-1810 Split Beam) para estandarización a 0,8 – 1. Se agregan 20 µl de rojo de nilo (25µmol /L en DMSO). Se incubó a 30°C por 60 min (Spiekermann y col., 1999).

Luego se mide por espectrofluorimetría la intensidad de fluorescencia a una excitación de longitud de onda de 290 nm en el rango 550 – 600 nm. Mientras que el porcentaje de células que acumulan PHA se determinó mediante citometría de flujo (Flow cytometry FACSCalibur system). Los resultados de las muestras se basan en el análisis de 20.000 eventos (Godoy y col., 2003; Silva y col., 2007).

Se realizó un conteo de células vivas y muertas. Para lo cual se agregó 12 uL de tinción vivas/muertas (Live/Dead^R BacLightTM INVITROGEN). Las muestras se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 7 minutos. Se filtraron en filtros de policarbonato (0,2 µm de poro). La visualización de células se realizó utilizando microscopio Olympus BX51 con cámara Cool SNAP-Procf.MonoChrome acoplada.

2.3.4. Extracción en fase sólida (SPE: Solid Phase Extraction)

Se utilizaron cartuchos Accu-bond® II ODS-C18 de 500 mg x 6 mL que poseen un soporte llamado octadecilsilano. Se realizó un acondicionamiento de los cartuchos pasando 2 volúmenes de agua destilada y posteriormente 2 volúmenes de etanol. Luego el efluente se pasó a través de estos cartuchos con un flujo de 6 mL por min. Para obtener la muestra concentrada se pasaron dos volúmenes de etanol con el cual se pudo trabajar para los bioensayos.

2.3.5. Yeast Estrogen Screen (YES)

El ensayo se realizó según la metodología descrita por Routledge y Sumpter, (1996). Para lo cual se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante modificada en el Departamento de Genética de Glaxo, donada por la profesora Marcia Dezotti del Departamento de Ingeniería Química de Polución de Aguas de la Universidad Federal de Rio de Janeiro.

El análisis se realizó en microplacas de 96 pocillos a 28 °C. Se tomó una alícuota de 250 µL de un cultivo de 24 horas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante y se incorporó al reactivo cromogénico CPRG (rojo clorofenol-D-galactopiranosido). Se tomaron alícuotas de 200 µL de esta mezcla y se transfirieron en cada pocillo de la microplaca, ésta también contiene un control negativo (etanol) y un control positivo (patrón) el cual corresponde a una serie de diluciones de 17-β-estradiol en un rango de 54 ng/L a 26 ng/L. Luego, las microplacas fueron selladas y agitadas por 5 minutos y se incubaron por 72 h a 30 °C. La respuesta se observó a través del cambio del color amarillo a rojo, el cual fué medido espectrofotométricamente a través de un lector de placas EL x 800, BioTex a 570 nm y a 630 nm (Chamorro y col., 2010).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización fisicoquímica del influente

La Tabla 7 muestra los resultados de la caracterización realizada al influente obtenido de la industria papelera.

Tabla 7. Caracterización fisicoquímica del influente de papelera

Parámetro	Unidad	Rango	Promedio¹
pH		6,46 - 7,04	6,77 ± 0,22
DBO ₅	g O ₂ /L	1,60 - 2,16	1,67 ± 0,13
DQO	g O ₂ /L	2,19 - 3,38	2,97 ± 0,62
Fenoles totales UV _{215 nm}	g/L	7,12 - 10,67	8,89 ± 1,16
Color (440 nm, pH 9)	Abs	0,50 - 0,51	0,51 ± 0,01
Fósforo total	mg/L	5,40 - 5,50	5,45 ± 0,07
Nitrógeno total	mg/L	9,52 - 10,00	9,76 ± 0,34
SST	g/L	0,15 - 0,16	0,16 ± 0,01
SSV	g/L	0,52 - 0,59	0,56 ± 0,05
ST	g/L	2,02 - 2,36	2,19 ± 0,24
SV	g/L	1,76 - 1,98	1,87 ± 0,16

¹Valores promedio de 6 determinaciones

3.2. Operación del reactor MBBR

3.2.1. Caracterización del inóculo

Previo a la puesta en marcha del reactor MBBR se caracterizó el lodo obtenido de una planta de lodos activados para tratamiento de aguas servidas de forma de inocular 5 g SSV/L en el reactor y conocer la actividad de la biomasa para poder evaluar el comportamiento de esta a lo largo de las distintas etapas de operación.

Tabla 8. Caracterización del inóculo

Parámetro	Unidad	Inóculo
pH	-	7,00 - 7,20
SST	g/L	5,38 - 6,58
SSV	g/L	4,68 - 5,2
SSV/SST		0,79 - 0,80
Velocidad de consumo de oxígeno	mg O ₂ /L·d	0,11 - 0,12
Actividad heterotrófica	mg O ₂ /g SSV·d	0,30 - 0,40

3.2.2. Parámetros operacionales

Como se observa en la Figura 7, el pH del influente se mantuvo durante todo el periodo a $7,54 \pm 0,10$. Mientras que para el efluente, el pH obtenido en una primera etapa fue de 5,01 por lo que se añadió 1 g/L de NaHCO₃ con lo cual se logró obtener un promedio de pH de efluente de 7,63 ($\pm 0,27$). La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en $5,55 (\pm 1,02)$ mg O₂/L con el fin de generar la mezcla completa. La Figura 7 indica la operación del reactor, el TRH, la relación DBO₅/DQO de influente y efluente y la velocidad de carga orgánica volumétrica (VCO).

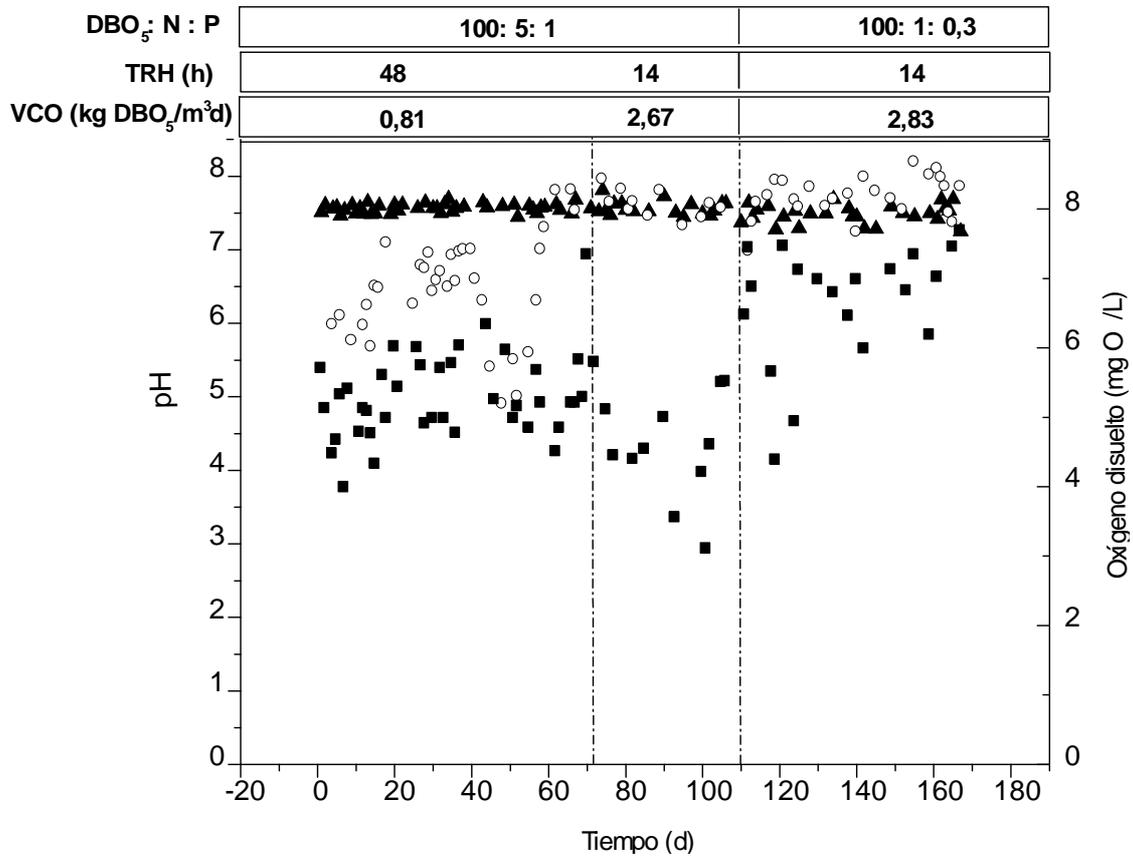


Figura 7. Evolución del pH de influente (▲), pH de efluente (○) y oxígeno disuelto (■) durante el periodo de operación del reactor.

Tabla 9. Operación del reactor MBBR

Parámetro	Unidad	Relación de nutrientes		
		100:5:1	100:1:0,3	100:1:0,3
Relación de nutrientes	DBO ₅ :N:P	100:5:1	100:1:0,3	100:1:0,3
Periodo	d	1 - 73	74 - 109	110 - 170
TRH	h	47,78 ± 0,36	14,00 ± 0,44	13,88 ± 0,28
Caudal	L/d	0,43 ± 0,03	1,46 ± 0,05	1,47 ± 0,03
DBO ₅ /DQO _{influyente}		0,66 ± 0,22	0,61 ± 0,05	0,62 ± 0,01
DBO ₅ /DQO _{efluente}		0,20 ± 0,11	0,21 ± 0,02	0,37 ± 0,07
VCO-Volumétrica	kg DQO/m ³ ·d	1,39 ± 0,31	4,13 ± 1,48	4,20 ± 1,22
VCO-Volumétrica	kg DBO ₅ /m ³ ·d	0,81 ± 0,08	2,67 ± 0,02	2,83 ± 0,08

3.3. Parámetros de eficiencia de operación

La Figura 8 muestra la eficiencia de eliminación de carga orgánica obtenida durante la operación del reactor en términos de DQO y DBO₅ así como la eliminación de compuestos fenólicos totales en las distintas etapas. Se observa que los máximos valores de eliminación de DQO y DBO₅ se obtuvieron a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes 100:5:1, alcanzando valores de 79,22% y 97,01% respectivamente. A VCO de 2,67 kg DBO₅/m³·d la máxima de eliminación de DQO y DBO₅ fue de 74,59% y 91,9% de. Mientras que a VCO de 2,83 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes 100:1:0,3, disminuye la eliminación de ambos parámetros alcanzando máximas de eliminación de 68,06% y 84,6% para DQO y DBO₅, respectivamente. En cuanto a la eliminación de fenoles totales, se observa una mayor eficiencia de eliminación a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d con un promedio de 41,21% a la cual disminuyó en las VCO de 2,67 kg DBO₅/m³·d y 2,83 kg DBO₅/m³·d a 14,82% y 16,94%, respectivamente. La Tabla 10 muestra los valores de entrada y salida de estos parámetros.

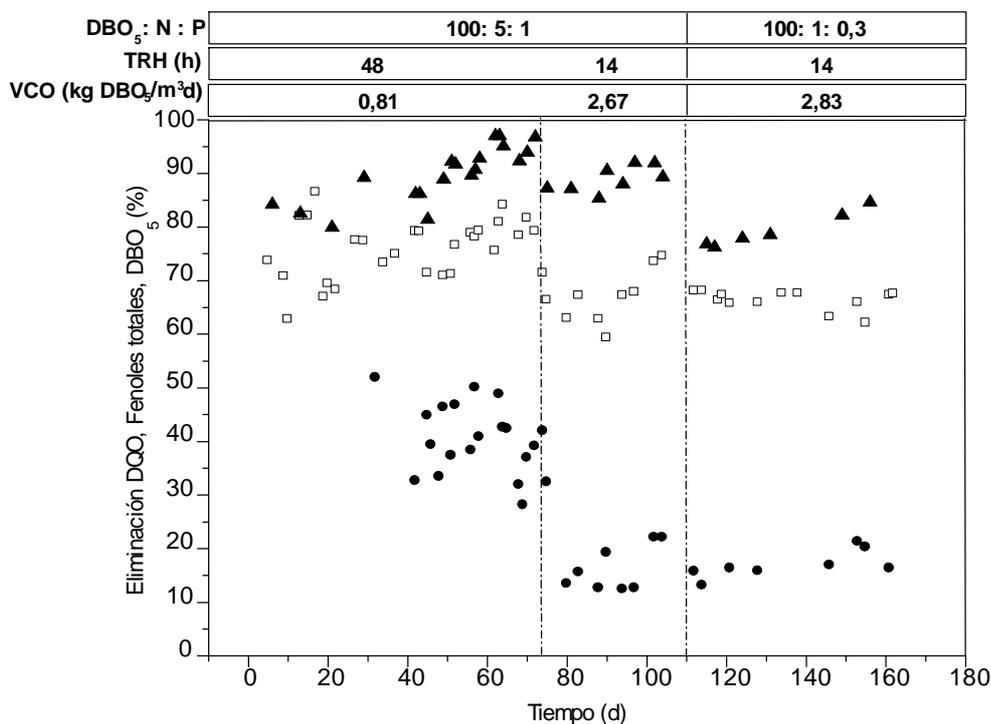


Figura 8. Eficiencia de eliminación de DQO (□), DBO₅ (▲) y compuestos fenólicos totales (●) durante el periodo de operación.

Tabla 10. Concentraciones de entrada y salida del reactor de DQO, DBO₅ y Fenoles totales (UV_{215nm})

Parámetro	Unidad	DBO ₅ : N : P		
		100:5:1		100:1:0,3
VCO	kg DBO₅/m³·d	0,81	2,67	2,83
DQO _{influyente}	g/L	2,63 ± 0,84	2,67 ± 0,38	2,63 ± 0,08
DQO _{efluente}	g/L	0,74 ± 0,15	0,87 ± 0,15	0,89 ± 0,05
DBO _{5 influyente}	g/L	1,61 ± 0,15	1,61 ± 0,13	1,65 ± 0,04
DBO _{5 efluente}	g/L	0,16 ± 0,09	0,18 ± 0,04	0,33 ± 0,06
Fenoles Totales _{influyente}	g/L	9,88 ± 0,91	8,17 ± 0,45	7,19 ± 0,33
Fenoles Totales _{efluente}	g/L	5,62 ± 0,61	6,95 ± 0,36	5,97 ± 0,39

3.4. Evolución y caracterización de la biomasa bacteriana

Para evaluar tanto la capacidad de sedimentación del lodo como la calidad de éste, se relacionó el IVL a la relación alimento microorganismo (A/M). De esta forma se realiza una estimación del tipo de lodo presente en el reactor pudiendo ser de tipo disperso, floculento o lodo inflado (bulking). La Figura 9 indica que a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes óptima, la biomasa mantuvo características de lodo floculento. Al aumentar la VCO a 2,67 kg DBO₅/m³·d, se mantuvo un lodo floculento con tendencia a bulking y a VCO de 2,83 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes 100:1:0,3, la biomasa no logró características de lodo floculento, manteniéndose en bulking.

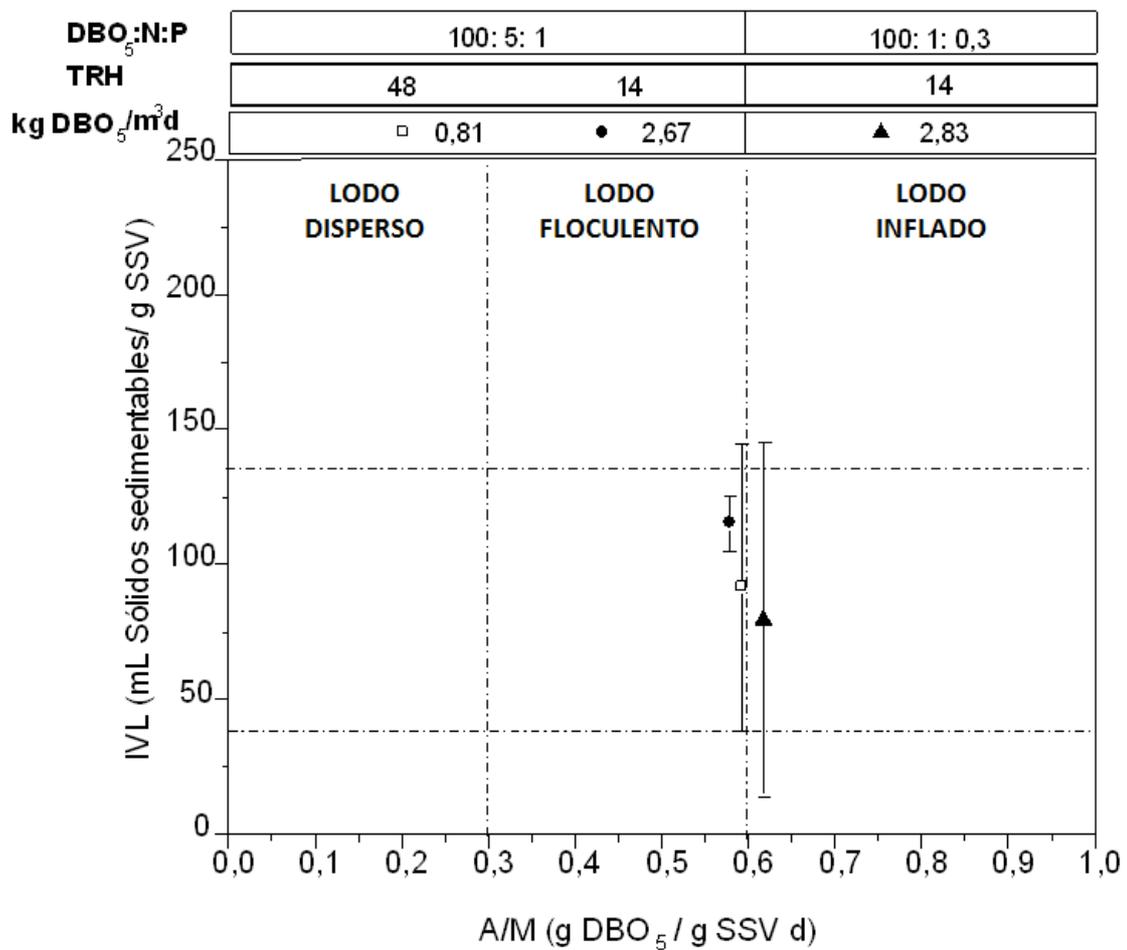


Figura 9. Relación entre IVL y relación Alimento/Microorganismo

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

La Figura 10 muestra los microorganismos observados a través de microscopía óptica donde (a) corresponde a un nematodo, por otro lado, (b), (e) e (i) corresponden a ciliados fijos que se encuentran unidos al flóculo, (d) y (g) son ciliados libres nadadores y (c), (f) y (h) corresponden a rotíferos.

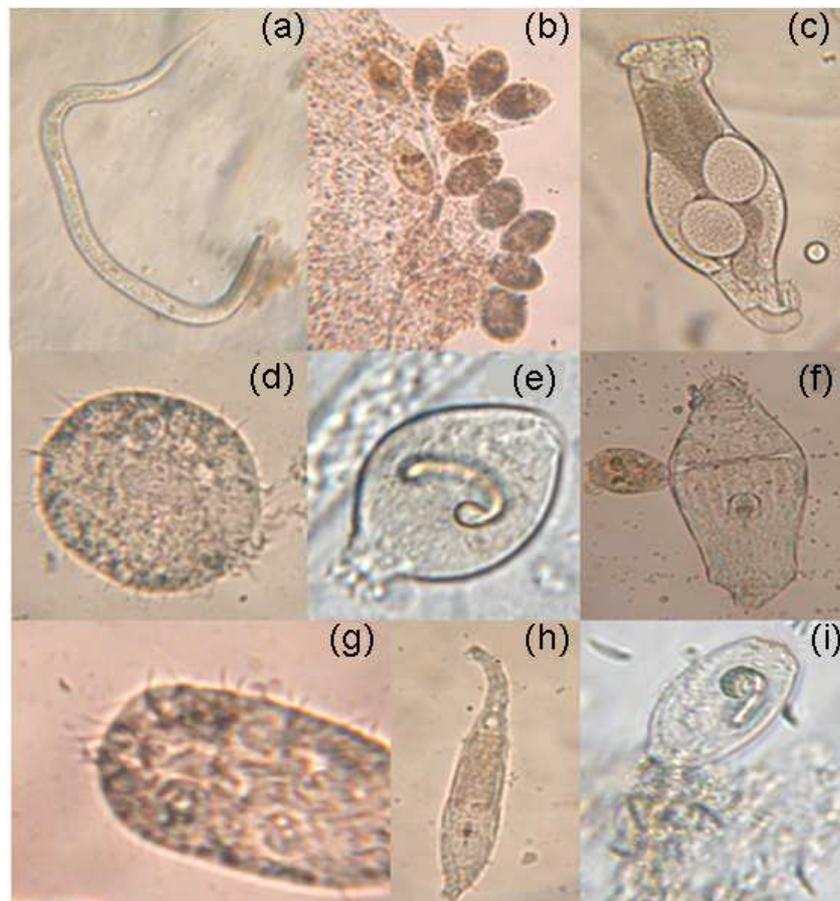


Figura 10. Microorganismos bioindicadores presentes en el sistema.

La Tabla 11 muestra los recuentos de células vivas y muertas realizados en cada una de las velocidades de carga orgánica y relación de nutrientes (100:5:1). Observando que a una óptima relación de nutrientes y VCO de 2,67 kg DBO₅/m³·d presenta una mayor cantidad de células vivas y células totales.

Tabla 11. Recuentos de celulas vivas y muertas en cada etapa

DBO₅ : N : P	100:5:1		100:1:0,3
VCO (kg DBO₅/m³·d)	0,81	2,67	2,83
Células vivas (bact/ml)	1,16 × 10 ⁸	6,20 × 10 ⁸	5,90 × 10 ⁸
Células muertas (bact/ml)	2,60 × 10 ⁸	3,50 × 10 ⁸	1,47 × 10 ⁸
Células totales (bact/ml)	2,72 × 10 ⁸	9,70 × 10 ⁸	7,37 × 10 ⁸

3.5. Acumulación de PHA

La Figura 11 muestra el porcentaje de células que acumulan PHA durante la operación del reactor en cada una de las VCO y relación de nutrientes. El máximo porcentaje de células que acumula PHAs corresponde a la VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d con un promedio de 88,11% ± 6,34. Las VCO de 2,67 kg DBO₅/m³·d y 2,83 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes 100:1:0,3 resultaron tener una acumulación de PHAs similar con porcentajes de 73,09 % ± 20,11 y 75,41% ± 8,63, respectivamente. Además, en la Figura 11 se muestra la evolución de la concentración de SSV durante la operación la cual se mantuvo estable en las tres etapas con un promedio de 2,9 g SSV/L.

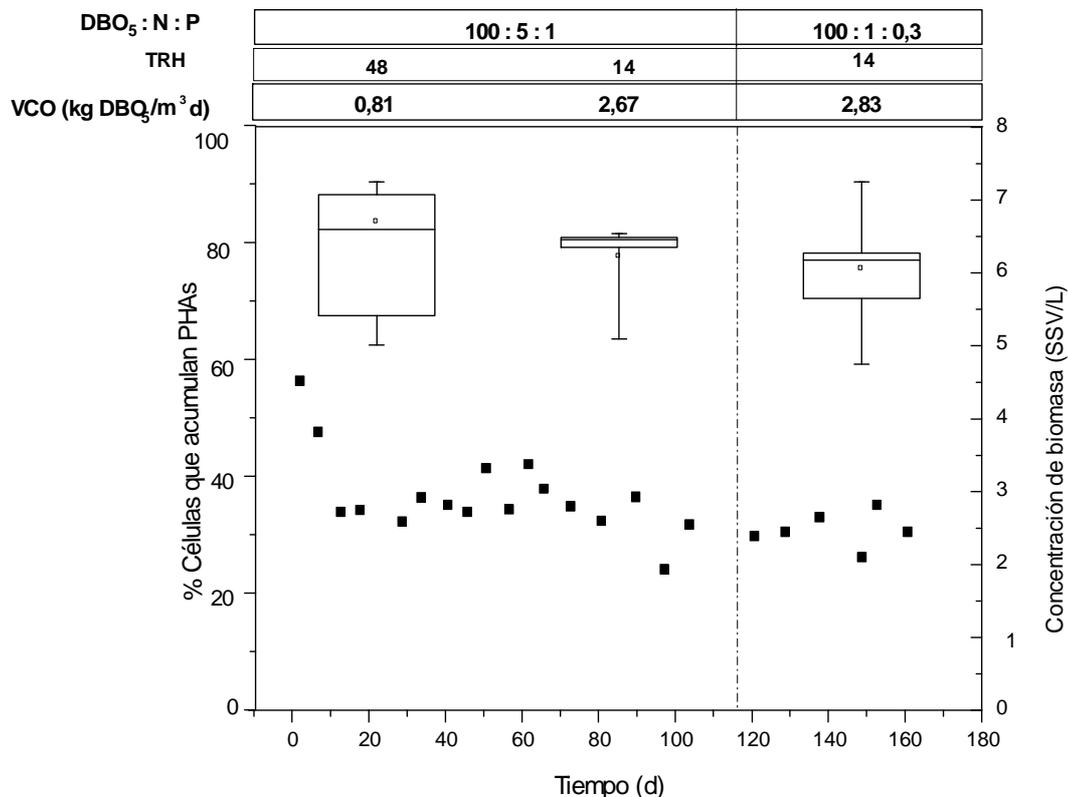


Figura 11. Porcentaje de células que acumularon PHA durante los 170 días de operación en relación con la concentración de sólidos suspendidos volátiles (■).

Otra manera de determinar PHA es a través de intensidad de fluorescencia. Como se observa en la Figura 12, a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes 100:5:1 se presenta la mayor cantidad de PHA generado con un promedio de intensidad de fluorescencia de 122,68 ± 47,77. Mientras que a VCO de 2,67 kg DBO₅/m³·d y 2,83 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes 100:1:0,3, la acumulación fue bastante similar, obteniendo valores de 31,43 ± 11,53 y 30,16 ± 5,66 respectivamente.

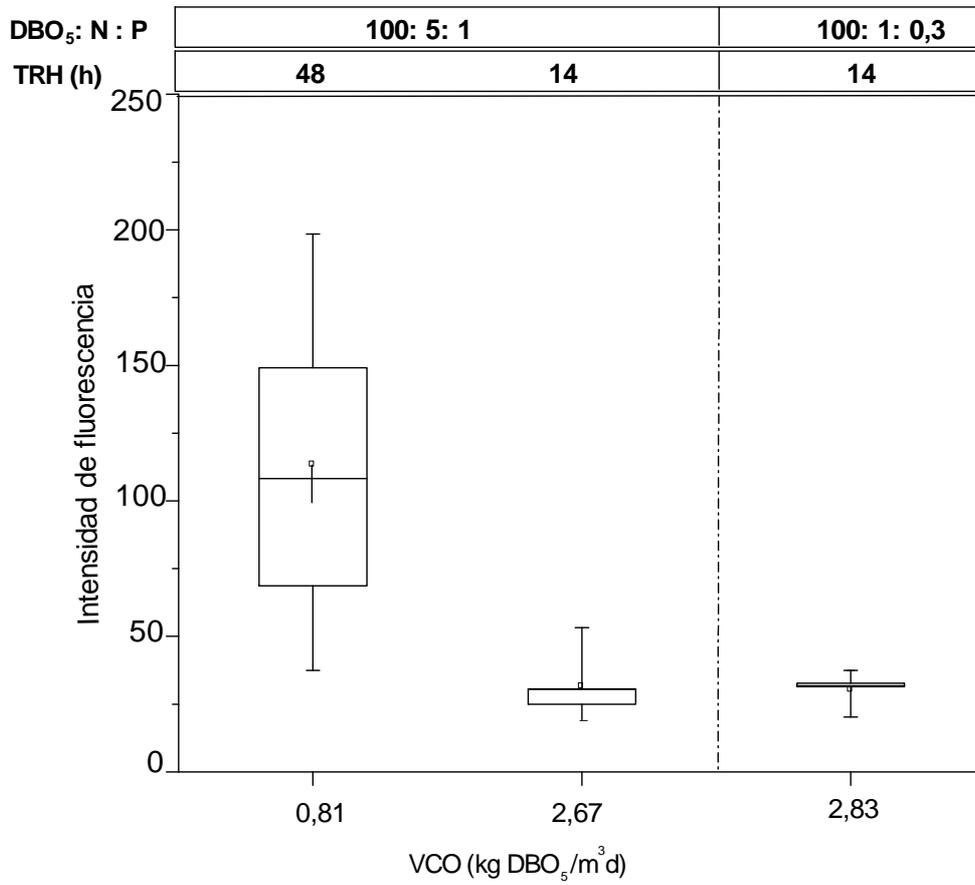


Figura 12. Acumulación de PHA en las distintas cargas orgánicas y relación de nutrientes administradas.

3.6. Utilización de biosensores para evaluar la presencia de disrupción endocrina

Para verificar el estado de la cepa, se realizó una curva de crecimiento de 48 horas, ya que se indica por protocolo que la densidad óptima debe ser de 0,8 – 1 a una longitud de onda de 600 nm a 24 horas de cultivo. La Figura 13, muestra los resultados obtenidos, se observa un crecimiento de densidad óptica a las 24 h levemente superior a 1 .

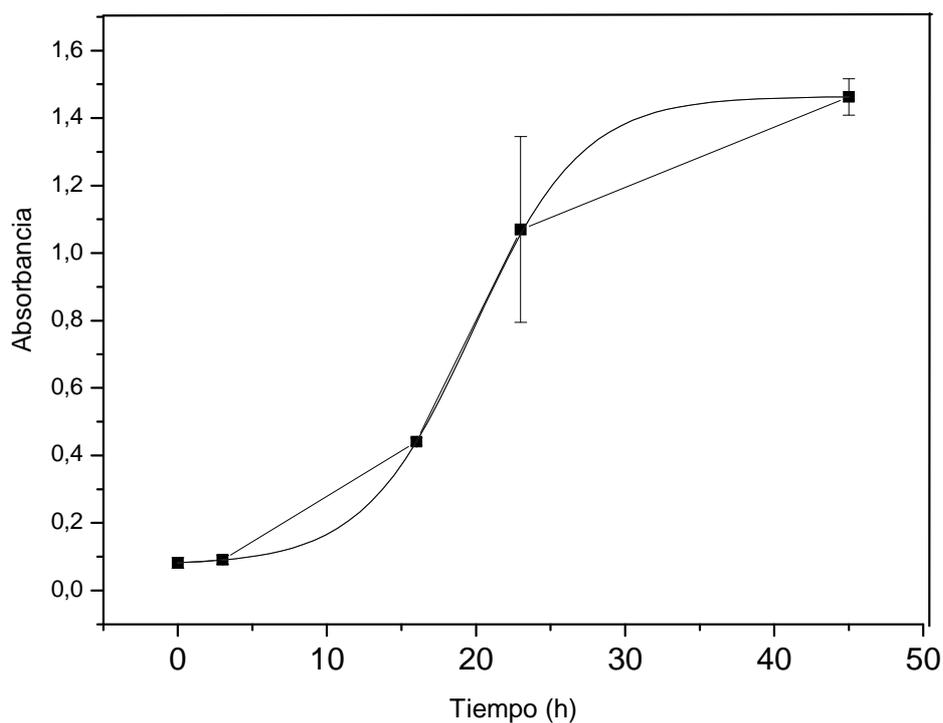


Figura 13. Curva de crecimiento de cepa *Saccharomyces cerevisiae* recombinante

Además, se realizaron cultivos en placas de la cepa (Figura 14a) y placas con 17- β -estradiol presente en el agar con el fin de activar la producción de β -galactosidasa de la cepa en la placa. La Figura 14b evidencia la presencia de esta enzima debido al cambio de color (crema - azul) que se visualiza en la placa. De esta forma se confirma que la cepa se encuentra en óptimas condiciones de crecimiento y de funcionamiento del sistema de activación de producción de β -galactosidasa.

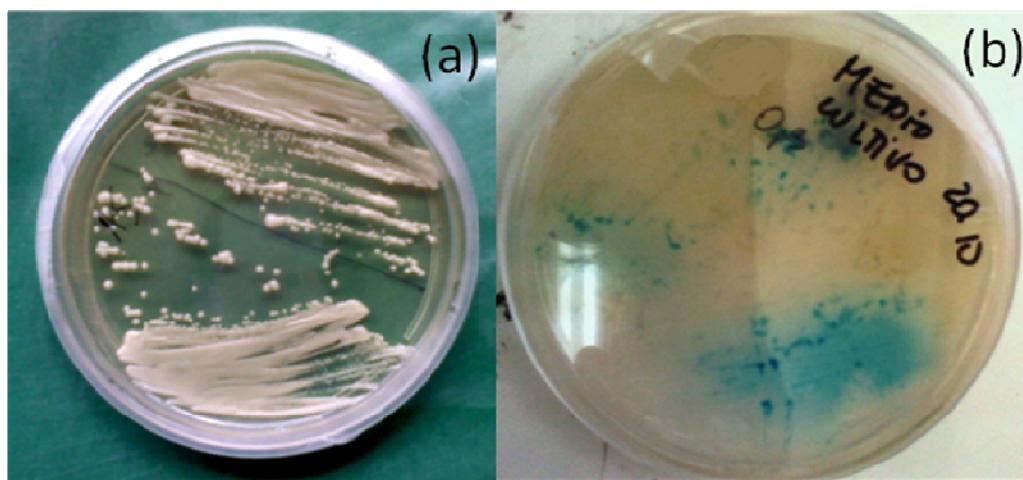


Figura 14. (a) Cultivo en placas de la cepa. (b) Ensayo con X-Gal

3.7. Realización del ensayo YES

3.7.1. Prueba de la cepa con patrones

El potencial estrogénico se puede determinar a través de la concentración efectiva 50 (EC₅₀) que representa el 50 % de la actividad estrogénica máxima del compuesto patrón. Por lo tanto, en primer lugar, se preparó una solución de concentración 54,49 µg/L de 17-β-estradiol como solución patrón. Y se llevó a cabo el ensayo YES de forma de conocer la sensibilidad de detección de éste y poder obtener el EC₅₀. En la Figura 15 se muestra un gráfico de un ensayo realizado en triplicado para el patrón donde los EC₅₀ obtenidos corresponden a 7,13E-9; 8,08E-9 y 9,08 E-9 µg/L y el promedio de éstos es 8,09E-9 µg/L.

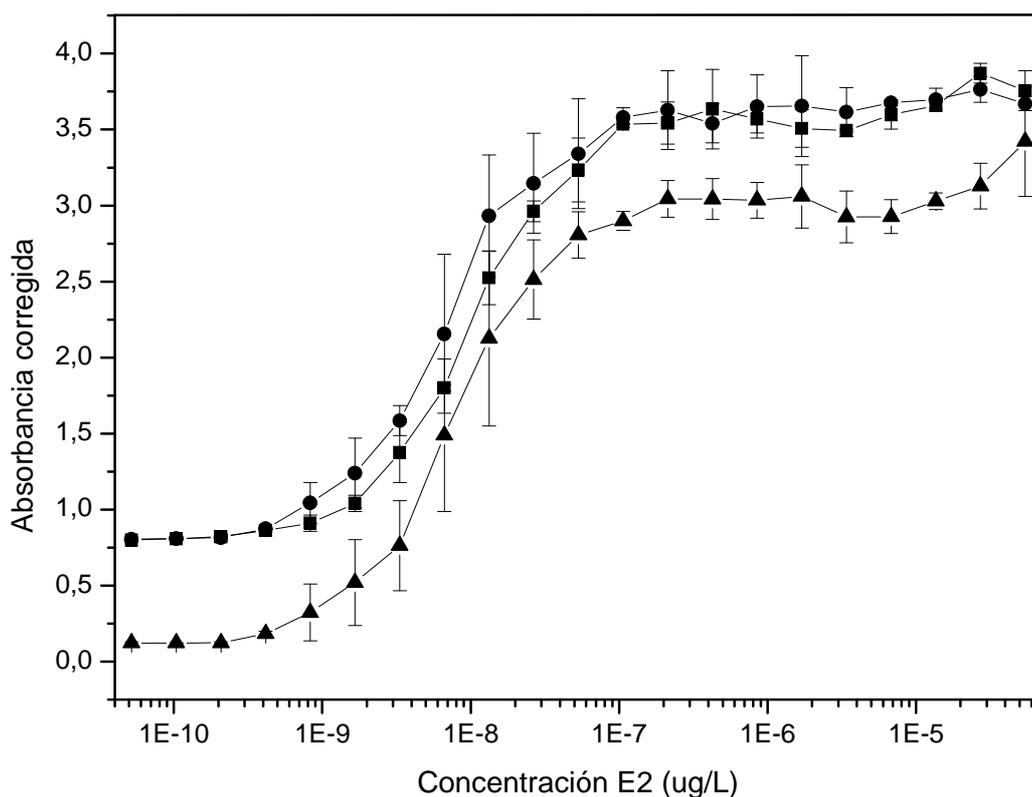


Figura 15. Curva patrón de ensayo YES

3.7.2. Ensayos de toxicidad de las muestras

Las muestras analizadas correspondieron a influente y efluente del reactor MBBR. Se analizó cada una de estas muestras tanto filtradas (F) por membranas de fibra de vidrio de 47 mm, como estas mismas luego de extracción en fase sólida (SPE).

Se realizó un ensayo de toxicidad para cada una de estas muestras, es decir, se evaluó si era compatible el ensayo YES con este tipo de muestra ya que podría existir algún compuesto en ésta que afectara el funcionamiento de la célula y no permitir la activación de la producción de β -galactosidasa para lo cual el ensayo no sería una herramienta válida para la determinación de disrupción endocrina. Para esto se realiza un ensayo con el patrón y se agrega en cada pocillo 10 μ l de la muestra en cada una de sus diluciones. Luego de 72 h se evalúa el comportamiento del patrón el cual debiera mantener el mismo comportamiento expresado en la Figura 15.

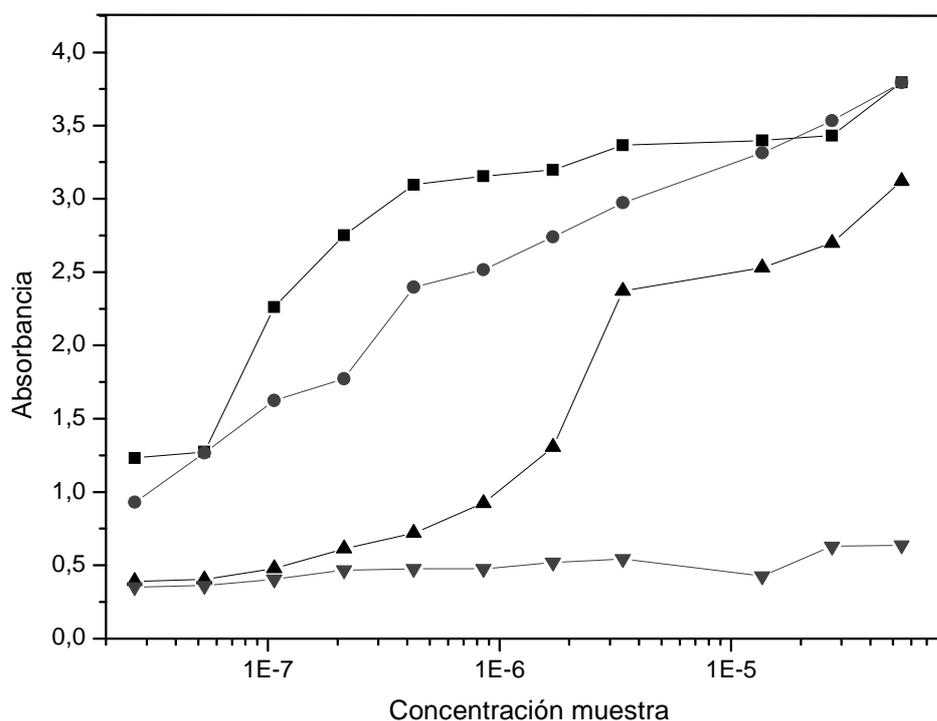


Figura 16. Curvas de toxicidad

Efluente (F) (■); Efluente (SPE) (○); Influyente (SPE) (▲); Influyente (F) (▼)

En la Figura 16, se muestran los resultados obtenidos. En este gráfico se observa que tanto el efluente (F), el efluente (SPE) y el influente (SPE) generan una respuesta positiva al ensayo logrando absorbancias máximas de entre 3 y 3,8. La muestra de influente (F), por otro lado, no presenta el mismo comportamiento y no se observa activación de la cepa por lo que se estima que ésta es tóxica para la cepa.

Otra forma de evaluar toxicidad es mediante la densidad óptica de cada uno de los pocillos de la microplaca a 570 nm, longitud de onda a la cual se evalúa el crecimiento de la levadura. Si éste fuera óptimo, el valor debería corresponder a 0,6 - 0,8. Como se indica en la Tabla 12, todas las muestras, excepto la muestra de influente (F) presentan un óptimo crecimiento. Resultado que confirma la toxicidad de esta muestra.

Tabla 12. Densidad óptica promedio de cada una de las muestras

	Densidad óptica 570 nm
Influente (F)	0,245 ± 0,184
Influente (SPE)	0,694 ± 0,103
Efluente (F)	0,767 ± 0,125
Efluente (SPE)	0,738 ± 0,101

3.7.3. Ensayos YES con muestras

Finalmente se desarrollaron los ensayos con muestras de Influyente (SPE) y Efluente (SPE). El ensayo con Influyente (SPE) presentó un EC_{50} de $0,038 \pm 0,0076$ lo que corresponde a $0,307$ ng/L Eq.EE2 (Figura 17)

El ensayo con Efluente (SPE) no presentó activación de la cepa por lo que no posee actividad estrogénica.

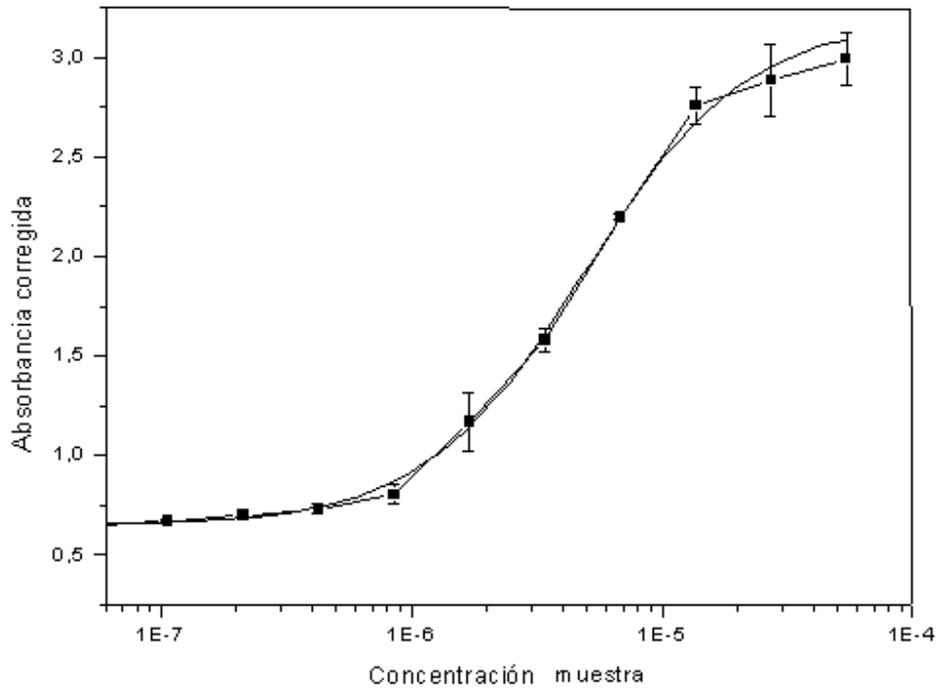


Figura 17. Ensayo con Influyente (SPE)

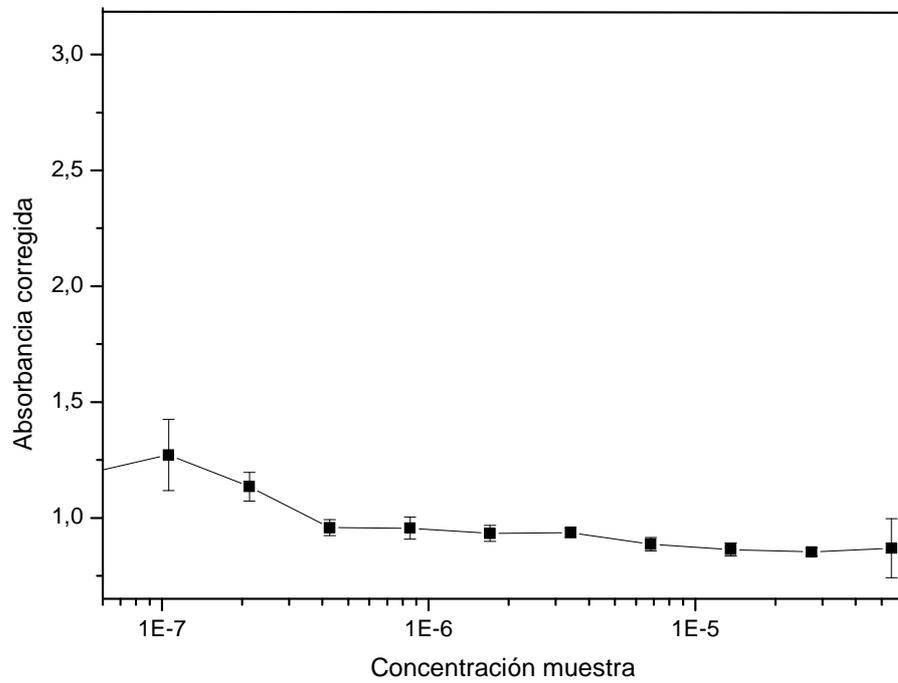


Figura 18. Ensayo con Efluente (SPE)

4. DISCUSION

4.1. Caracterización fisicoquímica del influente

La caracterización fisicoquímica del efluente de papelera se presenta en la Tabla 7. Se observa una concentración de materia orgánica de $2,97 \pm 0,62$ g/L y $1,67 \pm 0,13$ g/L para DQO y DBO₅ respectivamente, donde la DBO₅ corresponde a compuestos fácilmente biodegradables tales como carbohidratos y ácidos orgánicos (Diez y col., 2002). Valores similares se han obtenido en estudios realizados en efluentes de papelera con rangos de 0,83 - 2,50 g/L y 0,44 - 1,20 g/L para DQO y DBO₅, respectivamente (Jahren y col., 2002; Jarpa y col., 2012). Villamar y col., (2009) y Pozo y col., (2011) realizaron estudios con efluentes de celulosa kraft con *Pinus radiata* como materia prima registrando rangos de 0,54 - 2,12 g/L y 0,25 - 0,49 g/L, para DQO y DBO₅ respectivamente. En el caso de los fenoles totales, se registraron concentraciones entre 7,12 - 10,67 g/L, valores superiores a reportados por Jarpa y col., (2012) con promedios de 1,76 g/L y para efluentes de la industria de celulosa kraft, con rangos entre 0,24 - 0,72 g/L (Villamar y col., 2009; Chamorro y col., 2010). Además se determinó la relación DBO₅/DQO, indicador de biodegradabilidad del efluente, correspondiendo a 0,56, indicando que el efluente es altamente biodegradable. Mientras que efluentes de celulosa kraft presentan relaciones de 0,20 - 0,33, lo cual indica presencia de una mayor concentración de compuestos recalcitrantes como, por ejemplo, compuestos aromáticos de alto peso molecular, tales como lignina y derivados de ésta (Diez y col., 2002; Villamar y col., 2009). Finalmente se determinó concentración de nutrientes como NT y PT, presentando concentraciones de 9,67 mg/L y 5,45 mg/L, obteniendo una relación de nutrientes de 100:0,57:0,33. Relación de nutrientes inferior a la relación óptima recomendada por Diez y col., 2002 para obtener una óptima eliminación de materia orgánica (100:5:1).

4.2. Operación del reactor continuo MBBR

4.2.1. Parámetros operacionales y de eficiencias de eliminación de materia orgánica y compuestos fenólicos

En la Tabla 9, se indican las distintas VCO, TRH y relación de nutrientes evaluadas en este estudio. La Figura 7 muestra las condiciones operacionales del reactor durante los 167 días de operación tales como pH y OD. La concentración de OD se mantuvo en el rango de $5,13 \pm 0,70$ mg O₂/L para VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y 2,67 kg DBO₅/m³·d, operando bajo la relación óptima de nutrientes 100:5:1. Mientras que, para relación deficiente de nutrientes de 100:1:0,3, registró valores de $6,65 \pm 0,86$ mg O₂/L. La concentración sugerida para sistemas MBBR, corresponde a concentraciones superiores a 3 mg O₂/L de manera de asegurar la mezcla completa del reactor e intercambio de oxígeno en la biopelícula (Rusten y col., 2006). Por otro lado, el pH del influente se mantuvo constante entre 7,44 - 7,65 y el efluente disminuyó al ingresar una VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d, sin embargo fue estabilizado para mantener un rango de pH entre 6 – 8 y asegurar una eficiente eliminación de materia orgánica. Diez y col., (2002) evaluó la eficiencia de eliminación de materia orgánica a diferentes pH (4, 7 y 10) obteniendo una actividad óptima de los microorganismos a pH 7, ya que ante cambios bruscos de pH éstos son inhibidos produciendo una pérdida de actividad biológica.

En la Figura 8, se muestran los parámetros de eficiencia de eliminación de materia orgánica en el MBBR durante las distintas VCO y relación de nutrientes en estudio. Las máximas eficiencias de eliminación se obtuvieron a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y una relación de nutrientes de 100:5:1. Con valores máximos de 79,22% y 97,01% para DQO y DBO₅, respectivamente. Eficiencia en eliminación relacionadas con la actividad heterótrofa de la biomasa en un inicio, la cual correspondió entre 0,3 – 0,4 mgO₂/g SSV·d. Jarpa y col., (2012) operó un sistema MBBR obteniendo máximas eficiencias de 64,99% y 98,78% para DQO y DBO₅ con VCO de 2,99 DBO₅/m³·d y 0,13 kg DBO₅/m³·d. Villamar y col., (2009) obtuvieron eficiencias similares utilizando efluentes de celulosa kraft con eficiencias de 52,20 % y 98,50% para DQO y DBO₅ con

VCO de 0,14 kg DBO₅/m³·d, respectivamente. A medida que se aumentó la VCO a 2,83 kg DBO₅/m³·d y se disminuyó el TRH de 48 a 14 horas, las eficiencias disminuyeron a valores de 74,59% y 91,9% para DQO y DBO₅, respectivamente. Odegaard y col., (2006) menciona que la disminución en eficiencia de eliminación de materia orgánica, puede ser debido a disminución en TRH, donde compuestos orgánicos de difícil biodegradación no logran ser hidrolizados por los microorganismos. Por otro lado, se atribuye la disminución en la eficiencia al cambio de relación de nutrientes desde 100:5:1 a 100:1:0,3, obteniendo en esta última máximas eficiencias de 68,06% y 84,6% para DQO y DBO₅, respectivamente. Diez y col., 2002 evidenció que una baja relación de nutrientes afecta al crecimiento de los microorganismos y por otro lado, favorece el crecimiento de organismos de tipo filamentosos favoreciendo el bulking en el reactor.

La degradación de fenoles alcanzó un máximo valor de 41,21% a 100:5:1 y VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d, disminuyendo a valores de 14,82% con VCO de 2,67 kg DBO₅/m³·d y 16,94% con VCO de 2,83 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes 100:1:0,3. Este comportamiento se encuentra directamente asociado a la disminución de la eficiencia de eliminación de DQO en las correspondientes etapas. Chamorro y col., (2010) presenta el mismo comportamiento de disminución de eficiencia al disminuir el TRH, con eficiencias de 16,5 % a para un TRH de 48 h, 6,46% con TRH de 24 h y 4,2% con TRH de 12 h atribuyendo esta tendencia a que la biomasa no logra adaptarse para la degradación de fenoles totales en menores TRH.

El comportamiento del ratio DBO₅/DQO del efluente fue de 0,20 , 0,21 y 0,37 a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d, 2,67 kg DBO₅/m³·d y 2,83 kg DBO₅/m³·d, respectivamente aumentando a medida que disminuía el TRH (Tabla 9).

4.2.2. Evolución de la biomasa durante la operación del reactor

La evolución de la biomasa se evaluó mediante una caracterización de la biomasa suspendida y adherida al interior del MBBR. Para lo cual se evaluó el IVL (índice volumétrico del lodo) y la relación alimento/microorganismo (A/M) (Figura 9). A una VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y TRH de 48h se logró un rango óptimo con características

de lodo floculento en un rango de 0,52 – 0,58 g DBO₅/g SSV·d y 53,95 – 149,68 ml Sol. sed/g SSV. Sin embargo, al aumentar la VCO a 2,67 kg DBO₅/m³·d con un TRH de 14 h se generó una tendencia a la proliferación de bacterias filamentosas y por lo tanto un lodo inflado, con baja sedimentabilidad (0,54 – 0,63 g DBO₅/g SSV·d y 105,26 – 128 ml Sol. sed/g SSV), la cual se mantuvo durante la relación de nutrientes 100:1:0,1 y VCO de 2,83 kg DBO₅/m³·d en rangos de 0,58 – 0,69 g DBO₅/g SSV·d 17,85 – 145,98 ml Sol. sed/g SSV. El IVL se relaciona a la sedimentabilidad del lodo y su relación a la concentración de SSV en el MBBR el cual se encuentra en un rango óptimo entre 35 – 135 ml de sólidos sedimentados/g SSV, valores superiores a estos, son indicadores de presencia de bacterias filamentosas (Ramalho, 1996). Por otro lado, la relación A/M indica requerimientos nutricionales de los microorganismos. Esta debe encontrarse entre el rango 0,15 - 0,4 kg DBO₅/kg SSV (Metcalf y Eddy, 1995). Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que la evolución de la biomasa no fue la óptima, explicando la disminución en eficiencia de eliminación de materia orgánica del MBBR bajo VCO de 2,83 kg DBO₅/m³·d. Estudios previos realizados por Villamar y col., (2009) obtuvieron biomasa de características floculentas con VCO de 0,14 kg DBO₅/m³·d, 0,25 kg DBO₅/m³·d y 1,09 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes de 100:5:1 y 100:1:1. Por otro lado, Jarpa y col., (2012) obtuvo un lodo de características floculentas a una VCO de 2,36 kg DBO₅/m³·d y 2,99 kg DBO₅/m³·d.

Se evaluó la diversidad biológica presente en el reactor, encontrando presencia de protozoos. Ferrer y Seco, (2008) mencionan que estos corresponden al 5% de la biomasa presente en un reactor aerobio. Organismos que se caracterizan por crecer a temperaturas entre 15 a 25 °C, pH de 7,2 - 7,4 y tolerancia en un rango de 6,0 - 8,0, lo cual son indicadores de buena calidad del lodo. Encontrando en este estudio cuatro grupos de protozoos: flagelados, amebas, ciliados fijos (Figura 10i, 10e) y ciliados nadadores libres (Figura 10d, 10g) que proporcionan microagitación ayudando al suministro de nutrientes al flóculo (Ferrer y Seco, 2008). También se encontraron rotíferos y nemátodos quienes se encuentran en la cima de la pirámide trófica. Los rotíferos son organismos aerobios multicelulares que requieren de más tiempo para

estabilizarse en el proceso de tratamiento, por lo tanto son indicadores de un lodo estable (Figura 10c,10f y 10h).

4.2.3. Acumulación de PHAs

Se determinó el porcentaje de células que acumularon PHAs bajo distintas VCO y relación de nutrientes (Figura 11). Se observó que el porcentaje de células que acumularon PHAs se mantuvo estable en las tres etapas, con valores promedio de 88,11%, 73,09 % y 75,41% para VCO de 0,81 kgDBO₅/m³·d, 2,67 kgDBO₅/m³·d y 2,83 kgDBO₅/m³·d, respectivamente. El mayor porcentaje de acumulación, se observa a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d correspondiente a una relación de nutrientes 100:5:1 y TRH de 48 h. Esto es atribuible a las características de la biomasa la cual corresponde a un lodo floculento. Estudios previos, indican que la producción de PHAs ha sido obtenida con biomasa de características floculentas (Beccari y col., 1998; Bengsston y col., 2008). Resultado similar a lo obtenido por Jarpa y col., (2012) donde se obtuvo 85,4% de células que acumulan PHAs con una relación de nutrientes 100:5:1 y VCO de 2,99 kg DBO₅/m³·d en un sistema MBBR tratando efluente de papeleras con *Pinus radiata* como materia prima. La estabilidad en el porcentaje de células acumuladoras de PHAs en las distintas VCO se relacionó a la concentración de SSV, la cual también se mantuvo estable a lo largo de la operación del reactor (2,63 – 3,02 g SSV/L). Esto se relaciona además, con los resultados obtenidos mediante el recuento de células vivas/muertas donde la concentración de éstas se mantuvo en las distintas etapas con valores de $1,16 \times 10^8$ bact/ml, $6,20 \times 10^8$ bact/ml y $6,20 \times 10^8$ bact/ml células vivas y $2,72 \times 10^8$ bact/ml, $9,7 \times 10^8$ bact/ml y $7,37 \times 10^8$ bact/ml células totales. Bengsston y col., (2008) evaluó la acumulación de PHAs ante exceso y limitación de nutrientes, limitación. Obteniendo mayor acumulación de PHAs en limitación de N y P (43 – 48 % peso seco del lodo) ya que ante un exceso de nutrientes se aumenta el consumo de ácidos grasos volátiles favoreciendo el crecimiento de una mayor concentración de microorganismos. Ante una limitación de nutrientes como N y P, se mantiene estable la concentración de biomasa activa . La misma conclusión reportó Wen y col., (2010) con una acumulación de 59 % peso seco del lodo con un radio C:N de 125. Yan y col., (2008) utilizó lodos de la

industria papelera y evaluó la acumulación de PHAs bajo distintas concentraciones de lodo y de acetato como sustrato, obteniendo máximas de acumulación de 39,60% en peso seco del lodo.

La Figura 12 indica la cantidad de PHAs acumulados al interior de la célula a distintas VCO y relación de nutrientes. Gorenflo y col., (1999) y Wu y col., (2003) mencionaron que existe una correlación entre intensidad de fluorescencia y cantidad de poly(3HB) a una longitud de onda de excitación de 550 nm y una longitud de onda de emisión entre 530 y 650 nm. Observando que la mayor intensidad de fluorescencia se obtuvo, en este estudio, a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes 100:5:1 con un valor promedio de 122,68. A una VCO de 2,67 kg DBO₅/m³·d y manteniendo la relación de nutrientes, disminuyó hasta intensidades de fluorescencia 31,43 y finalmente al disminuir la relación de nutrientes a 100:1:0,3 y mantener una VCO en 2,83 kg DBO₅/m³·d, se obtiene una intensidad de fluorescencia promedio de 30,16. Este comportamiento puede ser relacionado a la disminución en el TRH y por consiguiente el aumento de la VCO. Dias y col., (2006) indicó que la acumulación de PHAs se relaciona a las condiciones operacionales del sistema tales como VCO, relación C:N, pH, OD y concentración de sustrato.

La optimización de producción de PHAs en sistemas aeróbicos puede realizarse mediante la exposición de éste a etapas de exceso y escasas de alimento e intervalos anaerobios-aerobios para permitir la selección de un cultivo enriquecido con una alta capacidad de acumular PHAs. Es por esto, que en múltiples estudios realizan etapas de fermentación acidogénica para la generación de ácidos grasos volátiles, sistemas batch y luego lodos activados (Dias y col., 2006; Bengsston y col., 2008; Yan y col., 2006, 2008).

4.3. Incidencia del tratamiento MBBR sobre la eliminación de disrupción endocrina en efluentes de papelera.

Previo a la realización del ensayo YES, se evaluaron las condiciones en que se encontraba la cepa *S. cerevisiae* recombinante. Se realizó una curva de crecimiento de 48 h obteniendo una curva sigmoideal con un crecimiento óptimo a 19,78 h (Figura 13).

El ensayo con X-Gal permitió verificar el funcionamiento de la cepa y la expresión de β -galactosidasa en presencia de 17- β -estradiol (Figura 14b). La Figura 16 muestra los resultados obtenidos de ensayos de toxicidad de las muestras, donde el influente filtrado con filtros de fibra vidrio de 47 mm resulta ser tóxico, por lo que no es posible realizar el ensayo YES con esta muestra ya que se obtendrían falsos negativos. Es por esto que los ensayos fueron realizados con las muestras pasadas por extracción en fase sólida. Finalmente se realizó una curva en triplicado con el patrón (17- β -estradiol) de forma de obtener el EC₅₀ del compuesto, obteniendo un valor promedio de 8,09E-9 μ /L, el cual es similar al obtenido por Routledge y Sumper, (1995) de 3,12E-09 μ /L.

Mediante el ensayo YES se obtuvo que el influente de papelera presenta actividad estrogénica con un valor de 0,307 Eq. E2 ng/L, este influente al ser tratado biológicamente mediante tratamiento en base a MBBR con un TRH de 48 h y VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d, se observa que se elimina la actividad estrogénica. Estos resultados concuerdan con lo expresado por Hamm y col., (2006) quien observa actividad estrogénica en 10 de 16 industrias papeleras. Los valores obtenidos fueron expresados en tasa de inducción de β -galactosidasa en rangos de 0,75 – 2,8 asociando esta actividad a fitohormonas propias de la madera.

Por otro lado, Chamorro y col. (2010), evidencian actividad estrogénica en efluentes de celulosa Kraft con valores de 0,123 – 0,411 Eq. EE2 ng/L, el cual al ser tratado mediante un sistema MBBR y un TRH de 48 y 24 h con VCO de 0,25 g DQO/L·d ocurre una reducción de la actividad en un 80 - 83 %, basado en materia prima de *Pinus radiata* y de un 100 % con un TRH de 12 h y VCO de 1,02 g DQO/L·d.

Fernández y col., (2007), por su parte evidenció actividad estrogénica en efluentes de celulosa kraft de Canadá, con valores en el orden de 42–83 Eq. EE2 ng/L, valores superiores a los observados en esta investigación y a los encontrados por Chamorro y col. (2010). Igualmente, experimentos realizados por Orrego y col. (2009), sobre efluentes de celulosa kraft no tratados y con tratamiento con *Oncorhynchus mykiss*, evidencia que los sistemas de tratamientos secundarios implementados en Chile, reducen la actividad estrogénica presente.

Se podría inferir que dado el carácter hidrofóbico de los compuestos presente en efluente de celulosa (compuestos extractivos) la actividad estrogénica quede acumulada en la biomasa presente en MBBR tal como lo menciona Chamorro y col. (2010).

5. CONCLUSIONES

El sistema MBBR obtuvo máximas eficiencias de eliminación de materia orgánica de 79,22% y 97,01% de DQO y DBO₅ a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes de 100:5:1.

La máxima acumulación de PHAs se obtuvo a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d y relación de nutrientes de 100:5:1 con porcentajes de células que acumularon PHAs de 88,11% ± 6,34 e intensidades de fluorescencia de 122,68 ± 47,77. No hubo diferencias significativas al cambiar la relación de nutrientes de 100:5:1 a 100:1:0,3.

Los valores máximos de células que acumularon PHAs se obtuvieron en características de lodo floculento.

Los compuestos extraíbles de la madera presentes en efluentes de papelera, generan actividad estrogénica de 0,307 Eq. E2 ng/L, la cual es posible de ser eliminada por un sistema MBBR a VCO de 0,81 kg DBO₅/m³·d.

Por lo antes expuesto, se rechaza la hipótesis, ya que la mayor acumulación de PHAs se obtuvo en una relación óptima de nutrientes (100:5:1) y no deficiente (100:1:0,3) como se esperaba. Sin embargo, se observó que este tipo de tratamiento es eficiente en la eliminación de actividad estrogénica del efluente.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a la Dra. Gladys Vidal, por la paciencia y el apoyo brindado durante la realización de esta tesis y a la candidata a Doctor en Ciencias Ambientales, Mayra Jarpa por su apoyo fundamental para el desarrollo de esta tesis, por estar siempre dispuesta a ayudarme, sus constantes sugerencias y enseñanzas a lo largo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Producción Limpia, por el 2° lugar obtenido en la cuarta versión del Concurso de Tesis en Producción Limpia de la Región del Biobío.

A Papeles Rio Vergara S.A. por facilitar el influente utilizado durante esta tesis.

Al Dr. Victor Hernandez del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas por su disposición en el análisis de muestras.

A la Dra. Marta Bunster del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas. Al Dr. Miguel Martinez del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas y al Dr. Osvaldo Ulloa del Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas por facilitar la infraestructura de sus respectivos laboratorios en mediciones de PHAs.

Finalmente a los miembros del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental (GIBA) del Centro EULA, quienes me acompañaron y apoyaron en todo momento.

7. BIBLIOGRAFIA

-Ali, M. y Sreekrishnan, T. (2001) Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Adv. Environ. Res.*, 5: 175-196.

-APHA. (1998). *Standard Methods, Examination of Water and Wasterwater* 20th Ed. Washington,D.C.

-Auriol, M., Filali-Meknassi, y., Tyagi, R., Adams, C. y Surampalli, R. (2006) Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochem.* 41: 525-539.

-Beccari, M., Majone, M., Massanisso, P., Ramadori, R. (1998) A bulking sludge with high storage response selected under intermittent feeding. *Water Res.*, 32: 3403-3413.

-Belmonte, M., Xavier, C., Decap, J., Martinez, M., Sierra-Alvarez, R. y Vidal, G. (2005) Improved aerobic biodegradation of abiético acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation. *J. Hazard Mater.* 135: 256-263.

-Bengston, S., Werker, A., Christensson, M. y Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technol.* 99: 509-516.

-Birkett, J. y Lester, J. (2003) *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. IWA Publishing and Lewis Publishers, Washington D.C. 295 pp.

-Brix, R., Noguerol, T., Piña, B., Balaam, J., Nilsen, A., Tollefsen, K., Levy, W., Schramm K. y Barceló, D. (2010) Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environ. Int.* 36: 361–367.

-Chamorro, S., Xavier, C., Hernández, V., Becerra, J. y Vidal, G. (2009) Aerobic removal of stigmasterol contained in kraft mill effluents. *Electron. J. Biotechnol.* 12 (2): 1–7.

-Chamorro, S., Hernández, V., Monsalvez, E., Becerra, J., Mondaca, M.A., Piña, B. y Vidal, G. (2010) Detection of estrogenic activity from kraft mill effluents by the yeast estrogen screen. *B. Environ. Contam. Tox.* 84: 165-169.

- Chanprateep, S. (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.* 110: 621-632.
- Chen, G.Q.(2010) *Plastics from Bacteria, Natural Functions and Applications* (Steinbüchel, A.), Springer, 446 pp.
- Chiang, G., McMaster, M.E., Urrutia, R., Saavedra, M.F., Gavilán, J.F., Tucca, F., Barra, R. y Munkittrick, K. R. (2011) Health status of native fish (*Percilia gillissi* and *Trichomycterus areolatus*) downstream of the discharge of effluent from a tertiary-treated elemental chlorine-free pulp mill in Chile. *Environ. Toxicol. Chem.* 30(8): 1793-809.
- Consejo Nacional de Producción Limpia. (2005) Diagnostico sectorial sector industria del papel.
- Cook, D. L., LaFleur, L., Parrish, A., Jones, J. and Hoy, D. (1997) Characterization of plant sterols from 22 US pulp and paper mills. *Water Sci. Technol.* 35: 297-303.
- Declaración de Impacto Ambiental (2005) “Modificación tratamiento del efluente de procesos de Papeles Norske Skog Bio Bio Limitada” Anexo 6.2.
- Del Río, J., Romero, J. y Gutiérrez, A. (2000) Analysis of pitch deposits produced in Kraft pulp mills using a totally chlorine free bleaching sequence. *J. Chromatogr. A*, 874: 235–245.
- Dias, J., Lemos, P., Serafim, L., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M., Ramos A., Oliveira R. & Reis, M. (2006) Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.* 6 (11): 885-906.
- Diez, M. C., Castillo, G., Aguilar, L., Vidal, G. y Mora, M. L. (2002) Operational factors and nutrients effect on activated sludge treatment for phenolic compounds degradation from Pinus radiate kraft mill effluents. *Bioresour. Technol.* 83: 132-138.
- Diniz, M., Peres, I., Magalhaes-Antoine, I., Falla, J. y Pihan, J. (2005) Estrogenic effects in crucian carp (*Carassius carassius*) exposed to treated sewage effluent. *Ecotox. Environ. Safe.* 62: 427-435.

- Dorado, J., Claassen, F., Van Beek, T., Lenon, G., Wijnberg, J. y Sierra-Alvarez, R. (2000) Elimination and detoxification of softwood extractives by white-rot fungi. *J. Biotechnol.* 80: 231-240.
- EPA. (1993) Systematics, ecology, life history and culture methods *Daphnia* (*D. pulex* and *Ceriodaphnia*). 131-147.
- Fernández, M., Ikonomu, M. y Buchanan, I. (2007) An assessment of strogenic organic contaminants in Canadian wastewater. *Sci. Total Environ.* 373: 250-269.
- Ferrer, J., Seco, A. (2008) Tratamientos biológicos de aguas residuales. Alfaomega grupo editor, 184.
- Frigon, J., Stephenson, R., Larabeé, S. y Guiot, S. (1999) Biotreatment of resina cid by coupled anaerobic/aerobic integrated system. *Pulp Pap-Canada.* 100: 131-134.
- Gayford, C. & Richards, J. (1970) Isolation and enumeration of aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. *J. Appl. Bactriol.* 33 (2): 342-350.
- Geyer, H., Rimkus, G., Scheunert, I., Kaune, A., Schramm, K., Kettrup, A., Zeeman, M., Hansen, L. y Mackay, D. (2000) Bioaccumulation and Occurrence of Endocrine- Disrupting Chemicals (EDCs), Persistent Organic Pollutants (POPs), and Other Organic Compounds in Fish and Other Organisms Including Humans. *The Handbook of Environmental Chemistry. Vol. 2 Part J.*
- Godoy, F., Bunster, M., Matus, V., Aranda, C., Gónzalez, B. y Martínez, M. (2003) Poly-b-hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 315-320.
- Gorenflo, V., Steinbuchel, A., Marose, S., Rieseberg, M. and Scheper, T. (1999) Quantification of bacteria polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 765-772.
- Gutiérrez, A., Del Río, J., González-Vila, F. y Martín, F. (1998) Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 823: 449-455.
- Gutiérrez, A., Del Río, J., Rencores, J., Ibarra, D. y Martínez, A. (2006) Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase–mediator system *Appl. Microbiol. Biot.*, 72: 845-851.

-Guzmán, C. y Zambrano, E. (2007) Compuestos disruptores endocrinos y su participación en la programación del eje reproductivo. *Revista de investigación clínica*. 59: 73-81.

-Hamm, U., Schabel, S. y Oeller, H. (2006) Comparison of the endocrine effects of treated waste waters from different paper mills by use of an in-vitro test with modified yeast cells. *Fate and effects of pulp and paper mill effluents Vitoria-Espírito Santo (Brasil)*. 9-12 de Abril.

-Hewitt, L., Parrot, J., Weells, K., Calp, M., Biddiscombe, S., McMaster, M., Munkittrick, K. y Van Der Kraak, G. (2000) Characteristics of ligands for the Ah receptor in hepatic tissues of fish exposed to bleached Kraft mill effluent. *Environ. Sci. Technol.* 34: 4327-4334.

-Hewitt, L., Pryce, A., Parrott, J., Marlatt, V., Wood, C., Oakes, K. y Van Der Kraak, G. (2003) Accumulation of ligands for aryl hydrocarbon and sex steroid receptors in fish exposed to treated effluent from a bleached sulfite/groundwood pulp and paper mill. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2890-2897.

-Hewitt, L., Kovacs, T., Dubé, M., Maclatchy, D., Martel, P., McMaster, M., Paice, M., Parrot, J., Van Den Heuvel, M. y Van Der Kraak, G. (2008) Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: roles of individual compounds and mill operating conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (3): 682-697.

-INFOR. (2007) Análisis de la cadena productiva de la celulosa y el papel en países de ALC a la luz de los objetivos de desarrollo sostenible, su relación con los compromisos comerciales (OMC y TLCs) y ambientales (AMUMAs). *Estudio de Caso Chile*. Disponible en: <www.infor.cl> Acceso en 10 nov. 2007.

-Jarpa, M., Pozo, G., Baeza, R., Martínez, M., Vidal, G. (2012) Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor. *J. Environ Sci Heal.* (Accepted).

-Jarhen, S., Rintala, J. y Odegaard, H. (2002) Aerobic moving bed biofilm reactor treating thermomechanical pulping whitewater under thermophilic conditions. *Water Res.* 36: 1067-1075.

-Johnsen, K., Tana, J., Lehtinen, K., Stuthridge, T., Mattsson, K., Hemming, J. y Carlberg., G. (1998) Experimental field exposure of brown trout to river water receiving effluent from an integrated newsprint mill. *Ecotox. Environ. Safe*, 40: 184-193.

-Johnsen, K., Grotell, C., Tana, J. y Carlberg, E. (2000) Impact of mechanical pulp mill effluent on egg hatchability of brown trout. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 64: 873-879.

-Kamaya, Y., Tokita, N. and Suzuki, N. (2005) Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe*. 61: 83–88.

-Keshavarz, T. y Roy, I. (2010) Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Ecol Ind Microbiol*, 13: 321-326.

-Khan, Z. y Hall, E. (2003) Occurrence and removal of plant sterol in pulp and paper mill effluents. *J. Eng. Env. Sci.* 2: 16-17.

-Kiparissis, Y, Hudges, R., Metcalfe, C y Ternes, T. (2003) Identification of the isoflavonoid genistein in bleached kraft mill effluent. *Environ. Sci. Technol.* 35: 2423-2427.

-Kostamo, A., Holmbom, B. y Kukkonen, J.V.K. (2004) Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mills and mechanical pulp mills. *Water Res.* 38: 972-982.

-Lacorte, S., Latorre, A., Barcelo, D., Rigol, A., Malmqvist, A. y Welander, T. (2003) Organic compounds in paper-mill process Waters and effluents. *Trac-Trend Anal. Chem.* 22: 725-737.

-LaFleur L. E. (1996) Sources of pulping and bleaching derived chemical in effluents. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, M. R., (Eds.), St Lucie Press, Delray Press, FL., 21-31 pp.

-Lahdelma, I. y Oikari, A. (2005) Resin acids and retene in sediments adjacent to pulp and paper industries. *J. Soils Sed.* 5: 74-81

-Latorre, A., Rigol, A., Lacorte, S. y 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 waters. *J. Chromatogr. A.* 991: 205-215.

-Latorre, A., Malmqvist, A., Lacorte, S., Welander, T. y Barceló, D. (2007) Evaluation of the treatment efficiencies of paper mill whitewaters in terms of organic composition and toxicity. *Environ. Pollut.* 147: 648-655.

-Lopez, D., Chamorro, S., Silva, J., Bay-Smith, E., Vidal, G. (2011) Chronic Effects of *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* Kraft mill effluents and phytosterols on *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Toxicol.* 87: 633-637.

-Magnus, E, Hoel, H y Carlberg, G. (2000) Treatment of an NSSC effluent in a biological high-efficiency compact reactor. *Tappi J.* 83(1): 149-56.

-McMaster, M., Van Der Kraak, G., Portt, C., Munkittrick, K., Sibley, P., Smith, I. y Dixon, D. (1991) Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached Kraft pulp mill effluents. *Aquat. Toxicol.* 21: 199-218.

-Metcalf y Eddy (1995) *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse*, McGraw-Hill, New York.

-Mosquera-Corral, A., González, F., Campos, J., y Méndez, R. (2005). Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochem.* 40: 3109-3118.

-Nelson, D. y Cox, M. (2005) *Principios de la Bioquímica.* (Freeman, W. H.) Omega, 1119 pp.

-Noguerol, T., Boronat, S., Casado, M., Raldúa, D., Barceló, D. y Piña, B. (2006) Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal. Bioanal. Chem.* 385: 1012-1019.

-Odegaard, H. (2000) Advanced compact wastewater treatment based on coagulation and moving bed biofilm processes. *Water Sci. Technol.* 42: 33-48.

-Odegaard H. (2006). Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm process. *Water Sci. Technol.* 53 (9): 17-33.

- Orrego, R., Guchardi J. y Hernandez, V. (2009) Pulp and paper mill effluent treatments have differential endocrine-disrupting effects on rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 181-188.
- Orrego, R., Guchardi, J., Krause, R. y Holdway, D. (2010) Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 99: 160-167.
- Pokhrel, D. y Viraraghavan, T. (2004) Treatment of pulp and paper mill wastewater- a review. *Sci. Total Environ.* 333: 37-58.
- Pozo, G., Villamar, A., Martínez, M. & Vidal, G. (2011) Polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis from kraft mill wastewaters: biomass origin and C:N relationship influence. *Water Sci. Technol.* 63: 449-455.
- Ramalho, R.S. (1996). Tratamiento de aguas residuales. Reverte S.A., 705 pp.
- Rintala, J. y Puhakka, J. (1994) Anaerobic treatment in pulp and paper mill-waste management: a review. *Bioresource Technol.* 47: 1-18.
- Rosa, R., Moreira-Santos, M., Lopes, I., Silva, L., Rebola, J.,Mendonça, E., Picado, A. y 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. *Environ. Monit. Assess.* 161 (1-4): 439-451.
- Routledge, J. y Sumpter, J. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 241-248.
- Salomé, J. y Goikoetxea, A. (2006) Gestión del agua en la industria papelera. *Revista Virtual*, 58: 21.
- Schnell, A., Steel, P., Melcer, H., Hodson, P. y Carey, J. (2000) Enhanced biological treatment of bleached kraft mill effluents: I. Removal of chlorinated organic compounds and toxicity. *Water Res.*, 34 (2): 493-500.
- Silva, J., Tobella, L., Becerra, J., Godoy, F. & Martinez M. (2007) Biosynthesis of Poly- β - Hydroxyalkanoate by *Brevundimonas vesicularis* LMG-23615 and *Sphingopyxis macrogoltabita* LMG 17324 using Acid – Hydrolysed Sawdust as Carbon source. *J. Biosci. Bioeng.* 103: 542-546.

-Spiekermann, P., Rehm, B., Kalscheuer, R., Baumeister, D. & Steinbuchel, A. (1999). A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch. Microbiol.* 171: 73-80.

-Stuthridge, T., Campin, D., Langdon, A., Mackie, K., Mcfarlange, P. y Wikins, A. (1991) Treatability of bleached kraft pulp and paper mill wastewaters in a New Zealand aerated lagoon treatment system. *Water Sci. Technol.* 24: 309-17.

-Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T. y Matsuo, T. (2002) PHA (polyhydroxyalkanoate) production potential of activated sludge treating wastewater. *Water Sci. Technol.*, 45: 119-126.

-Thompson, G., Swain, J. y Forster, M. (2001) The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Technol.* 77: 275-286.

-Tobella, L., Bunster, M., Pooley, A., Becerra, J., Godoy, F., Martinez, M. (2005) Biosynthesis of poly-beta-hydroxyalkanoates by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Wautersia* sp PZK cultured in cellulose pulp mill effluents containing 2,4,6-trichlorophenol. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 32: 397-401.

-Van Den Heuvel, M. R., Ellis, R. J., Tremblay, L. A. y Stuthridge, T. R. (2002) Exposure of reproductive maturing rainbow trout to a New Zeland pulp and paper mill effluent. *Ecotox. Environ. Safe.* 51: 65-75.

-Villamar, C., Jarpa, M., Decap, J. y Vidal, G. (2009) Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* as raw material *Water Sci. Technol.* 59: 507-514.

-Wang, F. y Lee, S. (1997) Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* 63: 4765-4769.

-Welander, T., Lofqvist, A. y Selmer, A. (1997) Upgrading aerated lagoons at pulp and paper mills. *Water Sci. Technol.* 35: 117-22.

-Wu, H., Sheu, D. and Lee, C. (2003). Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *J. Microbiol. Method.* 53: 131-135.

-Xavier, C., Chamorro, S. y Vidal, G. (2005) Chronic effects of kraft mill effluents and endocrine active chemicals on *Daphnia magna*. *B. Environ. Contam. Tox.* 75: 670-676.

-Xavier, C., Mosquera, A., Becerra, J., Hernández, V. y Vidal, G. (2009) Activated sludge versus aerated lagoon treatment of kraft mill effluents containing β -sitosterol and stigmasterol. *J. Environ. Sci. Heal. A.* 44: 327-335.

-Yan, S., Tyagi, R. and Surampalli, R. (2006) Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms. *Water Sci. Technol.* 53: 175-180.

- Yan, S., Subramaniam, B., Tyagi, R. y Surampalli, Y. (2008) Bioplastics from waste activated sludge-batch process. *Practice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management.* 12(4): 239-247.