



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Y OCEANOGRÁFICAS**



SEMINARIO TITULO

**ELIMINACIÓN DE FITOESTEROLES A TRAVÉS DE UNA LAGUNA AIREADA Y
EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA MEDIANTE *Daphnia magna***

**Presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
de la Universidad de Concepción, para optar al título de
Biólogo**

SOLEDAD ANDREA CHAMORRO RODRÍGUEZ

Tutora: Dra. Gladys Vidal Saéz

Concepción, 2005

Esta investigación ha sido desarrollada en el Centro de Investigación en Ciencias Ambientales EULA-Chile, de la Universidad de Concepción.

Profesor Guía:

Dra. Gladys Vidal S.

Ha sido aprobada por la siguiente Comisión Evaluadora:

Dra. Gladys Vidal S.

Dr. José Becerra.

Dr. Enrique Bay-Schmith.

Coordinador de Tesis:

Dra. Maria E. Casanueva.

DEDICATORIA

A los brazos que siempre cobijaron mi ser, y que hoy tu sonrisa me cuida desde el cielo, por enseñarme todo lo que soy en esta vida, a ti abuelita querida....

A mi Rosita quien ha sido mi segunda madre, que con paciencia y ternura velaste cada una de mis noches hasta hoy...

A la más linda de todas las mujeres... a ti mamá por darme la vida, enseñarme, educarme y esforzarte para salir adelante juntas

TE AMO MUCHO...

A mi prima Carito por su cariño, paciencia y voluntad con todo el amor del mundo

Gracias a todas ellas

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy sinceramente a la profesora Gladys Vidal por su constante preocupación y apoyo, por su infinita paciencia y principalmente por enseñarme que las metas son ilusiones que se cumplen con trabajo, dedicación y cariño.

Muy especialmente a Jacqueline Decap por su entrega y significativo aporte en el transcurso más importante de mi carrera, por todas sus sugerencias y enseñanzas en este trabajo.

.....Al profesor Enrique Bay-Schmith y a la profesora Jeannette Silva, por la paciencia, consejos, y buena disposición, en todo el transcurso de mi estadía por la universidad y sobre todo en este trabajo.

A Marisol Gajardo y Roberto Urrutia por confiar en mí y permitirme trabajar en el laboratorio de bioensayos, por sus sugerencias y el gran crecimiento laboral, por tus enseñanzas y amistad Marisol.

En lo personal agradezco a mis compañeros Claudia, Elyzabeth, Pelu, Marioly, Vero, Pancho y Pablo, que no solo han demostrado una gran comprensión, sino que han sido parte de mi crecimiento personal en esta etapa de mi vida.

A Pablo Pedreros por su infinita dedicación, por su constante preocupación y apoyo incondicional...

Al proyecto Fondecyt 1040987.

A todos ellos gracias de corazón.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Discusión bibliográfica	3
1.1.1. <i>Los efluentes y sus componentes</i>	3
1.1.2. <i>Influencia de la tecnología en la celulosa kraft sobre las características de los efluentes y sus componentes</i>	4
1.1.3. <i>Tratamiento aeróbico</i>	5
1.1.4. <i>Extractivos de la madera; Los fitoesteroles</i>	5
1.1.5. <i>Incidencia y efectos de los fitoesteroles en organismos acuáticos</i>	6
1.1.6. <i>Compuestos contenidos en los efluentes de celulosa kraft, recalcitrantes a la degradación biológica aeróbica</i>	8
1.1.7. <i>Microfauna en lagunas aireadas</i>	9
1.1.8. <i>Toxicidad</i>	9
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	11
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo general	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. METODOLOGIA	12
4.1. Efluentes y componentes específicos	12
4.2. Sistema de biodegradación continuo	12
4.3. Biomasa	14
4.3.1. <i>Actividad de la biomasa</i>	14
4.4. Determinación de toxicidad	14
4.4.1. <i>Cultivos de daphnidos</i>	14
4.4.2. <i>Ejecución del bioensayo agudo</i>	15
4.5. Métodos Analíticos	16
4.5.1. <i>Métodos físico químicos</i>	16
4.5.2. <i>Ultrafiltración</i>	16

4.6. Determinación de fitoesteroles por cromatografía gaseosa acoplado a un detector de espectroscopia de masa (CG-MS)	18
4.6.1. <i>Extracción</i>	18
4.6.2. <i>Análisis cromatográfico</i>	18
5. RESULTADOS	19
5.1. Parámetros operacionales	19
5.2. Parámetros de eficiencia de la operación	23
5.3. Degradación de Estigmasterol	30
5.4. Determinación de la biodegradación del efluente a través de ultrafiltración	31
5.5. Evaluación de la toxicidad	34
5.6. Biomasa	35
5.6.1. <i>Actividad de la biomasa</i>	35
5.6.2. <i>Caracterización de la microfauna contenida en la biomasa</i>	36
6. DISCUSIÓN	40
6.1. Parámetros de eficiencia	40
6.2. Parámetros de eficiencia de operación	41
6.3. Degradación del estigmasterol	43
6.4. Determinación de la biodegradación del efluente medido a través de la ultrafiltración	44
6.5. Evaluación de la toxicidad	45
6.6. Biomasa	45
6.6.1. <i>Actividad de la biomasa</i>	45
6.6.2. <i>Caracterización de la microfauna contenida en la biomasa</i>	46
7. CONCLUSIONES	48
8. BIBLIOGRAFIA	49

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Cantidad de fitosteroles medidos en efluentes de celulosa con tratamiento secundario.	6
Tabla II. Eliminación de estigmasterol en laguna aeróbica indicando el tiempo de operación.	30
Tabla III. Valores en porcentaje de DQO, Fenoles Totales UV _{215nm} , Color A _{440nm} /DQO, A _{436nm} /DQO, A _{400nm} /DQO, Ácido Lignosulfónico A _{346nm} /DQO, Lignina A _{280nm} /DQO, A _{274nm} /DQO, Compuestos Aromáticos A _{254nm} /DQO, Derivados de Lignina A _{254/280nm} .	33
Tabla IV. Toxicidad aguda del influente y efluentes expresada en unidad de toxicidad LC ₅₀ , señalando los distintos tiempos de operación.	35
Tabla V. Velocidad de consumo de oxígeno de la biomasa y velocidad de consumo específico por microorganismos en función de la VCO, indicando los tiempos de operación.	36
Tabla VI. Lista de organismos a nivel de género encontrados en laguna aeróbica a través del tiempo.	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fitoesteroles encontrados en los efluentes de celulosa.	7
Figura 2. Laguna aireada a escala de laboratorio con un volumen medio de 332 mL, indicando cada uno las zonas y equipo suministrador de oxígeno.	13
Figura 3. Bomba alimentadora del efluente en el sistema de laguna aireada.	13
Figura 4 a. Crustáceo cladócero de la especie <i>Daphnia magna</i> .	15
Figura 4 b. Envases de realización de bioensayo agudo.	15
Figura 5. Esquema de distribución de fracciones moleculares a través de distintas membranas.	17
Figura 6. Sistema de ultrafiltración.	17
Figura 7. Indica el tiempo de retención hidráulico medido en días en laguna aeróbica en los 275 días de operación del sistema, indicando el tiempo que se realizó las distintas VCE.	19
Figura 8. Velocidad de carga orgánica en laguna aeróbica a través del tiempo.	20
Figura 9. Velocidad de carga del estigmasterol a través del tiempo en laguna aeróbica.	21
Figura 10. Variación del pH del influente y efluente en laguna aeróbica a través del tiempo.	22
Figura 11. Concentración de oxígeno disuelto en laguna aeróbica a través del tiempo.	23
Figura 12. Eliminación de DBO ₅ y DQO en laguna aeróbica a través del tiempo.	24
Figura 13. Eliminación de fenoles totales en laguna aeróbica a través del tiempo.	25

Figura 14. Variación del color a absorbancia 436 nm en laguna aeróbica a través del tiempo.	26
Figura 15. Variación del color a absorbancia 400 nm en laguna aeróbica a través del tiempo.	26
Figura 16. Comportamiento del ácido lignosulfónico en la laguna aeróbica a través del tiempo.	27
Figura 17. Comportamiento de la lignina a la absorbancia 280 nm en la laguna aeróbica a través del tiempo.	28
Figura 18. Comportamiento de la lignina a la absorbancia 274 nm en la laguna aeróbica a través del tiempo.	28
Figura 19. Variación de los derivados de lignina en laguna aeróbica a través del tiempo.	29
Figura 20. Variación de los compuestos aromáticos en laguna aeróbica a través del tiempo.	30
Figura 21. Ultrafiltración del a) influente, b) efluente, y c) efluente tratado después del bioensayo.	32
Figura 22. Cadena trófica en sistemas de lagunas aireadas.	39

RESUMEN

Los efluentes provenientes de la industria de celulosa kraft causan distintos tipos de alteraciones ambientales, asociadas a su contenido en sólidos suspendidos, carga orgánica, color y toxicidad. Actualmente las “Lagunas aireadas”, constituyen el tratamiento secundario más usado en Chile para reducir gran parte de materia orgánica contenida en el efluente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la incidencia de la tecnología aeróbica, en la degradación del estigmasterol contenido en el efluente de la industria de celulosa kraft. Junto al comportamiento de los microorganismos y la evaluación de la toxicidad del influente y efluente a través del cladóceros *Daphnia magna*.

Para ello, se trabajó con una laguna aireada alimentada con un efluente de celulosa kraft, complementado con nitrógeno, fósforo en una relación de DBO₅ (Demanda Biológica de Oxígeno) N:P:100:5:1. La estrategia de operación fue aumentar la velocidad de carga del estigmasterol (VCE), considerando un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 1 día. La biodegradación del estigmasterol fue evaluada en tres etapas distintas (VCE: 0,2, 0,6, 1,1 mg/L·d). La eficiencia de remoción del estigmasterol fue evaluada mediante HPLC. También como parámetro de eficiencia del sistema, se observó el comportamiento de compuestos específicos como el color. La actividad de la biomasa fue determinada a través de análisis respirométricos y la identificación de microorganismos. Por otro lado la evaluación de la toxicidad del influente y efluente fue realizada mediante bioensayos agudos sobre *D. magna*. Para estudiar el efecto del tratamiento aerobio, se evaluó la distribución del peso molecular del influente y efluente mediante la ultrafiltración.

Los resultados demuestran un aumento de estigmasterol, cuando el sistema aeróbico operó a VCE = 0,2 mg/L·d. Sin embargo, cuando la VCE = 0,6 mg/L·d, se produce una eliminación de estigmasterol en promedio de un 96 %. El rango de eficiencia para la DQO (Demanda Química de Oxígeno) varió entre un 25,0-65,2 %, mientras que, para la DBO₅ fue mayor al 95 %. Por otro lado, los análisis de ultrafiltración demuestran que compuestos de bajo peso molecular (<1.000 Da) son polimerizados. Debido a esto, no se observó eliminación del color por medio de este tratamiento aeróbico, ligninas y derivados de lignina se presentan como compuestos recalcitrantes al tratamiento aeróbico.

Por otra parte se detectó, ausencia de microorganismos fundamentales en la cadena trófica como *Aspidisca sp* cuando la VCE fue de 1,1 mg/L·d en la laguna aeróbica. La toxicidad aguda fue removida y eliminada a medida que aumentó la VCE.

Palabras claves: Laguna aeróbica, degradación de estigmasterol, toxicidad, daphnidos, ultrafiltración.

ABSTRACT

The kraft mill effluents produce different types of environmental impact. They are associated to suspended solid content, organic matter, color and toxicity. Secondary treatment by aerated lagoons are the most common in Chile, to reduce the main part of organic matter content in the effluents. The objective of this work was to evaluate the stigmasterol degradation contained in kraft mill effluent by aerated lagoon. Beside, the behavior of microorganism in the treatment and the toxicity evaluation of influent and aerobic effluent by *Daphnia magna* were determined.

The aerated lagoon was fed with raw wastewater supplemented with nitrogen and phosphorus with a relationship of BOD₅ (Biological Oxygen Demand):N:P as 100:5:1. Operation strategy of aerated lagoon was to increase the organic load rate (OLR) and the stigmasterol load rate (SLR) whereas the hydraulic retention time (HRT) was around 1 d. Stigmasterol biodegradation was evaluated in three different phases (SLR: 0,2, 0,6, 1,1 mg/L·d). The efficiency of the stigmasterol removal was evaluated by HPLC. In order to evaluate performance of the aerated lagoon, efficiency of organic removal, specific compounds and color were evaluated. Biomass activity was determined through respirometry assays and microorganisms identification. Besides, influent and effluent toxicity evaluations were done by means of acute tests on *D. magna*. In order to study the effect of the aerobic treatment, molecular weight distribution was evaluated in the influent and effluent.

The stigmasterol shows accumulation when the aerobic system was operated at SRT = 0,2 mg/L·d. However, when the SRT = 0,6 mg/L·d the stigmasterol removal was 96 %. On the other hand, the efficiency COD (chemical organic demand) was 25,0-65,2 % while removal of range for BOD₅ was higher than 95 %. Because of this, most of the lignin compounds or lignin derived are recalcitrant to aerobic biodegradation. Moreover, ultrafiltration analysis shows that molecular weight compounds below than 1.000 Da (< 1.000 Da) are polymerized. Due to this, no color removal was measured by aerobic treatment. During lagoon aerated operation, change in the microbiology was detected. For example, when SRL was higher (1,1 mg/L·d) a fundamental species in the trophic chain, *Aspidisca sp*, was not detected. Also, toxicity by *D. magna* was removed and decreased whereas SRL increased.

Keywords: Aerobic lagoon, stigmasterol degradation, toxicity, daphnideos, ultrafiltration.

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las industrias forestales en Chile emplea para separar la fibra de celulosa de la lignina el proceso químico denominado kraft. Este proceso, se basa en la digestión que consiste en someter la pulpa de madera a un cocimiento con soda cáustica y sulfuro sódico en un medio alcalino y que bajo condiciones controladas de presión y temperatura permite la obtención de celulosa (Reinoso, 1996). Como producto derivado de este proceso se obtiene una mezcla compleja de material orgánico y reactivos sobrantes que se denomina licor negro. Este compuesto es recuperado por evaporación y combustión para su reutilización como combustible en las calderas de las industrias. Sin embargo, una parte de este licor permanece en la fibra de celulosa hasta las etapas finales de blanqueo, generándose compuestos contaminantes (Hodson, 1996).

Dentro de este contexto la industria de celulosa con proceso kraft se ha visto obligada a implementar medidas, con el objetivo de disminuir o eliminar el impacto de los desechos en el ambiente. Desde esta perspectiva, se han impulsado dos grandes cambios principales, modificaciones en la etapa de digestión, y cambio en los procesos de blanqueo con cloro, en procesos exentos de uso del cloro elemental como agente oxidante, proceso ECF (Libre de cloro elemental), hasta llegar al blanqueado con reactivos no clorados, proceso TCF (Totalmente libre de cloro) (Correa *et al.*, 2003).

En forma complementaria, se han desarrollado una serie de tratamientos físicos químicos y biológicos a los efluentes, cuyo objetivo es poder eliminar los compuestos contenidos en éstos. En general, se puede decir que la industria ha adoptado tecnologías físico química para la eliminación de sólidos suspendidos y tratamiento biológico aeróbicos para la eliminación de carga orgánica. Sin embargo, aún estos sistemas no dan solución a la eliminación del color y mineralización de compuestos específicos. Prueba de esto es que se han detectado mal formaciones, cambios hormonales y anomalías en organismos acuáticos presentes en las descargas de los efluentes previamente tratados (Howell *et al.*, 1980; Cody and Bortone, 1997; Van der Kraack *et al.*, 1992 and Larsson *et al.*, 2002).

Resultados de investigaciones en peces expuestos a efluentes de blanqueado kraft, demuestran efectos profundos, a nivel fisiológico y bioquímico, incidiendo en la reproducción. Se deduce que compuestos contenidos en los extractivos de la madera kraft, pueden ser causantes de tales efectos (Howell *et al.*, 1980). Específicamente fitoesteroles, (hormonas naturales de la madera) como β -sitoesterol, campesterol, estigmasterol, los cuales se presentan como responsables, debido a que su estructura química es similar al colesterol y poseen un alto potencial androgénico (Fernández *et al.*, 2003).

La presencia de estos componentes se verificó en un estudio realizado a 22 industrias de celulosa kraft en Estados Unidos. Los resultados indicaron que los fitoesteroles se presentan en los efluentes de la industria de celulosa kraft, incluso después de realizar tratamientos por lodos activados y/o lagunas aireadas. Este estudio además indica que el β -sitosterol es encontrado en mayor proporción que otros esteroides. Además, se pudo determinar compuestos como: campesterol, estigmasterol y estigmastanol (Cook *et al.*, 1997).

En la actualidad la industria de celulosa kraft emplea mayoritariamente métodos biológicos como lagunas aeróbicas por su bajo costo y amplio conocimiento en su operación. La eficiencia de estos sistemas demuestran una alta remoción de materia orgánica, sobre el 80 % para la DBO₅ y entre un 45 y 60 % para DQO (Kostamo *et al.*, 2004). Sin embargo, compuestos de alto peso molecular como la lignina no son biodegradados, contribuyendo al contenido del color final del efluente.

Desde este punto de vista, es importante conocer la eficacia de un tratamiento biológico en la eliminación de compuestos generados por industrias de celulosa, ya que no existe claridad en la mineralización de compuestos extractivos de la madera. Más aún, cuando la concentración de estigmasterol se ve incrementada después de un tratamiento por laguna aireada.

Una de las herramientas complementarias a la determinación analítica de compuestos potencialmente tóxicos de distintas sustancias en el efluente, lo constituyen, los test de toxicidad o bioensayos. Este es un método que permite detectar y evaluar la capacidad inherente de un agente de producir efectos tóxicos sobre los organismos vivos utilizando

especies de prueba. Dentro de la variada gama de organismos utilizados en este tipo de prueba, se encuentran los crustáceos cladóceros del género *Daphnia*. Los daphnidos, han sido registrados como uno de los organismos acuáticos más sensibles que se han utilizado en ensayos de toxicidad, estos organismos son representantes importantes de la comunidad zooplanctónica, con reproducción partenogénica y ciclo de vida corto, pueden demostrar una indicación más representativa de los efectos potenciales de los tóxicos que son eliminados al ambiente (EPA, 1993).

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar la incidencia de la tecnología aeróbica de tratamiento, en la eliminación de fitoesteroles contenidos en efluentes de la industria de celulosa kraft, estudiando los efectos tóxicos de los efluentes de entrada y salida del sistema de tratamiento mediante *Daphnia magna*.

1.1. Discusión bibliográfica

1.1.1. Los efluentes y sus componentes

Los efluentes de plantas de celulosa kraft contienen una mezcla compleja de constituyentes orgánicos, estos compuestos y el proceso productivo empleado son los principales responsables de las características físico-químicas de los vertidos (Rintala and Puhakka, 1994), caracterizando a la industria de celulosa kraft como una de las actividades industriales que genera como subproductos una gran diversidad y cantidad de contaminantes químicos (Gaete *et al.*, 1999). La madera utilizada en este proceso se caracteriza por tener hemicelulosa (20-30 %), celulosa (40-45 %), lignina (20-30 %) y extractivos (2-5 %) (Xavier *et al.*, 2004), debido a ellos los efluentes descargados son fuertemente coloreados, la contribución principal del color proviene de los compuestos lignínicos. Además, durante el pulpaje se pueden generar terpenos, fenoles polares, ácidos grasos, y fitoesteroles (Hewit *et al.*, 1996; Kostamo and Kukkonen, 2003). Entre los efectos dañinos comprobados en la vida acuática se destacan la suspensión de la fotosíntesis y del fitoplancton (base de la cadena trófica acuática) (Leal *et al.*, 1996).

1.1.2. *Influencia de la tecnología en la celulosa kraft sobre las características de los efluentes y sus componentes*

La industria de celulosa genera elevadas cantidades de efluentes (60 m³/ton de papel) (Thompson *et al.*, 2001), con una fuerte carga orgánica, cuya coloración y compuestos específicos contenidos en estos pueden ejercer fuertes impactos ambientales. Últimamente en busca de reducir al mínimo la formación y las descargas de material orgánico en el ambiente, las industrias de la celulosa han introducido modificaciones al proceso kraft. Los cambios principales apuntan a cambiar el proceso de blanqueo con cloro, a procesos exentos de uso de cloro como agente oxidante (proceso ECF o libre de cloro elemental), llegando últimamente al blanqueo con reactivos no clorados (proceso TCF o totalmente libre de cloro). Estos cambios han significado una reducción importante de componentes clorados (más de un 90 % en relación con el proceso antiguo). De esta manera, la composición de los efluentes generados por la industria de celulosa, dependen fuertemente de la materia prima utilizada y la tecnología desarrollada en la transformación de éstos (Vidal, 1999). Como medidas externas para descargar bajas concentraciones de sólidos suspendidos en materia orgánica, se han dispuesto tratamientos primarios en los que estos son eliminados. Sin embargo, dada las características presentadas en los efluentes generados en la industria de celulosa kraft, se hace necesario tratamientos secundarios para eliminar la demanda biológica de oxígeno contenida en los efluentes. Las tecnologías biológicas están siendo utilizadas mayormente en la depuración de efluentes y entre los métodos aerobios, las dos grandes alternativas usadas hoy en día son: lagunas aireadas y lodos activados (Strehler and Welander, 1994; Thompson *et al.*, 2001). Las primeras están siendo aplicadas mayoritariamente, debido a que presentan una eficaz remoción de materia orgánica soluble y suspendida en el efluente, son de fácil operación y además poseen la capacidad de convertir desechos residuales en formas estables como dióxido de carbono y agua. Por otra parte, son una de las tecnologías más desarrolladas y conocidas caracterizándose por la presencia de etapas de aireación y microorganismos que aportan alta eficacia y economía, además de no generar subproductos contaminantes. Sin embargo, aún empleando el proceso ECF puede haber una generación de compuestos tóxicos para determinados organismos, parte del dióxido de cloro utilizado en la etapa de blanqueo se convierte en clorato, tóxico para el ambiente acuático principalmente para algas café

(Strömberg *et al.*, 1996). En Chile 7 de 11 empresas de celulosa, emplean proceso químico kraft y de éstas 4 poseen tratamiento secundario del tipo de laguna aireada, solamente en el año 2000 se comienza a operar un sistema de tratamiento por lodos activados (Videla, 2003).

1.1.3. *Tratamiento aeróbico*

Las lagunas aireadas constituyen un sistema de tratamiento aeróbico que produce una reducción en la DQO (Demanda Química de Oxígeno), por encima del 60 % para un efluente de planta de pulpaje químico. Por su parte, la eliminación de la demanda biológica de oxígeno (DBO₅) puede variar del 90 % al 98 % (Diez *et al.*, 2002). Esta tecnología de tratamiento requiere grandes superficies de terreno y elevada energía para llevar a cabo el proceso, generando a su vez biomasa que debe ser acondicionada y dispuesta en rellenos industriales controlados. Lamentablemente, este sistema de tratamiento no es eficiente en la eliminación del color, esto es, de compuestos cromóforos provenientes de los compuestos lignínicos. Al mismo tiempo, se ha detectado que compuestos específicos provenientes de los extractivos de la madera tampoco son eliminados completamente (Kukkonen *et al.*, 1999). Cook *et al.* (1997), evaluó 5 plantas de celulosa kraft en el cual el proceso de blanqueo provenía de tecnología ECF y/o TCF, verificando una remoción importante en éstas, alrededor del 65 %. Sin embargo, la concentración de estigmasterol, aumentó logrando alcanzar valores entre 197 % a 367 %, aún después del tratamiento por lagunas de aireación.

1.1.4. *Extractivos de la madera: Los fitoesteroles*

Existen más de 40 tipos de esteroides vegetales (o fitoesteroides). Los fitoesteroides son parte de los compuestos de extractivos de la madera (Guang-Guo *et al.*, 2002), y tienen una estructura semejante al colesterol. Su estructura química está constituida por un anillo de esterol, que es común a todos los esteroides, (ciclopentanoperhidrofenantreno) y una cadena lateral, que los diferencia entre sí. A diferencia del colesterol, no son sintetizados por el cuerpo humano y son escasamente absorbidos por el intestino. Los fitoesteroides cumplen una función similar a la del colesterol en el cuerpo humano, es decir, participan en las rutas endocrinas y tienen importancia en la formación y mantención de las membranas celulares. El esterol que se

encuentra en mayor cantidad entre los extractivos de la madera es el β -sitosterol, que puede encontrarse en los efluentes desde 4,2 hasta 12,1 g/ton a pesar de tener un tratamiento secundario en base a lagunas aireadas (Cook *et al.*, 1997). Se han encontrado diversas cantidades de fitoesteroles totales medidos en las aguas residuales de la industria de celulosa kraft. La Tabla I muestra diferentes valores de cantidades totales de fitoesteroles dependiendo del tratamiento realizado. Se observa que en tratamientos por lodos activados es más eficiente la biodegradación de fitoesteroles que en lagunas aireadas. Autores como Strömberg *et al.* (1996) y Cook *et al.* (1997), no han encontrado relación entre la materia prima y los procesos de pulpage empleados y la cantidad emitida de fitoesteroles en los efluentes de celulosa. Por ejemplo, Van den Heuvel *et al.* (2002), detectó campesterol (7,6 $\mu\text{g/L}$), estigmasterol (21,1 $\mu\text{g/L}$), y β -sitosterol (165,4 $\mu\text{g/L}$) en los efluentes de celulosa kraft con tecnología ECF.

Tabla I. Cantidad de fitoesteroles medidos en efluente de celulosa con tratamiento secundario

Fitoesteroles Totales	Tratamiento	Referencia
0,45 g/ton	Lodo Activado	Strömberg <i>et al.</i> , 1996
5,3 g/ton	Laguna Aireada	Strömberg <i>et al.</i> , 1996
0,2-25,5 g/ton	Laguna Aireada	Cook <i>et al.</i> , 1997
0,6 g/ton	Laguna Aireada	★Cook <i>et al.</i> , 1997
0,4-11 g/ton	Lodo Activado	Khan <i>et al.</i> , 2003

★Concentración específica de estigmasterol

1.1.5. Incidencia y efectos de los fitoesteroles en organismos acuáticos

Los fitoesteroles están contenidos en los efluentes de celulosa kraft y concentrados en el licor negro. Se deduce que estos compuestos poseen actividad hormonal actuando como disruptores endocrinos, los cuales se pueden relacionar con una variedad de anomalías fisiológicas y morfológicas en los peces habitantes en las descargas de las industrias de celulosa.

Investigaciones recientes demuestran que los fitoesteroles inciden en el sistema biológico de peces de aguas superficiales (Servos *et al.*, 1996; Kostamo *et al.*, 2004), presentando un patrón de alteraciones a nivel fisiológico y bioquímico, incidiendo en la reproducción de stos.

Compuestos como β -sitosterol, campesterol y estigmasterol, poseen actividades estrogénicas, por su semejanza estructural con el colesterol (Figura 1), actuando como modulador e imitador hormonal.

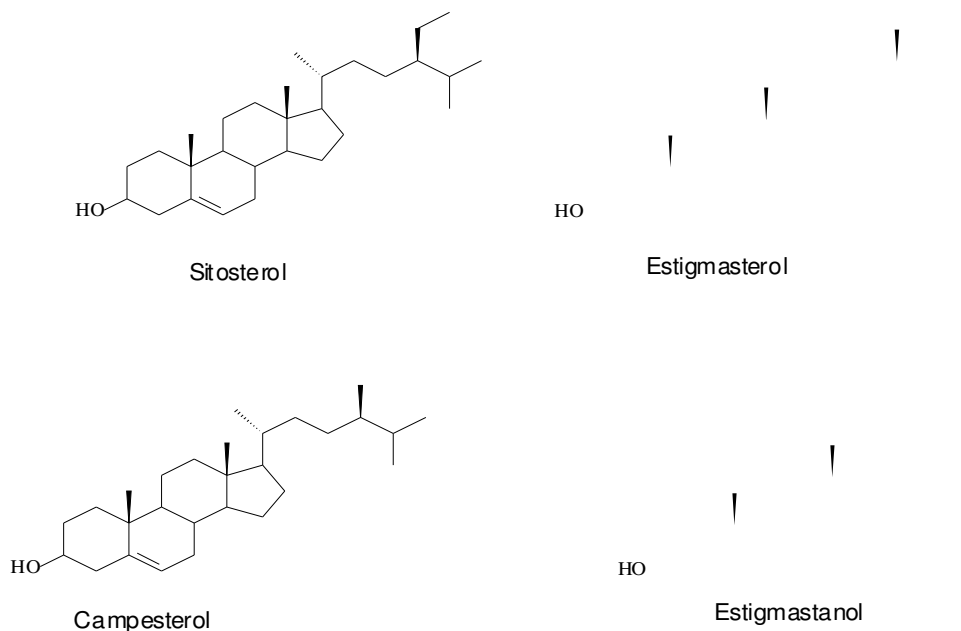


Figura 1. Fitoesteroles encontrados en los efluentes de celulosa

Mellanen *et al.* (1996), explica que principalmente β -sitosterol actúa como modulador hormonal en la síntesis de moléculas, e inductor de hormonas masculinas mediante la conversión por bacterias a compuestos como androstenedione (ADD).

Howell *et al.* (1980), observó alteraciones en *Gambusia affinis* a nivel reproductivo, donde las hembras presentan la elongación de la aleta anal a modo de gonopodio, órgano reproductor de machos, además de reducción del tamaño gonadal y madurez sexual prematura (Cody and Bortone, 1997; Van der Kraack *et al.*, 1992; Larsson *et al.*, 2002 Andersson *et al.*, 1988). Otros efectos atribuidos a los fitoesteroles, como el β -sitosterol, es que provocan mortandad en las ovas de peces (Janz *et al.*, 1997; Lehtinen *et al.*, 1999), depresión de la fecundidad,

alteración en las características sexuales secundarias y disminución en la producción de las hormonas reproductivas (Munkittrick *et al.*, 1997).

Doyle and Lim (2002), investigan a 17 β -estradiol, compuesto intermediario en la transformación del β -sitosterol sobre *Gambusia holbrooki*, los resultados son concordante con Howell *et al.* (1980), y advierte que los compuestos intermediarios de fitoesteroles, son los hormonalmente activos y altamente estrogénicos. Observaciones de otros autores han encontrado que los peces expuestos a extractivos de la madera, de la industria de celulosa kraft presentan efectos de masculinización como feminización (Kukkonen *et al.*, 1999).

1.1.6. *Compuestos contenidos en los efluentes de celulosa kraft, recalcitrantes a la degradación biológica aeróbica*

Uno de los principales problemas ambientales que enfrenta la industria de celulosa es el color final de los residuos líquidos. Debido a que compuestos de alto peso molecular (>10.000 Da) en el efluente como cloroligninas generadas en la etapa del blanqueo, no son biodegradadas por tratamientos biológicos convencionales (Pratima and Pradmod, 1994).

Se evidencia que la lignina y compuestos fenólicos poseen un rango de simples monómeros de alto peso molecular a polímeros polifenólicos (Chamorro *et al.*, 2005). Las cloroligninas con alto peso molecular (>10.000 Da) son biológicamente inactivas debido a que no pueden atravesar la membrana celular de los organismos (Liane *et al.*, 1999), por lo tanto no afecta a la biota acuática por ser pobremente biodegradables. Sin embargo, ellos son los principales responsables del color de los efluentes (Vidal *et al.*, 2000). Por otro lado, fenoles de bajo peso molecular son biodegradables (PM < 1.000) y en particular compuestos clorados son capaces de penetrar la membrana biológica de las células y por tanto causar daños a los microorganismos acuáticos (Vidal *et al.*, 2000).

Franta and Wilderer (1997), indican que los compuestos de alto peso molecular en el efluente de celulosa kraft, son producidos por los derivados de ligninas y son los responsables de la fracción recalcitrante de la DQO.

1.1.7. *Microfauna en lagunas aireadas*

El sistema de depuración biológica es en realidad, un ecosistema donde organismos vivos están representados en mayor o menor proporción en una cadena trófica, donde cada grupo desempeña una función concreta en el sistema y su aparición y abundancia reflejan las distintas condiciones físico-químicas existentes en las lagunas de aireación, lo que resulta ser un índice muy útil para valorar la eficiencia del proceso de depuración. Por ejemplo, los protozoos son microorganismos abundantes de la microfauna de lodos activos, y pueden llegar a alcanzar valores medios de 50.000 individuos/ml en los reactores biológicos, constituyendo aproximadamente el 5 % del peso seco de los sólidos en suspensión del licor mezcla (Rolim, 2000). La población microbiana que participa en la formación de flóculos en un proceso de lodos activados esta compuesta por bacterias, hongos protozoarios y micrometazoarios, los consumidores de primer orden están representados por los flagelados heterótrofos y su aparición refleja que el sistema funciona adecuadamente. Los ciliados reptantes y pedunculados constituyen los consumidores del segundo orden y es uno de los mejores índices para verificar si un tratamiento funciona correctamente, el último nivel lo forman los pequeños metazoos. Sin embargo, su función aún no es clara dentro del sistema.

La distribución y frecuencia de estos organismos se relacionan con las condiciones experimentales del tratamiento, además de la calidad y cantidad del influente alimentado al sistema (Audra y Almeida, 2000).

1.1.8. *Toxicidad*

La toxicidad puede ser determinada a nivel de laboratorio y sirve para evaluar los potenciales efectos tóxicos de los influentes o efluentes industriales tratados sobre los organismos vivos (Larraín, 1995). Estos efectos, se evalúan a través de estudios de toxicidad aguda por medio de respuestas letales (mortalidad) o a través de estudios de toxicidad crónica con respuestas sub-letales (fertilización, crecimiento, comportamiento).

Uno de los organismos más utilizados en la realización de este tipo de estudios, básicamente por ser altamente sensibles a la presencia de bajas concentraciones de contaminantes y responder a un gran número de agentes tóxicos de naturaleza diversos, son los daphnidos. Estos cladóceros son consumidores primarios que habitan exclusivamente en cuerpos de agua dulce como lagos, lagunas y charcas temporarias. La población se encuentra formada exclusivamente por hembras partenogénicas y la aparición de machos suele acontecer cuando hay cambios en la temperatura o cuando hay escasez de sustrato debido a un aumento de la población (EPA, 1993). Las "pulgas de agua" tienen varios aspectos biológicos interesantes que las hacen ideales para los ensayos. A su corta vida (3 ó 4 semanas) se suma una alta fecundidad, una vez alcanzada su madurez se reproduce cada 48 horas. Prácticamente todos los individuos que se utilizan son genéticamente idénticos. Sin embargo, la característica más interesante es su sensibilidad a los tóxicos, ya que es capaz de acusar la presencia de, por ejemplo, 0,005 mg del peligroso mercurio en el agua, y aún menores concentraciones de residuos industriales. Leal *et al.* (1996), evaluó el riesgo de un efluente de celulosa sobre *Daphnia pulex* de la cual observó que no existe toxicidad aguda de un efluente de celulosa en este tipo de organismo de prueba.

En Chile, más del 80 % de la producción de celulosa es generada por industrias ubicadas en la cuenca del río Biobío (Gaete *et al.*, 1999). La creciente incorporación de nuevas industrias de celulosa con el proceso denominado kraft, sumado a la falta de investigaciones que cuantifiquen los potenciales efectos sobre la biota acuática autóctona de Chile, que podrían tener el vertimiento de efluentes cargados de sustancias que no son eliminadas en los tratamientos aplicados, con su correspondiente bioacumulación en la cadena trófica; pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios de toxicidad de los efluentes tratados que van hacer evacuados en fuentes de aguas superficiales.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El sistema de lagunas aireadas no permite la mineralización completa de fitoesteroles y por lo tanto, los efluentes tratados presentan efectos tóxicos en *Daphnia magna*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la incidencia de la tecnología aeróbica de tratamiento, en la eliminación de fitoesteroles contenidos en efluentes de la industria de celulosa kraft, estudiando los efectos tóxicos de los efluentes de entrada y salida mediante *Daphnia magna*.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la eficacia de una laguna aeróbica, operando en condiciones óptimas en la degradación de fitoesteroles.
2. Determinar y analizar los potenciales efectos tóxicos del influente, efluente y del fitoesterol, utilizando *Daphnia magna*.
3. Determinar el comportamiento de la biomasa de la laguna aireada a través de la clasificación de los grupos de organismos por clase, así como la actividad de ésta, cuando esta en presencia de fitoesteroles.
4. Evaluar el comportamiento de las distintas fracciones de compuestos contenidos en el influente y efluente proveniente del sistema de tratamiento mediante laguna aireada.

4. METODOLOGÍA

4.1. Efluente y compuestos específicos

Se trabajó con un efluente proveniente de la industria de celulosa kraft complementado con una fuente de Nitrógeno y Fósforo en la proporción $DBO_5:100:5:1$ (Correa *et al.*, 2003). Para tal efecto se añadió, 0,573 g (N)/L en la forma de (NH_4Cl) y 0,169 g (P)/L en la forma de (K_2HPO_4) . Se neutralizó hasta llegar a un $pH=7$ con $NaOH$ 1N.

Se utilizó estigmasterol con pureza al 95 % de Merck, como patrón hormonal. Se evaluaron concentraciones de 0,2, 0,6 y 1,1 mg/L del compuesto (rango medido en un efluente local) mezclado en el efluente. Agitado por medio de Sonicador ELMA.

4.2. Sistema de biodegradación continuo

Se utilizó una laguna aireada en continuo como reactor para el tratamiento biológico del efluente de celulosa, con un volumen total de 660 mL (Figura 2). Esta laguna está constituida por placas de vidrio cuyas dimensiones son de 15 cm de largo x 7 cm ancho dividido en dos zonas. La primera zona, corresponde a una etapa de aireación y la segunda a una etapa de sedimentación, realizada en serie para la decantación de la biomasa. El sistema fue alimentado por una bomba Masterflex modelo 7518 – 00 (Figura 3). La concentración del oxígeno se mantuvo sobre 2 mgO_2/L por un sistema difusor de oxígeno. La operación se realizó con un volumen útil de 332 mL a una temperatura constante de 20° C. El reactor fue inoculado con 5 gSSV/L de lodo. La estrategia de operación consistió en una primera etapa la puesta en marcha la cual se realizó con efluente de celulosa proveniente de industria con tecnología kraft ECF, con un TRH (Tiempo de retención hidráulico) de 1 día y VCO (Velocidad de carga orgánica) 0,6 gDQO/L·d. La segunda etapa comprendió la degradación de un fitoesterol. Para ello se adicionó en forma creciente 0,2, 0,6 y 1,1 mg/L·d de VCE (Velocidad de carga del estigmasterol).

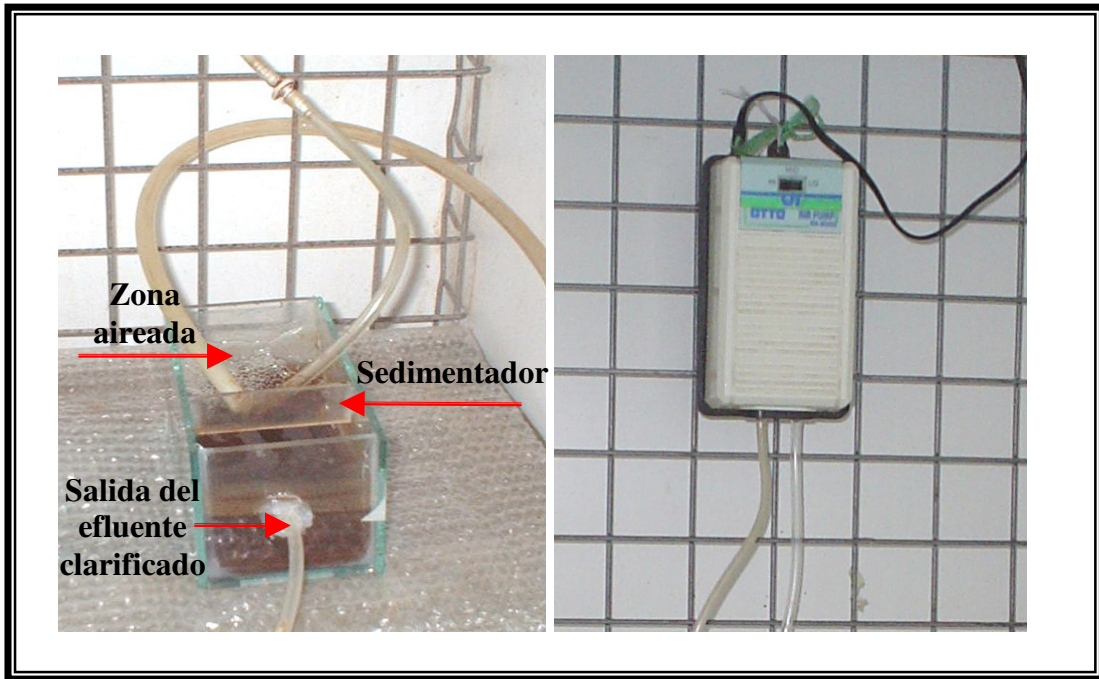


Figura 2. Laguna aireada a escala de laboratorio con un volumen medio de 332 mL, indicando cada uno las zonas y equipo suministrador de oxígeno.



Figura 3. Bomba alimentadora del efluente en el sistema de laguna aireada.

4.3. Biomasa

4.3.1. Actividad de la biomasa

Se midió a través de un análisis respirométrico, esto se determinó midiendo el oxígeno que consumen los microorganismos en 10 mL de lodo de la laguna aeróbica por minuto, a través de un oxímetro, Oxi 3300i/set modelo 82362. El oxímetro se saturó con agua destilada oxigenada de 24 horas previamente, hasta llegar a un valor de 9,1 mgO₂/L (Calibración del oxímetro), la muestra fue colocada en el interior de un tubo de plástico de 10 cm de largo por 5 cm de ancho, conjuntamente con el oxímetro. También se determinan los sólidos suspendidos volátiles (SSV) de la biomasa del lodo, mediante la incineración a 550° C por una hora. Como parámetro de control se determinó la VCO, TRH, pH, O₂ disuelto, y observación de microorganismos presentes en el reactor, realizado con microscopio óptico. Las fotografías se obtuvieron con película de 400 asas, tomadas con cámara-microscopio. Mediante esto se relacionó el papel bioindicador en la laguna aireada.

4.4. Determinación de toxicidad

4.4.1. Cultivos de daphnidos

Los organismos fueron obtenidos desde cultivos del Laboratorio de Bioensayos del Centro de Ciencias Ambientales EULA-CHILE y del Laboratorio de Ficología (*Selenastrum capricornutum*), ambos de la Universidad de Concepción. Los cultivos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento de normativa chilena (NCh2083. Of 1999). La preparación del agua reconstituida, de dilución y cultivo para el bioensayo, consistió en agua para análisis (agua destilada), a la cual se agregan sales inorgánicas de grado analítico (p.a) (ISO 6341:1996 (E), NCh2083. Of 1999) con un contenido de oxígeno disuelto mayor al 80 % (EPA, 1993). Las soluciones se preparan disolviendo las sales en forma separada en agua destilada, y se completa a 1L (NCh 2083. Of 1999).

4.4.2. Ejecución del bioensayo agudo

Para evaluar la toxicidad aguda, se seleccionaron neonatos de *Daphnia magna*, (Figura 4 a) menores a 24 horas de vida, para la realización de bioensayo se utilizaron envases de vidrio transparente de 30 mL (Figura 4 b). Se evaluó la toxicidad de un efluente de celulosa kraft tratado mediante laguna aeróbica, y estigmasterol disuelto en efluente, a VCE de 0,2 0,6 y 1,1 mg/L·d. Se evaluaron 5 niveles de tratamiento (concentraciones), 4 réplicas por cada nivel, y 5 organismos por réplica. El bioensayo tuvo una duración de 48 horas, sin recambio ni alimentación. Las concentraciones del influente y efluente utilizadas para el bioensayo fueron diluciones seriadas del compuesto. La respuesta evaluada en los organismos fue la mortalidad a las 48 horas de exposición (LC_{50} 48 horas), cada una de las pruebas fueron calculadas a través del análisis PROBIT (USEPA 1993).

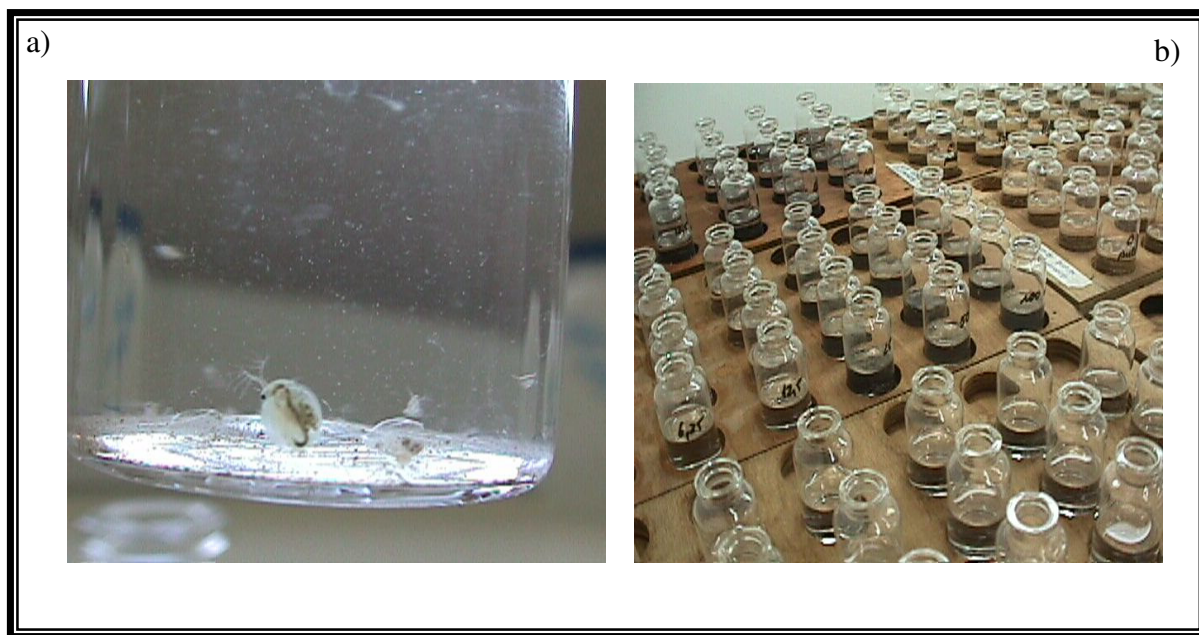


Figura 4. a) Crustáceo cladócero de la especie *Daphnia magna* b) Envases de realización de bioensayos agudos.

4.5. Métodos Analíticos

4.5.1. Métodos físico químicos

Para la evaluación de la eficiencia del sistema se utilizaron muestras solubles. Se determinó la medición del color mediante la absorbancia dividida por su DQO correspondiente a una longitud de onda de $A_{436\text{nm}, 400\text{nm}}$, ácido lignosulfónico $A_{346\text{nm}}$, fenoles totales medidos en UV $_{215\text{nm}}$, lignina mediante $A_{280\text{nm}, 274\text{nm}}$, derivados de lignina, $A_{254/280\text{nm}}$, compuestos aromáticos $A_{254\text{nm}}$ según Çeçen, (2003). Todas la muestras fueron filtradas por membranas Wathman 0,45 μm y medidas en un termo - espectrofotómetro Génesis 10UV Unicam. Se determinó DQO (Demanda Química de Oxígeno) y DBO_5 , (Demanda Biológica de Oxígeno soluble a los 5 días) filtradas a través de membranas Wathman 0,45 μm . Ambos parámetros fueron determinados de acuerdo con estándar methods (APHA – AWWA – WPCF, 1985).

4.5.2. Ultrafiltración

La ultrafiltración fue realizada a $17 \pm 2^\circ\text{C}$ utilizando una celda agitadora Micro-Prodicon (Figura 6) Model UHP 75 de 450 mL, con una superficie de membrana expuesta de un área de $38,5 \text{ cm}^2$. Se utilizaron tres membranas de celulosa, de tamaño de poro de 10.000, 5.000 y 1.000 Da. El nitrógeno fue aplicado sobre el líquido en la celda agitadora. Anterior a la ultrafiltración, el pH del agua residual fue ajustado a 9,0 y subsecuentemente la muestra fue filtrada a través de membrana de 0,45 μm . La muestra retenida por la membrana de 10.000 Da contienen compuestos de peso molecular sobre y hasta 10.000 Da, por este motivo se denominada fracción $>10.000 \text{ Da}$. La muestra retenida en la membrana de 5.000 Da posee compuestos de peso molecular bajo los 10.000 Da y sobre e igual a los 5.000 Da, por esto la fracción se denomina fracción entre 10.000-5.000 Da. La muestra que permanece retenida por la membrana de 1.000 Da posee compuestos de peso molecular menores a 5.000 Da y sobre e igual que 1.000 Da, por ende esta fracción se denomina entre 5.000-1.000 Da y la fracción permeable a la membrana de 1.000 Da, posee compuestos moleculares menor a este rango y esta fracción se denomina $< 1.000 \text{ Da}$, como se explica en la Figura 5. A cada fracción colectada se le evaluó la concentración de DQO, fenoles totales UV $_{215\text{nm}}$, color $A_{440\text{nm}, 436\text{nm}}$,

400nm, ácido lignosulfónico, A_{346nm}, lignina A_{280nm}, 274nm, compuestos aromáticos A_{254nm}, derivados de lignina A_{254/280nm}.

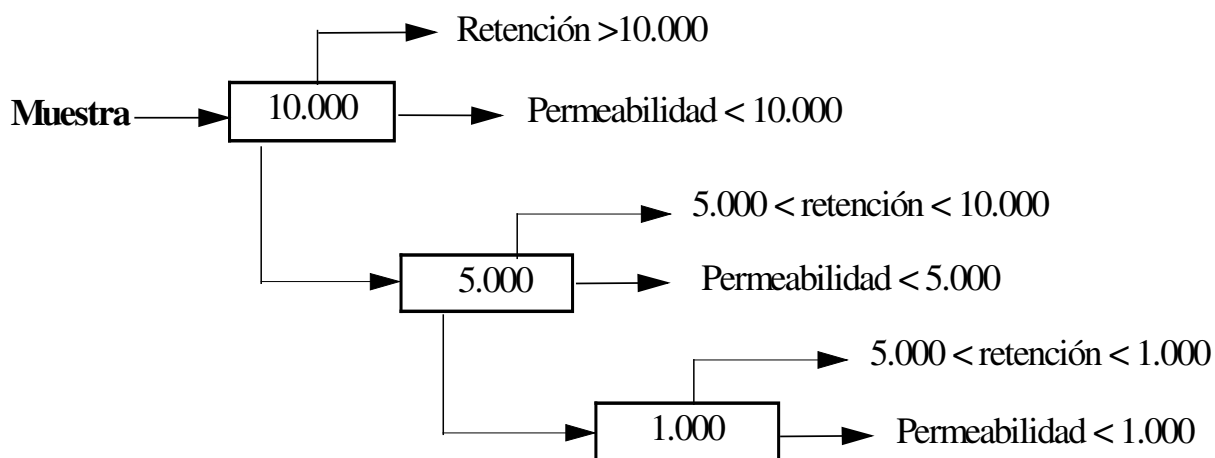


Figura 5. Esquema de distribución de fracciones moleculares a través de las distintas membranas.



Figura 6. Sistema de ultrafiltración.

4.6. Determinación de fitoesteroles por cromatografía gaseosa acoplado a un detector de espectroscopia de masa (CG-MS).

4.6.1. Extracción

Se extrajo una muestra de 100 mL de efluente, filtrada mediante membrana Whatman de 0,45 μm . La extracción se realizó mediante la técnica líquido-líquido con un embudo de decantación de 500 mL. La extracción se realizó 3 veces con volúmenes de 20 mL de Diclorometano (DCM), el extracto fue secado con sulfato de sodio anhidro, rotaevaporado y reservado para el posterior análisis cromatográfico.

4.6.2. Análisis cromatográfico

Se preparó una solución de colesterol de 1 g/L, pesando 5 mg de colesterol (CAS 57-88-5) solubilizado en matraz aforado de 5 mL con cloroformo. Al matraz seco (rotevaporado) con el extracto de la muestra, se le añaden 2 mL de solución de colesterol previamente preparada. Son inyectados 1 μL de la resuspensión al cromatógrafo. La relación del área y masa entre el colesterol y estigmasterol es proporcional, y ésta es dada por una curva de calibración. Para estos análisis se utilizó un equipo de CG-MS HP 5890 y detector HP 5972 (Cook *et al.*, 1997; Khan and Hall, 2003).

5. RESULTADOS

5.1. Parámetros operacionales

El TRH, es un factor importante dentro de la eficiencia de operación de reactores, ya que mediante este parámetro se determina el tiempo que permanece el influente dentro del reactor aeróbico para ser degradado. La Figura 7 muestra el TRH durante todo el periodo de operación de la laguna aeróbica.

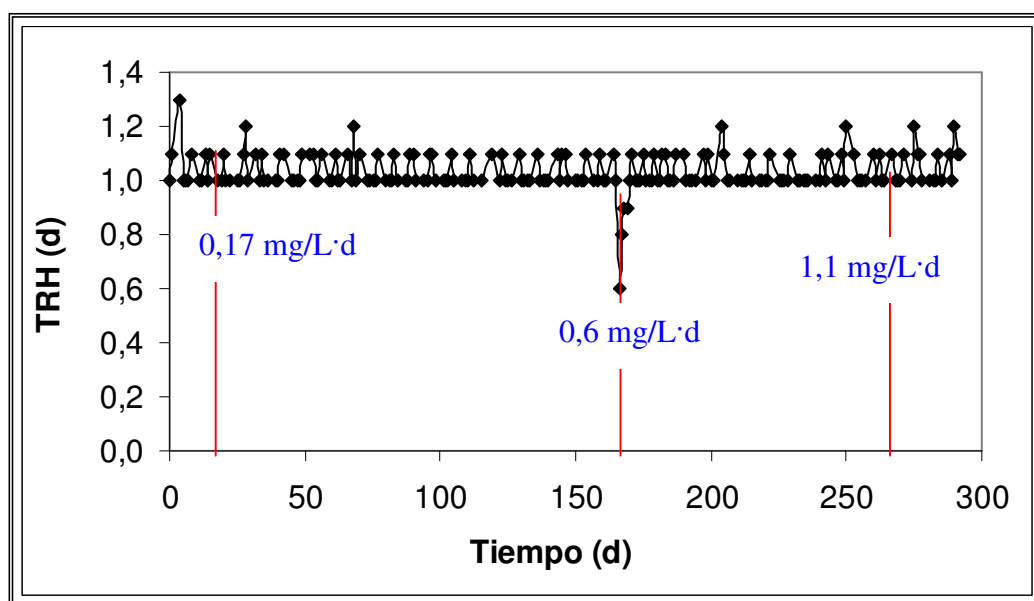


Figura 7. Indica el tiempo de retención hidráulico medido en días en laguna aeróbica en los 275 días de operación del sistema, indicando el tiempo que se realizó las distintas VCE.

La estrategia de operación fue mantener el TRH estable durante todo el proceso de operación con un rango promedio de alrededor de 1 día. Sin embargo, se observan pequeñas variaciones (0,2 d) producidas por desestabilizaciones luego del fin de semana, en el día 166 existe la máxima variación, cuando se cambia la VCE a 0,6 mg/L·d, y se comienza con una TRH de 0,6 día, este cambio se produce por una desestabilización de la biomasa, lo cual se atribuye a que durante 114 días la laguna aireada se mantuvo inactiva (Figura 7).

La VCO indica la carga total de influente que se agregó diariamente. Mediante este parámetro se determina la eficacia general de sistemas de tratamiento sea este aeróbico ó anaeróbico. La Figura 8 muestra la evolución de la VCO durante la operación de la laguna aeróbica.

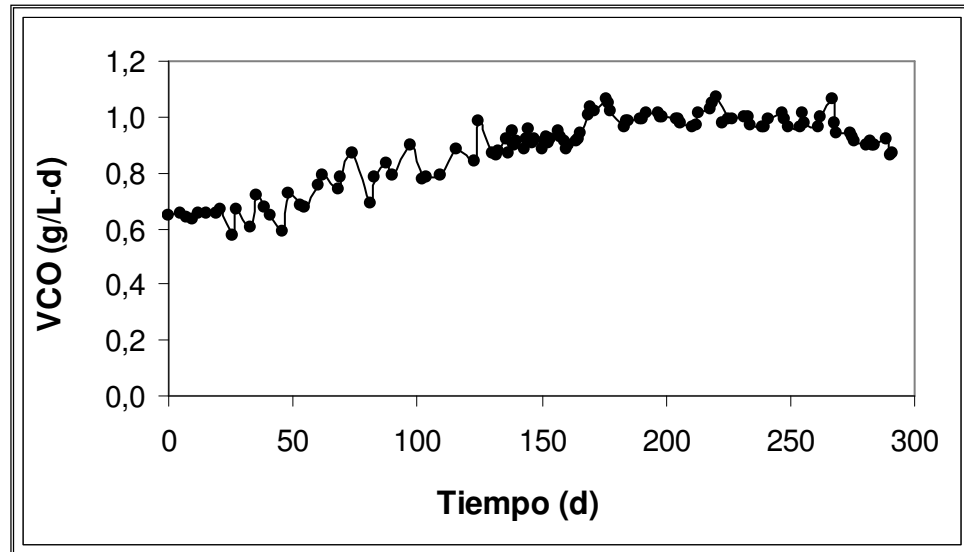


Figura 8. Velocidad de carga orgánica en laguna aeróbica a través del tiempo.

La VCO de la laguna indica la carga total que se agrega por día. Durante la primera fase (165 días) se presentan valores que fluctúan entre 0,6-0,9 gDQO/L·d con un promedio de 0,9 gDQO/L·d (Figura 8), la segunda fase comprende 101 días de operación, se observa que la VCO incrementa a 1,01 gDQO/L·d, con un promedio de 1,0 gDQO/L·d debido al incremento de la VCE. En la tercera fase (27 días de operación) el valor promedio decae a 0,92 gDQO/L·d. Sin embargo, el promedio de VCO durante todo el periodo de estudio se mantiene alrededor de 1,0 gDQO/L·d.

Por su parte en la Figura 9 se observa el rango de la VCE de 0,15 mg estigmasterol /L·d a 1,2 mg estigmasterol/L·d. Este parámetro, conjuntamente con el THR y la VCO, conforman los principales parámetros de operación de un sistema de tratamiento.

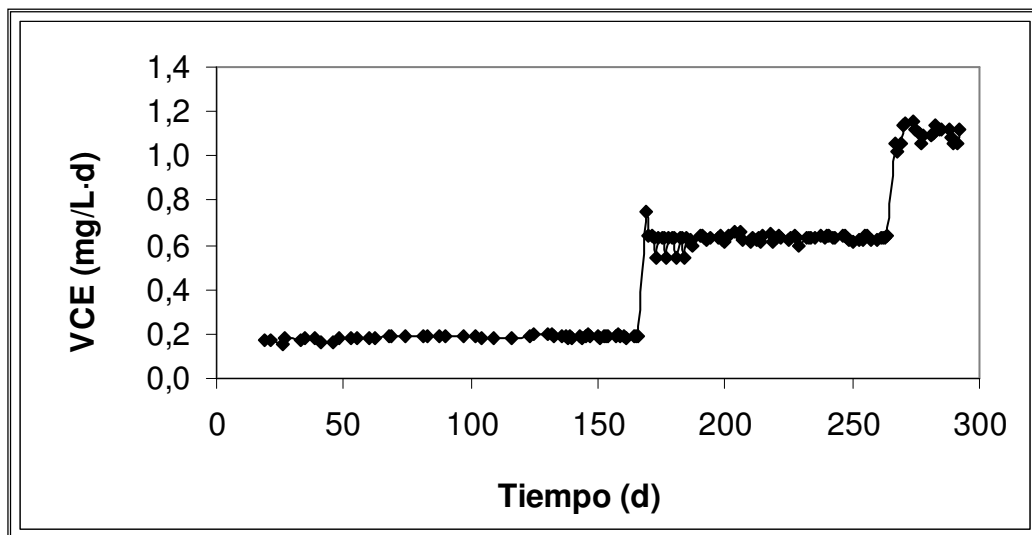


Figura 9. Velocidad de carga del estigmasterol a través del tiempo en laguna aeróbica.

La Figura 9 muestra los cambios de la VCE realizados en el tiempo de operación. Se observa que existen 3 fases bien marcadas en la VCE, comenzando de 0,17 mg/L·d, para posteriormente incrementar a 0,6 mg/L·d y terminar en una concentración máxima de 1,2 mg/L·d. Esta estrategia de operación se determinó para observar la eliminación del estigmasterol.

El pH juega un rol importante dentro de los sistemas biológicos, ya que determina el rango óptimo para la supervivencia y eficiencia de degradación del influente en los reactores secundarios. Este parámetro, afecta directamente a las bacterias, quienes son las principales responsables de la eficacia de degradación de los sistemas aeróbicos como anaerobios. Se observa en la Figura 10, las variaciones de pH del influente y efluente en la laguna aeróbica.

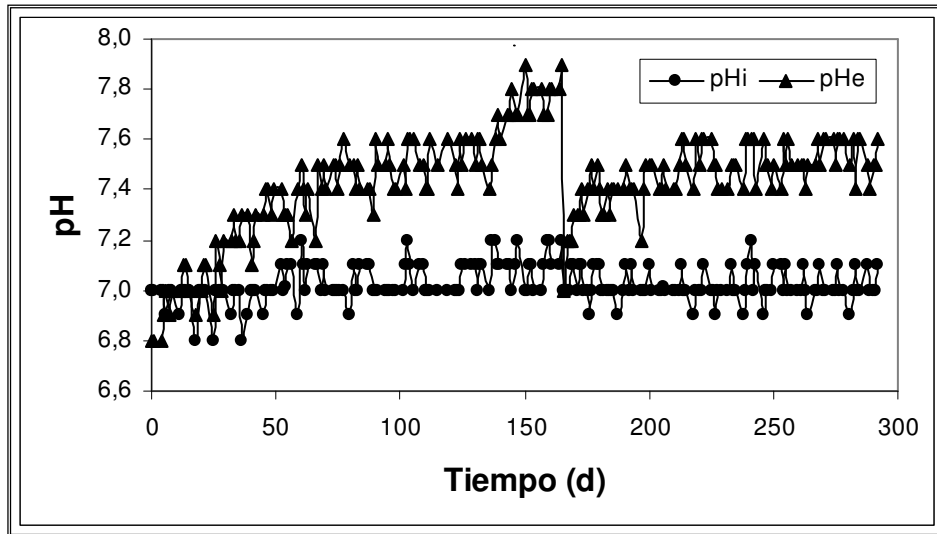


Figura 10. Variación del pH del influente y efluente en laguna aeróbica través del tiempo.

El influente presenta valores que se mantienen alrededor de 7,0, valor óptimo encontrado dentro del rango de eficiencia para estos organismos (6,5-8,0). Las desviaciones encontradas son producidas luego del fin de semana. Mientras que, el efluente refleja un aumento creciente, llegando a valores máximos de 7,9 durante la primera VCE. Se observa un decaimiento en el día 166, periodo en que comienza nuevamente a trabajar el reactor aeróbico (periodo de latencia 114 días) y la fase de adaptación de la biomasa al influente de celulosa kraft. En la segunda y tercera fase el valor máximo alcanzado fue de 7,6.

El aporte y difusión de oxígeno disuelto (Figura 11), es fundamental dentro de sistemas biológicos aeróbicos, aportando el medio adecuado para el desarrollo de los microorganismos, y por ende para la eficiencia general del sistema.

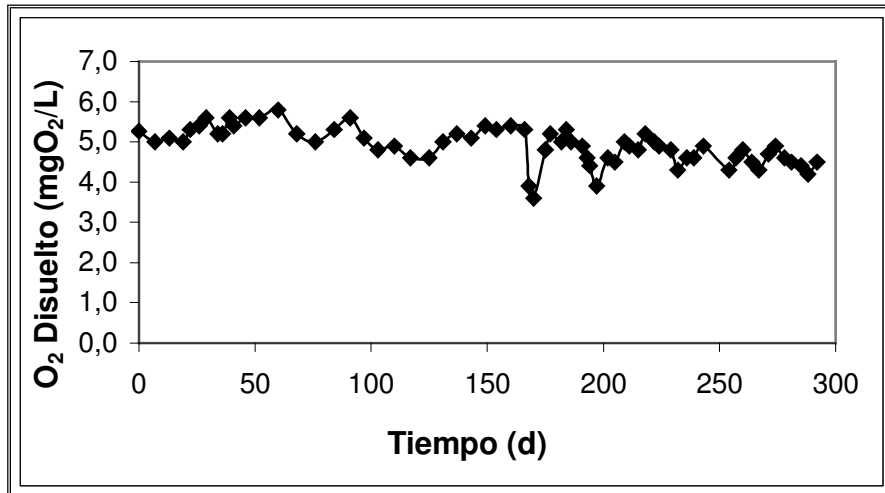


Figura 11. Concentración de oxígeno disuelto en laguna aeróbica a través del tiempo.

La concentración de oxígeno disuelto en la Figura 11 se mantiene estable durante toda la etapa de operación con valores superiores a 2 mgO₂/L, obteniéndose un valor medio de 4,9 mgO₂/L.

5.2. Parámetros de eficiencia en la operación

La DBO₅ es originada por la presencia de compuestos fácilmente biodegradables, tales como los carbohidratos y los ácidos orgánicos (Vidal, 1999). Su determinación tiene relación con la medición del oxígeno disuelto que consumen los microorganismos en el proceso de oxidación bioquímica de la materia orgánica durante 5 días. Mientras que, la DQO evalúa el equivalente de oxígeno de la materia orgánica que puede oxidarse. La Figura 12 muestra las eliminaciones de DQO y DBO₅.

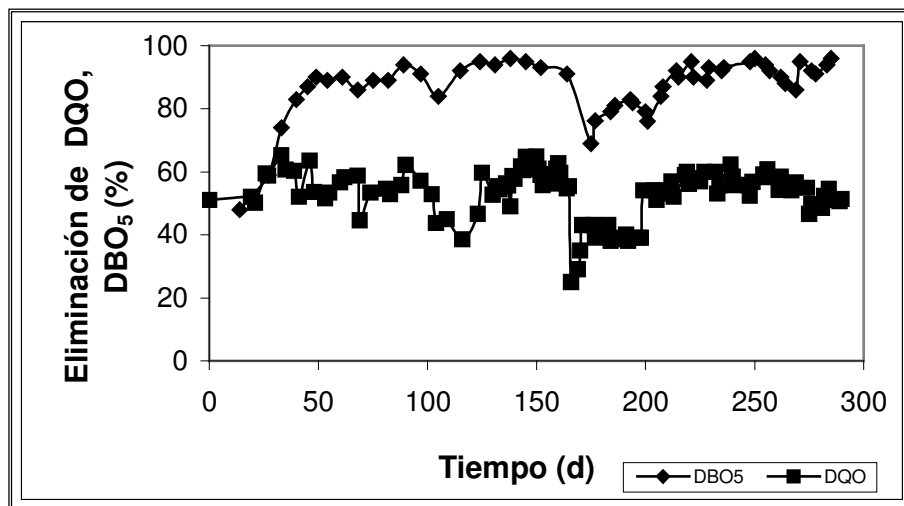


Figura 12. Eliminación de DBO₅ y DQO en laguna aeróbica a través del tiempo.

La eliminación de DQO fluctuó entre 38,5 y 65,2 % durante la primera etapa de operación, mientras que la segunda etapa el rango se mantuvo entre 25 y 62,3 % para la DQO, presentando el valor más bajo de todo el experimento. En la tercera fase se observa que existe una eliminación alrededor del rango de 46,7-56,6 % (Figura 12). Sin embargo, La DBO₅ mostró valores máximos sobre el 95 %, la mayor parte de la operación de la laguna. El valor promedio fue de 87,7 %.

Los fenoles totales pueden ser generados por residuos de lignina, y contener numerosos compuestos que van de alto peso molecular como los clorofenoles a compuestos simples, siendo eliminados en baja proporción por sistemas aeróbicos como se observa en la Figura 13. Estos compuestos no poseen toxicidad, pero si contribuyen en forma directa al color final del efluente de celulosa.

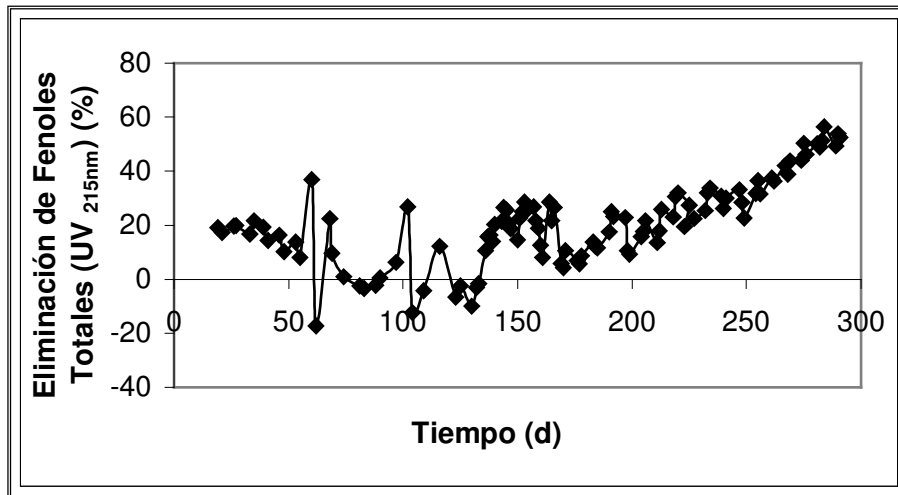


Figura 13. Eliminación de fenoles totales en laguna aeróbica a través del tiempo.

La tendencia a tener una baja degradación se presenta en la primera etapa de operación con un máximo de 38 % y un valor medio de 13 %, a partir del día 62 se produce un incremento de fenoles hasta el día 133, probablemente debido a que la alimentación de la laguna aeróbica se realizó con un efluente distinto al original. En la segunda fase se observan valores similares, presentando una eficacia de remoción promedio de 21,9 %, y un máximo de 42 %, mientras que, en la tercera fase se observa que la eliminación aumenta considerablemente, observándose valores máximos de 56,5 %, con un valor medio de remoción de 48,3 %.

Los valores en la región UV-visible se pueden usar como indicativos de parámetros de algunos grupos químicos (Çeçen, 2003) y su comportamiento en el sistema. Estos pueden ser a través de técnicas de espectrofotometrías y su interpretación puede entregar información respecto de la biodegradación de dichos compuestos en efluentes de celulosa kraf (Langergraber *et al.*, 2004). El color puede ser medido a través de la absorbancia a una longitud de onda de 436 y 400 nm como se observa en la Figura 14 y 15.

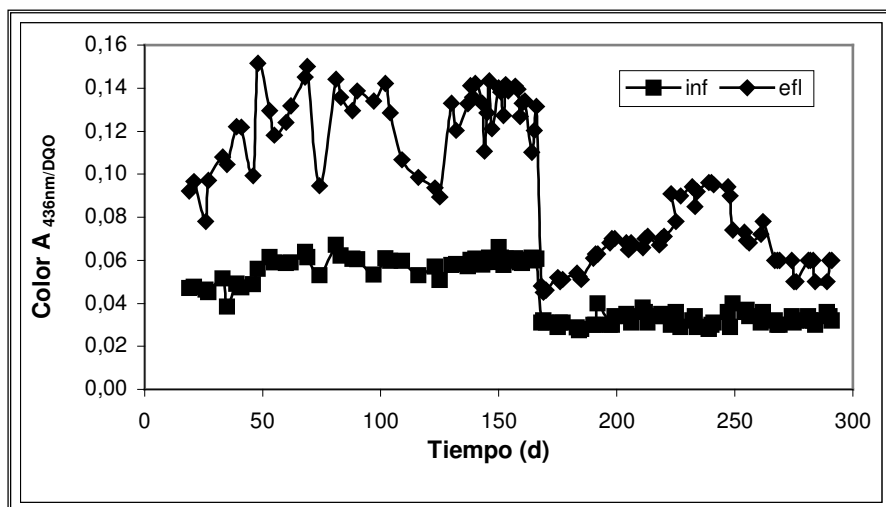


Figura 14. Variación del color a absorbancia 436 nm en laguna aeróbica a través del tiempo.

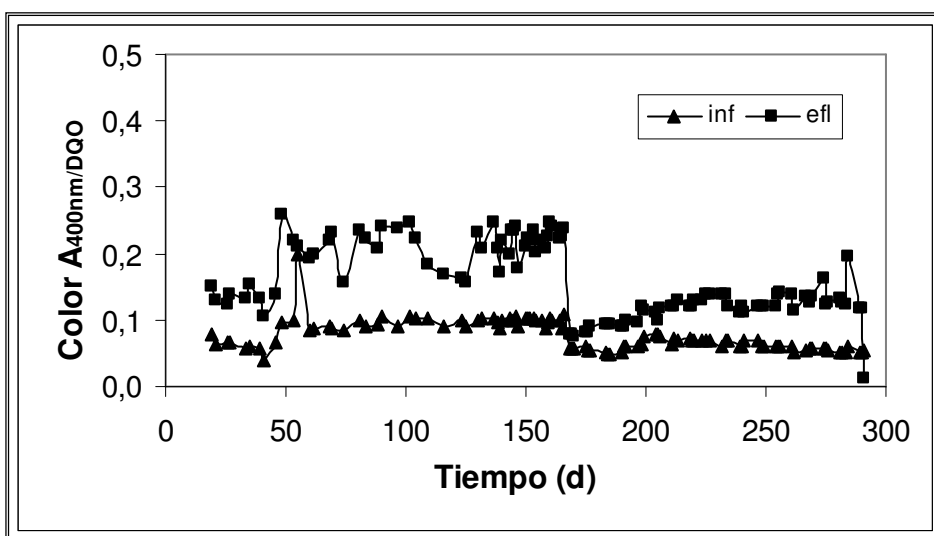


Figura 15. Variación del color a absorbancia 400 nm en laguna aeróbica a través del tiempo.

Las relaciones $A_{436\text{nm}}/\text{DQOs}$ y $A_{400\text{nm}}/\text{DQOs}$ (Figura 14 y 15 respectivamente), representan el color en efluentes tratados de celulosa kraft. Altos valores son indicativos de una reducción de este parámetro menor, que la degradación de la materia orgánica. Los resultados demuestran que en la primera fase existen pequeñas variaciones del color (aproximadamente 0,2), indicando que se está eliminando en baja proporción. Sin embargo, esta tendencia al aumento

decae en la última fase, indicando que el color estaría siendo eliminado en una proporción mayor que las primeras etapas.

El ácido lignosulfónico es un componente residuo de la lignina fraccionada, mediante el tratamiento aeróbico. En la Figura 16, se observa la poca variación de este parámetro dentro del sistema biológico.

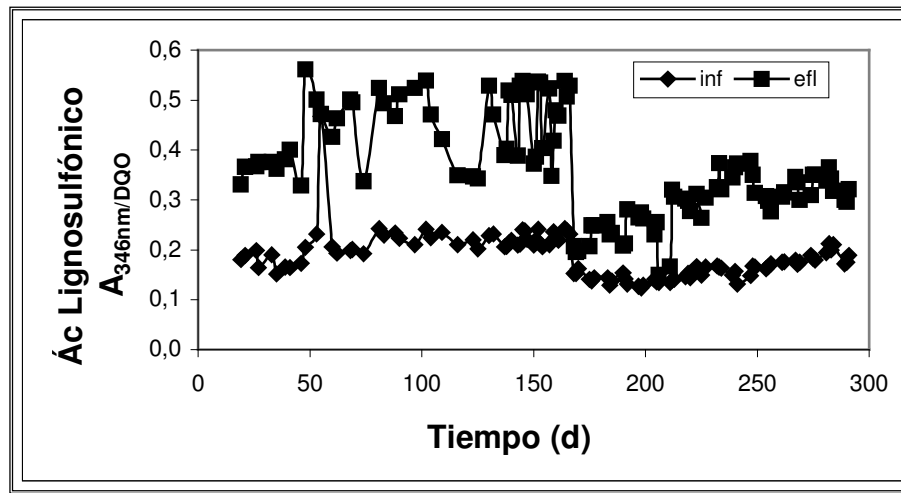


Figura 16. Comportamiento del ácido lignosulfónico en la laguna aeróbica a través del tiempo.

El cociente $A_{346nm}/DQOs$ (Figura 16) representa al ácido lignosulfónico, presente en los efluentes, se muestra que en la primera fase existen variaciones, siguiendo el patrón del color. Sin embargo, en la segunda y tercera fase se muestran aumentos de valores (0,207-0,378), indicando que este compuesto fue reducido en menor grado que cualquier otro material orgánico.

La baja biodegradabilidad de la lignina, es uno de los principales problemas que ha afectado durante años y que actualmente afecta a los efluentes de celulosa kraft. Esto es confirmado por Diez *et al.* (2002), quien señala que la lignina como los taninos, no son fácilmente biodegradables en ambientes aerobios. La Figura 17 y 18 muestran el comportamiento en el tiempo de la lignina en la laguna aeróbica.

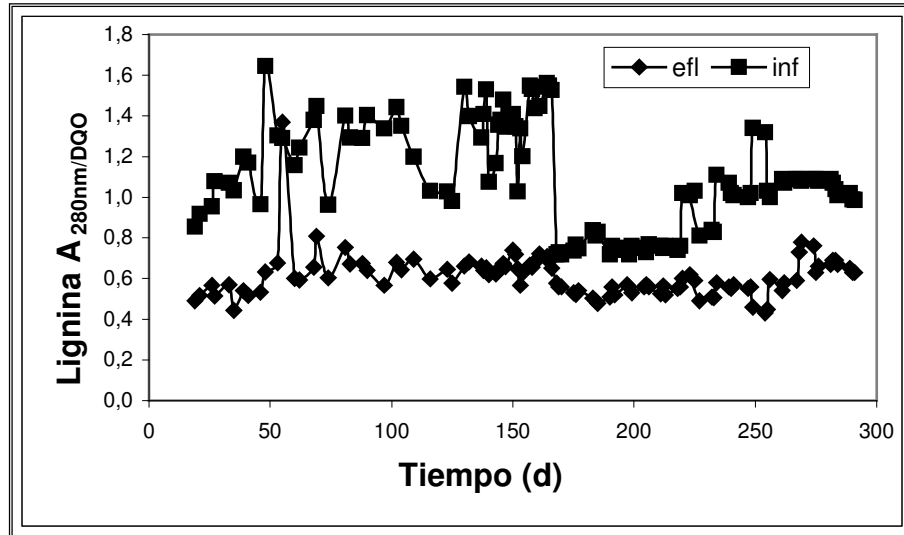


Figura 17. Comportamiento de la lignina a la absorbancia 280 nm en la laguna aeróbica a través del tiempo.

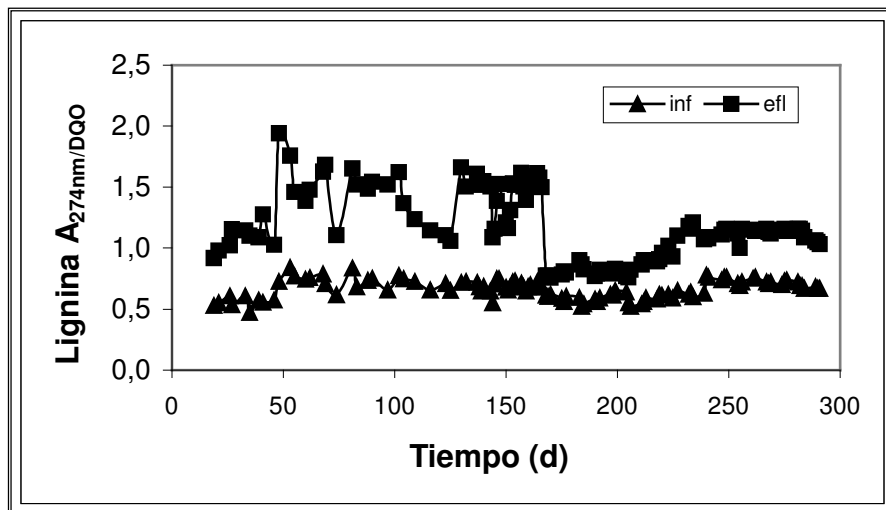


Figura 18. Comportamiento de la lignina a la absorbancia 274 nm en la laguna aeróbica a través del tiempo.

La variación de la fracción $A_{280nm}/DQOs$, $A_{274nm}/DQOs$ (Figura 17 y 18, respectivamente) indica una baja degradación de la lignina, ya que durante la primera fase existen pequeñas

variaciones (0,83) que podrían indicar una eliminación. Sin embargo, en la segunda y tercera carga casi no existe variación de estos compuestos.

En la Figura 19, se observa el comportamiento de los derivados de lignina, estos compuestos generalmente presentan un bajo peso molecular (<1.000 Da).

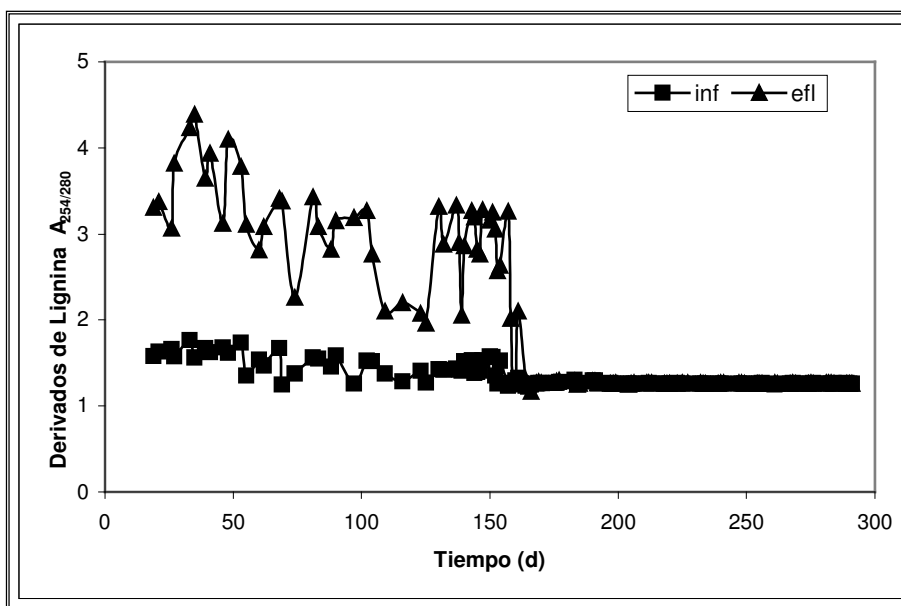


Figura 19. Variación de los derivados de lignina en laguna aeróbica a través del tiempo.

Los compuestos derivados de lignina ($A_{254/280}$) presentaron la máxima variación. Valores altos indican un porcentaje menor de estos compuestos en el efluente (Çeçen, 2003), de esto podemos deducir que la lignina no está siendo degradada en un alto porcentaje por este tratamiento biológico, esto puede ser observado en la primera etapa de operación (2,26-4,29) mientras que, la segunda y tercera etapa muestran una leve tendencia al aumento de estos compuestos (1,26-1,30).

En cuanto a los compuestos aromáticos medidos como $A_{254nm}/DQOs$ (Figura 20) no se presentó variación significativa o una tendencia a la eliminación de estos compuestos. Estos resultados concuerdan con lo explicado por Chamorro *et al.* (2005).

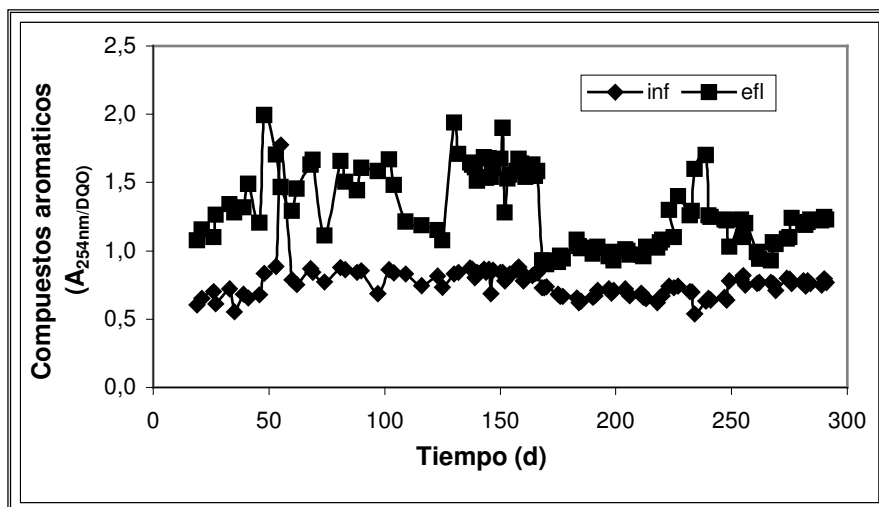


Figura 20. Variación de los compuestos aromáticos en laguna aeróbica a través del tiempo.

5.3. Degradación de Estigmasterol

La Tabla II presenta la eliminación del estigmasterol a través de la laguna aireada durante dos etapas, en la cual se observa que a baja VCE y VCO de la laguna, existe un aumento promedio de 33 % en la producción del estigmasterol. Sin embargo, al incrementar la VCE se produce una eliminación del fitoesterol, sobre el 90 % en la segunda etapa de la VCO.

Tabla II. Eliminación de estigmasterol en laguna aeróbica indicando el tiempo de operación.

Tiempo de operación (d)	VCO (gDQO/L·d)	VCE (mg/L·d)	Concentración entrada (mg/L)	Concentración salida (mg/L)	Eliminación de Estigmasterol (%)
140	0,763	0,18	0,28	0,35	-29
163	0,13	0,19	0,28	0,39	-37
235	1,01	0,60	0,63	0,05	95
246	0,99	0,62	0,57	0,03	97

5.4. Determinación de la biodegradación del efluente a través de ultrafiltración

Con el fin de conocer en mayor detalle el comportamiento de las distintas fracciones de los compuestos en los efluentes, antes y después del tratamiento aeróbico y la degradación ejercida por parte de *D. magna*, sobre el efluente en un bioensayo agudo, se procedió a fraccionar el influente y los distintos efluentes en cuatro fracciones mediante el método de ultrafiltración. La Figura 21 y Tabla III muestra en forma comparativa la DQO, color, fenoles totales UV_{215nm}, y lignina A_{440nm} en cada una de las fracciones.

La lignina es uno de los mayores componentes presentes en el influente, sobre 80 %, al igual que el color 88 %, y fenoles totales 72 % (Figura 21 a) concentrado en la fracción molecular mayor a 10,000 Da. La eficiencia de degradación de lignina por tratamientos aerobios se encuentra alrededor del 56,7 % (Figura 21 b).

El componente principal encontrado en la fracción menor a 1,000 Da en el influente son los derivados de lignina. Alrededor del 15 % de la DQO presente en el influente es biodegradada por la laguna aeróbica. Con esto se confirma que, un alto porcentaje de DQO cerca del 50 % permanece en el efluente (Tabla III) sin ser degradada o transformada a moléculas más pequeñas. La fracción biodegradada de la DQO en el efluente se encuentra principalmente dentro de la fracción 10.000-5.000 Da (42,18 %) (Figura 21 b).

El color, y fenoles totales en el efluente, comprende valores de remoción de 56,3 % y 43,5 % respectivamente, observando que la mayor biodegradación se realiza en los fenoles hacia la fracción entre 10.000-5.000 Da y <1.000 Da. También, los compuestos aromáticos son degradados de la mayor fracción hacia 10.000-5.000 Da.

En el efluente después del bioensayo agudo (Figura 21 c) se observa que los componentes del color, fenoles totales y DQO se encuentran dentro de la fracción mayor a 10,000 Da. Sin embargo, en el efluente preparado para el bioensayo se observan valores menores para los parámetros mencionados (Tabla III).

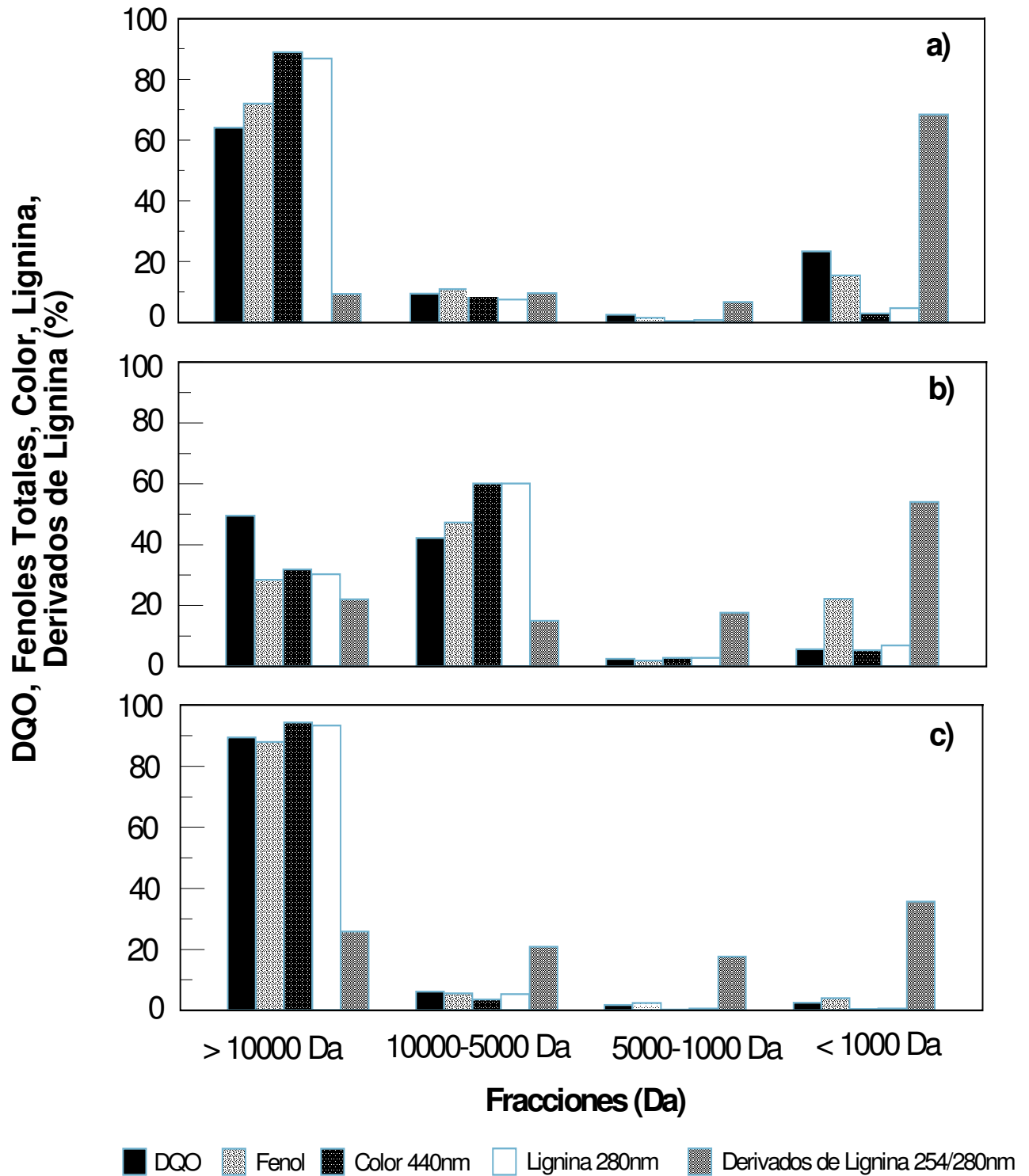


Figura 21. Ultrafiltración del a) influente, b) efluente, y c) efluente tratado después del bioensayo.

Los blancos utilizados, sea el tratado para y después del bioensayo, se verifica que la DQO se degrada en pequeños porcentajes y que los fenoles totales se encuentran dentro de todas las fracciones. El fenómeno de aumento de fracción molecular mediante el tratamiento se observa nuevamente en el color (Tabla III).

5.5. Evaluación de la toxicidad

Los bioensayos de toxicidad son una herramienta efectiva en la evaluación del efecto de los agentes químicos, tanto en forma individual como de mezclas complejas (Gaete *et al.*, 1999). Las especies de mayor importancia para los bioensayos son las más sensibles, ya que establecen las concentraciones máximas permisibles para las descargas al medio, sin que se produzca un daño irremediable al ambiente. Se considera que los efectos producidos en los organismos de prueba constituyen una advertencia de las posibles repercusiones en la salud humana. La Tabla IV, muestra la reducción de toxicidad por medio de laguna aireada mediante ensayos agudos, expresada en unidad de toxicidad LC_{50} (%). Se observa que el influente puro reduce menos la toxicidad que el efluente combinado con estigmasterol, una reducción de la toxicidad se observa a medida que aumenta la VCE en el influente.

Tabla IV. Toxicidad aguda del influente y efluentes expresada en unidad de toxicidad LC₅₀.

Muestra	Tiempo de Operación (d)	Influente LC ₅₀ (%)	Efluente LC ₅₀ (%)
Influente sin Estigmasterol	6	23,12	40,64
Influente (Estigmasterol 0,2 mg/L·d)	50	31,90	88,20
Influente (Estigmasterol 0,6 mg/L·d)	178	33,95	N.D
Influente (Estigmasterol 1,1 mg/L·d)	271	34,21	N.D

señalando los distintos tiempos de operación.

5.6. Biomasa

5.6.1. Actividad de la biomasa

Una desventaja de los tratamientos biológicos como es el caso de laguna aireada, es la producción de biomasa y su disposición final. Según la Tabla V, la concentración de la biomasa varió en un rango de 5,04 a 9,08 gSSV durante el primer período. El segundo período comenzó con 5,6 gSSV, el cual se incrementó a 5,9 gSSV en 10 días, terminando con 9,79 gSSV al término del experimento. La actividad de la biomasa se midió a través de la respirometría (Tabla V) que muestra la actividad de los microorganismos en función de la VCO. Se observa en todo el tiempo de operación un consumo específico de oxígeno. Comparando la puesta en marcha de la biomasa (día 1-54) con la reiniciación de la laguna (día 167-173), se observa que la primera fase comienza con una mayor velocidad de consumo, sin embargo, se termina ambas etapas con similar velocidad 33,6 mgO₂/L/min·gSSV (día 166) y 32,0 mO₂/L/min·gSSV (día 312).

Tabla V. Velocidad de consumo de oxígeno de la biomasa y velocidad de consumo específico por microorganismos en función de la VCO, indicando los tiempos de operación.

Tiempo de operación (d)	VCO Prom. (gDQO/L·d)	Biomasa (SSV)	Velocidad de consumo de O ₂ (g O ₂ /L·min)	Velocidad de consumo de O ₂ específica (mgO ₂ /L/min·gSSV)
1-54	0,65	5,04	0,09	1,72
55-110	0,78	7,61	0,26	25,7
111-166	0,91	9,08	0,34	33,6
*114	—	—	—	—
167-173	1,01	5,64	0,12	12,0
174-184	0,98	5,98	0,18	17,0
185-234	0,99	6,53	0,26	25,6
235-275	1,0	7,52	0,27	27,0
275-312	1,0	9,79	0,32	32,0

* Días de inactividad de la laguna aeróbica. Este valor se integra para explicar la baja de biomasa en el reactor.

5.6.2. Caracterización de la microfauna contenida en la biomasa

En el reactor biológico aeróbico se generan una serie de relaciones tróficas en función de las características del influente y de las condiciones ambientales y operacionales (Audrá y Almeida, 2000). Los parámetros determinantes dentro de las características del influente son los nutrientes, DQO y DBO₅ (Rodríguez *et al.*, 2005). La diversidad biótica presente en lodo, está constituida fundamentalmente por los grupos de bacterias, protozoos y pequeños metazoos.

Se identificaron 16 especies en todo el proceso de operación dentro del reactor, estas se agruparon en clase, llegando a nivel de género (Tabla VI).

Tabla VI. Lista de organismos a nivel de género encontrados en laguna aeróbica a través del tiempo.

Clase	Géneros según las distintas VCO (gDQO/L·d)		
	0,6	0,9	1,0
Ciliata	<i>Paramecium sp</i>	<i>Paramecium sp</i>	<i>Paramecium sp</i>
Subclase Holotrichia (ciliado libre natantes)			
	<i>Aspidisca sp</i>	<i>Aspidisca sp</i>	
Sub clase Spirotrichia (ciliados de vida libre reptantes)	<i>Euplotes sp</i>		
	<i>Spirostomus sp</i>	<i>Spirostomus sp</i>	<i>Spirostomus sp</i>
	<i>Colpidium sp</i>		
Subclase Peritrichia (ciliado pedunculado)	<i>Vorticella sp</i>	<i>Vorticella sp</i>	<i>Vorticella sp</i>
	<i>Diffflugia sp</i>		
	<i>Arcella sp</i>	<i>Arcella sp</i>	<i>Arcella sp</i>
Sarcodina (Amebas)	<i>Cochilippodium sp</i>	<i>Cochilippodium sp</i>	<i>Cochilippodium sp</i>
	<i>Euglypha sp</i>	<i>Euglypha sp</i>	<i>Euglypha sp</i>
Mastigophora (flagelados)	<i>Peridinium sp</i>		
Nematoda	<i>Diplogaster sp</i>	<i>Diplogaster sp</i>	<i>Diplogaster sp</i>
Rotifera	<i>Lecane sp</i>	<i>Lecane sp</i>	<i>Lecane sp</i>
	<i>Colurella sp</i>		<i>Colurella sp</i>
Cianophyceae	<i>Oscillatoria sp</i>	<i>Oscillatoria sp</i>	<i>Oscillatoria sp</i>
Chlorophyceae	<i>Ankistrodesmus sp</i>		

Dentro de los géneros encontrados, *Aspidisca sp* (Figura 22 c) ciliado libre reptante estuvo presente durante la primera fase del experimento y el inicio de la segunda VCE, indicando una baja carga orgánica y un buen proceso depurador, en conjunto con *Spirostomus sp*.

La presencia de *Vorticella sp* (Figura 22 b) se observa a lo largo de todo el proceso de operación, evidencia que los cambios de VCE no fueron significativos para producir una desestabilización de este grupo, el cual ha sido indicado como una herramienta para evaluar altas cargas orgánicas (Sponza, 2003).

Flagelados como *Peridinium sp* están presentes en el inicio del experimento, debido a la puesta en marcha reflejando inicios de un lodo joven.

Amebas con teca como *Cochilippodium sp* y *Euglypha sp* (Figura 22 d); y sin teca como *Arcella sp*, se presentan durante toda la operación del reactor, ellas generalmente se asocian a un contenido de baja carga orgánica, e indican la presencia de una alta concentración de oxígeno disuelto.

Rotíferos como *Lecane sp* (Figura 22 a) reflejan un sistema en equilibrio. Cuando se encuentra en abundancia indica una desestabilización del lodo, lo cual ocurre cuando se tiene una velocidad de carga orgánica de 1,0 gDQO/L-d, debido probablemente a la mayor entrada del fitoesterol.

Diplogaster sp (Figura 22 a) por su parte, aparece en la segunda fase del experimento en pequeñas proporciones, indicando que el lodo aun no es viejo.

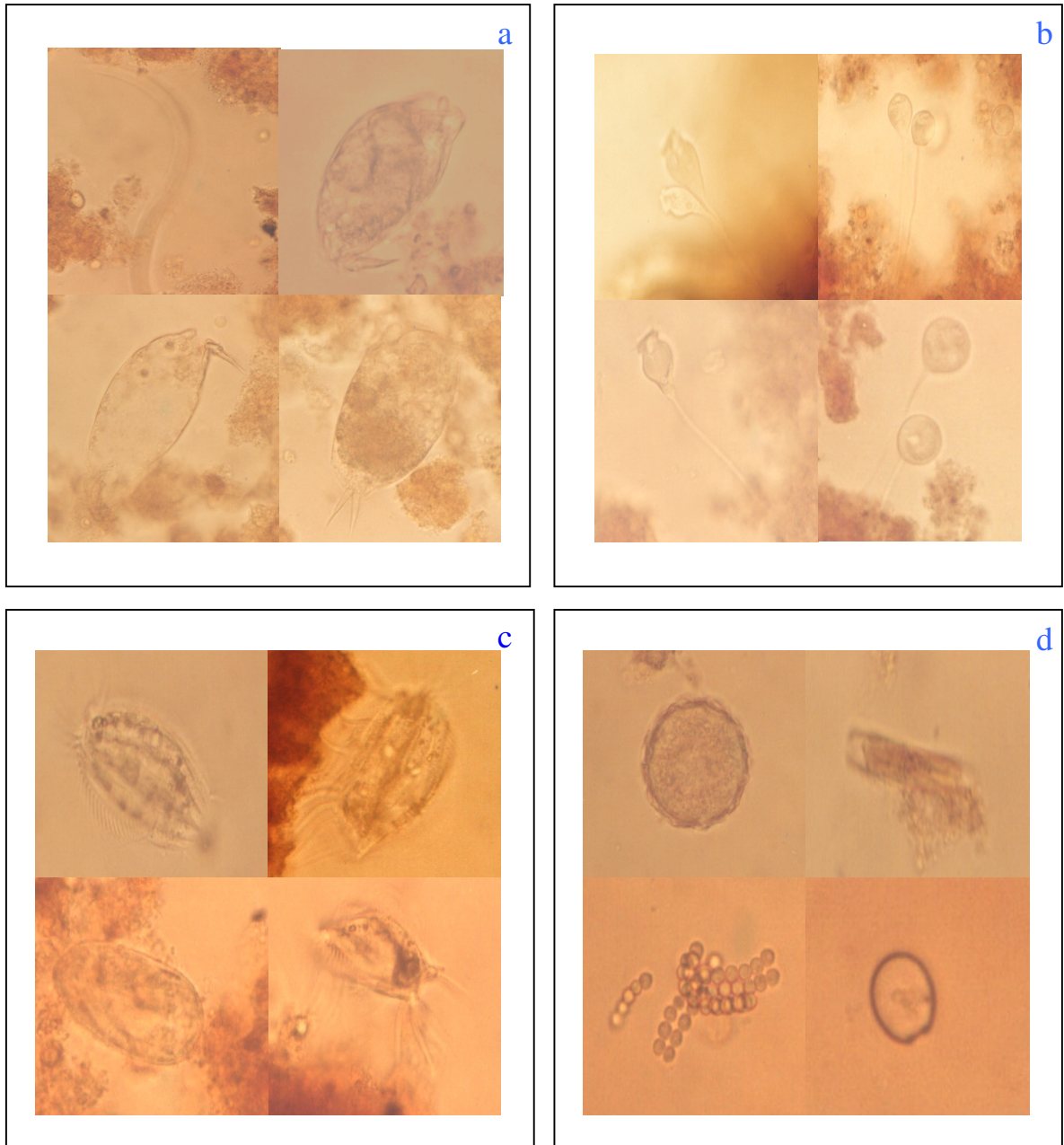


Figura 22. Cadena trófica en sistema de laguna aireada, **a)** 4^{to} eslabón (Nematodos–Rotíferos), **b)** 3^{er} eslabón ciliados carnívoros (Vorticellidos), **c)** 2^{do} eslabón protozoos ciliados micrófagos, (Spirostomidos) **d)** 1^{er} eslabón bacterias floculantes dispersas (Algas–Amebas tecadas y desnudas).

6. DISCUSIÓN

6.1. Parámetros de eficiencia

El TRH es uno de los parámetros más importantes en conjunto con la VCO, ya que ellos determinan la eficiencia general del sistema. En la Figura 7, se observa que el TRH se mantiene alrededor de 1 día, esta estrategia de operación fue realizada para verificar la degradación del estigmasterol en condiciones uniformes. Por otro lado, la máxima variación se presentó el día 166 debido a la inactividad de la laguna aeróbica. Este parámetro también está estrechamente relacionado con la VCO y VCE, ya que ellos determinan la cantidad de carga que ingresa al sistema diariamente.

La VCO por su parte (Figura 8), presentó en la primera fase un promedio de 0,92 gDQO/L·d mientras que, en la segunda fase la VCO se ve incrementada a 1,01 gDQO/L·d, esta relación coincide con el aumento registrado en la VCE (Figura 9), las cuales en su primera fase presentan un valor promedio de alrededor de 0,2 mg/L·d, a 0,6 mg/L·d en la segunda etapa.

Otro parámetro importante a considerar dentro de los sistemas aeróbicos lo determina el pH, quien refleja las condiciones de la biomasa. La figura 10, demuestra que el pH del influente se mantuvo alrededor de 7, el cual se considera valor óptimo para la sobrevivencia, desarrollo y eficacia de degradación de las bacterias presentes en la laguna, este valor concuerda con el funcionamiento óptimo del sistema, el cual se encuentra dentro del rango de 6,5 a 8,0. Por su parte el pH del efluente presenta una tendencia al aumento, llegando a un valor máximo de 7,8 en la primera etapa. Este aumento se debe a la disociación de iones bicarbonatos del agua que al liberar el dióxido de carbono necesario para las algas, también libera iones hidroxilo responsable de este aumento (Rolim, 2002).

La mantención del oxígeno disuelto sobre los 2 mgO₂/L dentro de los tratamientos aeróbicos es fundamental, ya que aporta condiciones favorables para el mantenimiento de los microorganismos presentes (Reis y Piropo, 2000), y sobre todo para las bacterias aeróbicas quienes son las verdaderas responsables de la estabilización de la materia orgánica y la

floculación del sistema. Se observa en la Figura 11, que la concentración de oxígeno disuelto se mantiene sobre los 4 mgO₂/L, aportando condiciones favorables para la biodegradación.

6.2. Parámetros de eficiencia de operación

En general, el tratamiento biológico por bacterias aeróbicas reportó una eficiencia entre un 48 y 96 % para la DBO₅ y entre un 25 a 65,2 % en la DQO. Sin embargo, existe una fracción de DQO recalcitrante que no es posible ser eliminada mediante tratamientos en base a laguna aireadas, esta baja degradabilidad puede estar asociada al aumento de concentración del estigmasterol (VCE = 1,1mg/L·d), en tanto la fracción recalcitrante de DQO en el efluente puede ser atribuida a la presencia de compuestos lignínicos, responsables del color final de éstos (Xavier *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2001). Por otro lado, la fracción no biodegradable se refleja en la poca disminución del color en el efluente aún después de ser tratado (Reis y Piropo, 2000).

Los fenoles totales observados en la Figura 13, presentan una baja eliminación dentro de la primera etapa de operación del reactor (38 % valor máximo). Sin embargo, a partir del día 62 se observa que no existe eliminación, mas bien hay una generación de fenoles, alrededor de 17,3 %, esta tendencia se presenta hasta el día 133. Probablemente esto se debe a que la alimentación de la laguna aeróbica se realizó con un efluente distinto al original. En la segunda etapa, el porcentaje promedio de eliminación fue de 21,9 %, similar al visto en la primera etapa, mientras que, en la tercera fase se observa que la eliminación aumenta considerablemente, observando un valor medio de remoción de 48,3 %. De los valores encontrados se puede deducir que el incremento de la VCE no es un factor determinante en la eliminación de estos compuestos, ya que al aumentar la carga hormonal se esperaría encontrar una menor eliminación de fenoles totales.

La relación $A_{436} / A_{400 \text{ nm}}$ (Figura 14 y 15, respectivamente) dividido por su coeficiente de DQO representa el color en la laguna aeróbica. Bajos valores son indicativos de una eliminación mayor que la materia orgánica. Los resultados demuestran que en la primera fase existen pequeñas variaciones del color (aproximadamente 0,2), lo cual podría dar un indicio que existe una eliminación de estos compuestos en baja proporción, mientras que, en la segunda etapa

hay una tendencia al aumento de estos valores, no observando una eliminación dentro de este sistema, este comportamiento pudo ser ocasionado por el aumento de VCO y VCE. Sin embargo, esta tendencia decae en la última fase, indicando que el color estaría siendo eliminado en una proporción mayor que las primeras dos etapas. Por otro lado, la baja degradación del color en este tipo de efluentes está relacionado con la fracción no biodegradable (recalcitrante) de la DQO y la alta presencia de compuestos lignínicos de elevado peso molecular (>10.000 Da).

El ácido lignosulfónico se observa en la Figura 16. La primera etapa de operación podría demostrar una reducción de este compuesto, ya que altos valores (sobre 0,4) indican que el ácido lignosulfónico está siendo degradado en un porcentaje mayor a cualquier otro compuesto orgánico. Sin embargo, esta tendencia decae en la segunda y tercera fase, indicando una reducción en menor grado que cualquier otro material orgánico.

La baja biodegradabilidad de la lignina, es uno de los principales problemas que ha afectado durante años y que actualmente se presenta en los efluentes de celulosa kraft. Se observa en la Figura 17 y 18, que la lignina contenida en el influente y efluente no presentó variación durante todo el proceso de operación, demostrando que los tratamientos biológicos aerobios no son los más adecuados para la eliminación o transformación de este parámetro.

Por su parte, valores bajos de los compuestos derivados de lignina, indican una eliminación en el sistema (Figura 19). La máxima variación se presentó en la primera etapa (1,96 - 4,39), indicando que no existe una degradación, mientras que, la segunda y tercera etapa muestra una tendencia al aumento de estos compuestos (1,26 - 1,27), demostrando que la lignina estaría siendo removida en bajo porcentaje. Sin embargo, en la tercera fase estos valores permanecen inalterables, debido a dos posibles factores: (i) que la lignina no está siendo degradada y (ii) posible saturación de la biomasa, lo cual se demuestra con valores constantes a través del tiempo.

En cuanto a los compuestos aromáticos medidos como $A_{254nm}/DQOs$ (Figura 20) no existen estudios acabados para explicar la remoción de este tipo de compuestos.

6.3. Degradación del estigmasterol

La Tabla II demuestra la biodegradación del estigmasterol mediante el tratamiento por laguna aireada. En la primera fase ocurre un aumento de este compuesto de 29 y 37 % cuando la VCE es mínima. Por el contrario, cuando se incrementó la VCE (0,6 mg/L·d) ocurre una eliminación sobre el 90 % de este fitoesterol. Los resultados indican que la biodegradación del estigmasterol depende de la adaptación de la biomasa, velocidad de carga del compuesto, la concentración de oxígeno y la hidráulica del sistema.

Esta tendencia al aumento del estigmasterol, ha sido confirmada por autores como Cook *et al.* (1997), quien evalúa una producción de este compuesto en más de un 300 % mediante un tratamiento por laguna aireada. Sin embargo, observa que esto no ocurre en un sistema de lodo activado. Khan and Hall (2003), encuentran que un tratamiento a través de lodo activado no es específicamente eficiente para remover compuestos orgánicos no polares moderados como esteroides.

Otros autores como Ambrus *et al.* (1995), han reportado que las transformaciones microbianas del β -Sitoesterol y estigmasterol pueden realizarse mediante una cepa modificada de *Mycobacterium sp.* Por otro lado, Marsheck *et al.* (1972), indica que los esteroides poseen una baja eliminación y que el estigmasterol es uno de los fitoesteroides que presenta poca biotransformación a compuestos como andros-1,4 diene-3,17 dione, por cepas bacterianas modificadas.

Aún no es claro el proceso por el cual se produce la biodegradación de fitoesteroides, puede ser biotransformación química ó por la adsorción de la biomasa (Strömberg *et al.*, 1996).

6.4. Determinación de la biodegradación del efluente medido a través de ultrafiltración

La fracción molecular >10.000 Da del influente concentra en mayor proporción el color (88,0 %) y lignina (86,9 %), también se encuentran en menor proporción fenoles totales (72,1 %) y DQO (64,4 %) (Tabla III y Figura 21 a). Estas fracciones son pobremente biodegradables, por tratamientos aeróbicos y son los causantes del color final del efluente (Vidal *et al.*, 1997), sin embargo, no son activos biologicamente, ya que no son capaces de penetrar la membrana de los organismos.

Se considera que esta molécula posee una baja degradación mediante sistemas biológicos aireados, debido a su estructura aromática tetramérica. Sin embargo, se ha evidenciado una mayor eficiencia de eliminación mediante un tratamiento a través de hongos blancos como *Phanerochaete chrysosporium* (Jokela *et al.*, 1987)

La Figura 21 b, muestra en forma comparativa la DQO, fenoles totales, color, lignina y derivados de lignina, en el efluente. Se observa que la DQO, fenol, color y lignina fueron parcialmente transformados hacia fracciones de peso molecular entre 10.000-5.000 Da.

La fracción entre 5.000-1.000 Da se mantuvo casi constante, en el influente, efluente y efluente después del bioensayo (Figura 21 a, b y c), esto significa que los compuestos contenidos entre esta fracción no sufren mayores alteraciones (biodegradación/polimerización). Mientras que, en la fracción <1.000 Da, encontramos principalmente los compuestos derivados de lignina.

En el efluente después del bioensayo agudo (Figura 21 c) presenta un aumento en color, fenoles totales y DQO (mayoritariamente en la fracción >10.000 Da), esto podría deberse a los compuestos integrados al efluente tratado, en este caso, el alimento que consiste en un homogeneizado de levadura, harina de pescado y alfalfa. Sin embargo, los valores demostrados para el efluente preparado para el bioensayo (Tabla III), demuestra que podría haber ocurrido una polimerización de compuestos.

6.5. Evaluación de la toxicidad

El influente y efluente proveniente de la industria de celulosa kraft con tecnología ECF se presenta tóxico (Tabla IV) en su estado puro (sin estigmasterol) con un LC_{50} de 23,12 % y 40,64 %, respectivamente. Estos datos obtenidos contradicen a los presentados por Priha *et al.* (1996), quien evaluó la toxicidad de 15 industrias de celulosa en Finlandia con proceso ECF y TCF mediante varios organismos bioindicadores, dentro de ellos *Daphnia magna*. De las 15 industrias evaluadas 13 presentaron tratamiento biológico mediante lodo activado ó laguna aireada, y las otras dos tenían tratamiento mecánico. Los resultados de su estudio demuestran que los efluentes tratados biológicamente no presentan efecto tóxico agudo. Al contrario, investigaciones realizadas por Nieto (2000), demostraron que de 9 industrias de celulosa evaluadas, 3 presentaron altas toxicidades aún después de ser tratadas.

Según los datos obtenidos en la Tabla IV, a medida que aumenta la VCE se reduce la toxicidad del influente y efluente, llegando este ultimo a no ser tóxico en las dos mayores cargas. Estos resultados ponen de manifiesto que el tratamiento aeróbico es eficaz en la reducción de la toxicidad aguda y que el estigmasterol no contribuye a la toxicidad del efluente.

6.6. Biomasa

6.6.1. Actividad de la biomasa

La Tabla V demuestra la cantidad de biomasa aumentada de acuerdo al tiempo de operación. En el inicio de la operación la estrategia fue inocular 5 gSSV al reactor aeróbico, se observa que al cabo de 55 días aumentó a 7,61 gSSV, llegando al final de la primera etapa con 9,08 gSSV, el segundo período comenzó con 5,6 gSSV, debido a que perdió biomasa por la inactividad del reactor durante 114 días, el cual incrementó a 5,9 gSSV en 10 días, llegando a 9,79 gSSV al término del experimento.

Mediante la respirometría (Tabla V), se observa claramente que la velocidad de consumo específico de O_2 por microorganismo aumenta con las distintas VCO del sistema, indicando una adaptación de la biomasa a los compuestos contenidos en el influente de celulosa kraft.

Esta actividad también está relacionada con el aumento del pH, producto de la respiración endógena de los microorganismos presentes en la laguna (Rolim, 2002).

6.6.2. Caracterización de la microfauna contenida en la biomasa

Ciliados libres como *Aspidisca sp* (Figura 22 c), está presente durante la primera fase del experimento e inicio de la segunda carga de estigmasterol, indicando una baja carga orgánica y un buen proceso depurador. En conjunto con *Spirostomus sp* contribuyen a la degradación de compuestos específicos, siendo su actividad más importante la depredación de bacterias patógenas, indicando un lodo estable y verificando la presencia de bacterias floculantes, igualmente favorecen la oxigenación del sistema gracias a su desplazamiento sobre el flóculo, favoreciendo la transferencia de oxígeno a las zonas interiores.

La presencia de *Vorticella sp* (Figura 22 b) se observa a lo largo de todo el proceso de operación, asociada a la puesta en marcha, aparición y establecimiento de flóculos bien formados. Luego reaparece en forma aislada en el comienzo de la segunda carga de estigmasterol, la presencia en todos los cambios de carga puede dar un indicio de una fase de recuperación del lodo, también puede indicar un escaso contenido de oxígeno.

Dentro del trabajo de Sponza (2003), quien incluye a *Vorticella sp*, como un organismo indicador de efluentes de la industria de celulosa, concluye que estos organismos presentan tolerancia a este tipo de vertidos. *Cochilippodium sp* y *Euglypha sp* se presentan durante todo el proceso y amebas sin teca como *Arcella sp*, además de asociarlas a un contenido de baja carga orgánica, también indican una alta concentración de oxígeno disuelto en la laguna, en promedio 4 mgO₂/L. Estos organismos son importantes para el proceso de clarificación del efluente final y tienen relación con la presencia de nitrificación (Reis y Piropo, 2000).

Una masiva predominancia de ciliados libres y rotíferos como *Lecane sp* reflejan una inestabilidad del lodo cuando se tiene una VCO de 1,0 gDQO/L-d, lo cual indica un desequilibrio debido probablemente a la mayor entrada del fitoesterol. Por otro lado, la presencia de rotíferos y protozoos durante todas las velocidades de carga ejercen una acción

beneficiosa consumiendo las diversas bacterias y en general, se encuentran en sistemas con abundante aireación y son buenos indicadores de sistemas en equilibrio.

Diplogaster sp (Figura 22 a) aparece en la segunda VCE, indicando que el lodo aún no es viejo, sin embargo, Audrá y Almeida (2000), comenta que cuando el nivel energético de la laguna declina pueden surgir los rotíferos y anélidos, aún así la función de estos organismos no es clara dentro de estos sistemas.

Algas como *Oscillatoria sp* se presentan en todo el estudio, estos organismos fotosintetizadores también suministran oxígeno en el reactor.

Solo en la tercera etapa de VCE se desarrollan larvas de mosquitos, que por lo observado podrían tener 4 mudas, se cree que estas pertenecen a la clase Chironomida, que son unos de los primeros insectos que colonizan ambientes con alta carga de materia orgánica, pero no existe seguridad, por lo tanto, este organismo no se incluye dentro de los géneros encontrados.

Evidentemente llevar un registro ordenado de la microfauna en el tratamiento de efluentes de celulosa ayuda a detectar alteraciones en el mantenimiento de la biomasa y del reactor, ya que estos organismos presentan una sensibilidad a los procesos físicos-químicos de las operaciones habituales en una planta de tratamiento, respondiendo así como bioindicadores del estado del tratamiento.

7. CONCLUSIONES

El tratamiento mediante laguna aireada reduce en un rango de 25 a 65,2 % la DQO y sobre el 95 % la DBO₅, mientras que, los fenoles totales presentan una remoción máxima cercana al 48 %.

Existe una relación directa entre el aumento de la VCO 0,6 gDQO/L·d – 1,0 gDQO/L·d y la VCE 0,17 mg/L·d – 1,1 mg/L·d.

Parámetros específicos como el color (0,098 - 0,150), ácido lignosulfónico (0,331 - 0,561), lignina (0,80 - 1,94) y derivados de lignina (4,39 - 1,26) no presenta variaciones significativas debido al tratamiento aeróbico.

La eliminación de estigmasterol se obtuvo en la segunda VCE con un promedio de 96 %. Por el contrario, en la primera etapa de operación se generó estigmasterol con un valor medio de 33 %.

La lignina es el mayor componente presente en el influente (sobre 80 %) y tiene elevado peso molecular (>10.000 Da). La fracción que sufrió mayor modificación, debido a la biodegradación aeróbica fue la fracción <1.000 Da. Por otra parte, se evidencia polimerización de compuestos de la fracción < 1.000 Da que son transformados a la fracción 10.000- 5.000 Da.

Durante toda la operación de la laguna aireada, se pudo constatar la presencia de *Aspidisca sp.* Sin embargo, a una VCO 1,0 gDQO/L·d este microorganismo no pudo ser detectado, mostrando así su sensibilidad a elevadas cargas orgánicas.

Respecto a la toxicidad del efluente se puede demostrar que existe una relación directa entre el aumento de VCO ó VCE en el influente y la disminución de la toxicidad del efluente.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ambrus, G., Ilkoy, E., Jekkel, A., Horvath, G. and Bocskei, Z. (1995). Microbial transformation of β -sitosterol and stigmasterol into 26 oxygenated derivatives. *Steroids.*, 60, 621-625.

American Public Health Association (APHA), American water works association (AWWA), Pollution control federation (WPCF). (1985). Standard methods for examination of water and wastewater. 16th ed. Washington.

Andersson, T. L., Förlin, L., Harding, J. and Larsson, A. (1988). Physiological disturbance in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45, 1525-1536.

Audrá, S y Almeida, A. (2000). Correlação entre a microfauna e as condições operacionais de um processo de lodos ativados. XXVII Congresso interamericano de engenharia sanitária e ambiental. Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil, 3-8 Diciembre.

Çeçen, F. (2003). The use of uv-vis measurements in the determination of biological treatability of pulp bleaching effluents. Seventh. international water association symposium on forest industry wastewaters. Seattle (USA), 1-4 June.

Chamorro, S., Xavier, C. and Vidal, G. (2005). Behavior of aromatic compounds contained in kraft mill effluents treated by an aerated lagoon. *Biotech. Prog. (in Press)*.

Cody, R. P. and Bortone, S. A. (1997). Masculinization of mosquitofish as indicator of exposure to kraft mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 429-436.

Cook, D. L., LaFleur, L., Parrish, A., Jones, J. and Hoy, D. (1997). Characterization of plant sterols from 22 US pulp and paper mills. *Wat. Sci. Technol.*, 35, 297- 303.

Correa, J., Domínguez, V. M., Martínez, M. and Vidal, G. (2003). Aerobic degradation of 2,4,6 TCF content in ECF bleached effluent. *Env. Inter.*, 29 (4), 459-465.

Diez, M. C., Castillo, G., Aguilar, L., Vidal, G. and Mora, M. L. (2002). Operational factors and nutrients effect on activated sludge treatment for phenolic compounds degradation from *Pinus radiata* kraft mill effluents. *Biores. Technol.*, 83 (2); 132-138.

Doyle, J. C. and Lim, P. R. (2002). The effect of estradiol on the gonopodial development and sexual activity of *Gambusia holbrooki*. *Env. Toxic. Chem.*, 21, 2719-2724.

Environmental Protection Agency. (1993). Systematics, ecology, life history and culture methods *Daphnia* (*D. pulex* and *Ceriodaphnia*), 131-147.

Franta, J. R.; and Wilderer, P. A. (1997). Biological treatment of paper mill wastewater by sequencing batch reactor technology to reduce residual organics. *Water Sci. Technol.*, 35, 129-136.

Fernández, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M. and Cabral J. M. S. (2003). Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzym. Microbiol. Technol.*, 32, 688-705.

Gaete, H., Larraín, A., Baeza, J., Rodríguez, J. and Bay-Schmith, E. (1999). Efecto de aguas receptoras de efluentes de industrias de celulosa localizadas en la cuenca del río Bio Bio (Chile, Central) sobre la tasa de crecimiento de la microalga *Selenastrum capricornotum* y reproducción del cladóceros *Daphnia pulex*. *Rev. Invest. Cient. Tecnol., Ser. Cienc. Mar.*, 4 (1-3), 19-29.

Guang-Guo, Y., Kookana, R. S. and Ru, Y. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Env. Inter.*, 28, 545-551.

Hewitt, L. M., Carey, J. H., Dixon, D. G. and Munkittrick K. R. (1996). Examination of bleached kraft mill effluent fraction for potential inducers of mixed function oxygenase activity in rainbow trout. In. *Environ Fate a Effects of Pulp a Paper Mill Effluent*, M. R. Servos, K. R. Munkittrick, J. H. Carey, G. J. Van der Kraak (Eds.), *St Lucie Press, Delray Press, FL.*, pp. 79-94.

Hodson, P. V. (1996). Mixed function oxygenase induction by pulp mill effluents: advances since 1991. In: *Environmetal Fate and effects of Pulp and Paper Mill Effluents* (M.R. Servos, K. R. Munkittrick, j. h. Carey, G. J. Van der Kraak, Eds.) *St Lucie Press Delray Press, FL.*, 349-358.

Howell, W. M., Black, D. and Bortone, S. A. (1980). Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for environmentally induced masculinization. *Copeia.*, 4, 676-681.

ISO.6431:1996 (E). Water quality-Determination of the inhibition of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).

Janz, D. M., McMaster, M. E., Munkittrick, K. R. and Van der Kraak, G. (1997). Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 147, 391-398.

Jokela, J., Pellinen, J. and Salkinoja-Salonen, M. (1987). Initial steps in the pathway for bacterial degradation of two tetrameric lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2642-2649.

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

Kostamo, A., Holmbom, B. and Kukkonen, J. V. K. (2004). Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mill and mechanical pulp mills. *Water Res.*, 37, 972-982.

Kostamo, A. and Kukkonen, J. V. (2003). Removal of acids and sterols from pulp mill effluents by activated treatment. *Water Res.*, 37, 2813-2820.

Kukkonen, J. V. K., Punta, E., Koponen, P., Paranko, J., Leppänen, H., Holopainen, I. J. and värinen H. (1999). Biomarker responses by crucian carp (*Carassius carassius*) living in a pond of secondary treated pulp mill effluent. *Wat. Sci. Technol.*, 40, 123- 130.

Langergraber, G., Fleischmann, N., Hofstaedter, F. and Weibgartner, X. (2004). Monitoring of a paper mill wastewater treatment plant using UV/VIS spectroscopy. *Wat. Sci. Technol.*, 29, 353-364.

Larrain, A. (1995). Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad (*) *Cienc. Tec. Mar. Conama* (N° Especial), 39-47.

Larsson, D. G., Kinnberg, K., Sturve, J., Stephensen, E., Skön, M. and Förlin, L. (2002). Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill. *Ecotoxicol. Env. Saf.*, 52, 13-20.

Leal, H. E., Rocha, H. A. and Lema, J. M. (1996). Acute toxicity of hardboard mill effluents to different bioindicators. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, 12, 39-42.

Lehtinen, K. J., Mattsson, K., Tana, J., Engström, C., Lerche, O. and Hemming, J. (1999). Effects of wood-related sterol on the reproduction, egg survival and off-spring of brown trout (*Salmo trutta lacustris L.*). *Ecotoxicol. Env. Saf.*, 42, 40-49.

Liane, E. C., Geraldo, L. and Nobrega, R. (1999). Molecular weight distribution of chlorolignin in bleached kraft effluent by GCP and ultrafiltration. *Biores. Technol.*, 68, 63-70.

Marsheck, W., Kraychy, S. and Muir, R. (1972). Microbial degradation of sterols. *Appl. Microbiol.*, 23 (1), 72-77.

Mellanen, P., Petänen, T., Lehtimäke, J., Mäketä, S., Bylund, G., Holmbom, B., Mannila, E., Oikari, A. and Santti, R. (1996). Wood-derived estrogens: Studies *in vitro* with breast cancer cell lines and *in vivo* in trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 136, 381- 388.

Munkittrick, K. R., Servos, M. R., Carey J. H. and Van Der Kraak. (1997). Environmental impacts of pulp and paper wastewater: Evidence for a reduction in environmental effects at north american pulp mills since 1992. *Wat. Sci. Technol.*, 35 (2-3), 329-338.

Nieto, R. (2000). Caracterização ecotoxicológica de efluentes líquidos industriais-ferramenta para ações de controle da poluição das águas. XXVII Congresso interamericano de engenharia sanitária e ambiental. Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil, 3-8 Diciembre.

Norma Chilena Oficial, NCh 2083 Of.1999. Aguas- Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladóceras). INN-Chile.

Pratima, B. and Pradmod, B. (1994). Biological colour removal of pulp and paper mill wastewaters. *J. Biotech.*, 33(3), 211-220.

Priha, M. H. (1996). Ecotoxicological impacts of pulp mill effluent in Finland. In: Servos ME, Munkittrick, J. C., Carey. J. H., Kraak, G. J. (eds). Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents. *St Lucie Press, Delray Press, FL*, pp 637-650.

Reinoso, S. E. (1996). Anuario de ciencia. *Tecnología y medio ambiente*, 210-214.

Reis, C. and Piropo, B. (2000). Caracterização da biota de uma estação experimental de tratamento de esgotos em diferentes idades de lodo. XXVII Congresso interamericano de engenharia sanitária e ambiental. Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil, 3-8 Diciembre.

Rintala, J. and Puhakka, J. (1994). Anaerobic treatment in pulp and paper mill-waste management: a review. *Biores. Technol.*, 47, 1-18.

Rodríguez, E., Isac, L., Fernández, N. and Salas, E. (2005). El ecosistema “Fangos activados” *El portal de biología y ciencias de la salud.*, 19, 1-9.

Rolim, S. M. (2000). Sistemas de lagunas de estabilización. Editorial Mc Graw-Hill, Colombia, 370pp.

Servos, M., Munkittrick, K., Carey, J. and Van Der Kraak, G. (1996). Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents. *St Lucie Press Delray Press*. Beach, Florida USA. 703pp.

Strehler, A. and Welander, T. (1994). A novel method for biological treatment of bleached kraft mill wastewater. *Wat. Sci. Technol.*, 29 (5), 295-302.

Strömberg, L., Mörck, R., de Souza, F. and Dahlman, O. (1996). Effects of internal process changes and external treatment on effluent chemistry. In: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, M. R. Servos, K. R. Munkittrick, J. H. Carey, G. J. Van der Kraak, (Eds.), *St Lucie Press, Delray Press, FL.*, pp. 3-19.

Sponza, D. (2003). Application of toxicity test into discharges of the pulp-paper industry in turkey. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54, 74-86.

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

Van den Heuvel, M. R., Ellis, R. J., Tremblay, L. A. and Stuthridge, T. R. (2002). Exposure of reproductive maturing rainbow trout to a New Zealand pulp and paper mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 51, 65-75.

Van der Kraak, G. J., Munkittrick, K. R., McMaster, M. E., Portt, C. B. and Chang, J. P. (1992). Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115, 224-33.

Vidal, G. (1999). Revisión bibliográfica sobre los compuestos orgánicos producidos en la industria de la pasta y el papel: Incidencia en la toxicidad y biodegradabilidad anaerobia de sus efluentes. *Afinidad.*, 481, 152,159.

Vidal, G., Fernández, A. J. and Diez, M. C. (2000). Comportamiento de compuestos fenólicos en un tratamiento mixto anaeróbico-aeróbico. *Afinidad.*, 57, 318-326.

Vidal, G., Videla, S. and Diez, C. (2001). Molecular weight distribution of *Pinus radiata* kraft mill wastewater treated by anaerobic digestion. *Biores. Technol.*, 77, 183-191.

Videla, S. (2003). Evolución y tendencia del tratamiento de residuos industriales líquidos en la industria de celulosa. X jornadas técnicas de la celulosa y el papel “Globalización y competitividad”. Concepción, 12-14 de Noviembre.

Xavier, C., Chamorro, S. and Vidal, G. (2004). Efeito da Degradação e da toxicidade de fitoesteroles presentes em efluentes de celulose kraft tratados em sistemas de lagoas aereadas. *Ciencias e tecnologia em residuos e desenvolviment Sustentable & NISAM Brasil*, Florianópolis: 17-20 de Octubre.

CMPC Celulosa. Proceso Productivo de la Celulosa. <http://www.papelnet.cl>