



**Universidad de Concepción**

Dirección de Postgrado

Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile

Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales mención Sistemas Acuáticos Continentales

**TRATAMIENTO SECUNDARIO Y TERCIARIOS DE EFLUENTES DE LA  
INDUSTRIA FORESTAL Y SU EFECTO SOBRE LA TOXICIDAD**

**MAYRA ANDREA JARPA LOPEZ**

CONCEPCION – CHILE

2014

Profesor Guía: **Dra. Gladys Vidal Sáez**  
Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile  
Universidad de Concepción, Chile.

Profesor Co-Guía: **Dr. José Luis Campos**  
Dpto. de Ingeniería Química, Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Universidad de Santiago de Compostela, España

Esta Tesis ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental del Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile de la Universidad de Concepción.

Profesores Integrantes Comisión Evaluadora:

---

**Dra. Gladys Vidal**

Directora Tesis  
Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile  
Universidad de Concepción, Chile

---

**Dr. José Luis Campos**

Co-Director Tesis  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería (ETSE)  
Universidad de Santiago de Compostela, España

---

**Dra. Maria Angélica Mondaca**

Evaluador Interno  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción, Chile

---

**Dr. Héctor Mansilla**

Evaluador Interno  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Concepción, Chile

---

**Dr. David Jeison**

Evaluador Externo  
Departamento de Ingeniería Química  
Universidad de la Frontera, Chile

***Esta tesis está dedicada en especial a mi hermosa familia conformada por mis hijos Pablo y Maite, especialmente por su espera y todos los momentos hermosos que me han regalado, a Leonardo que ha sido mi compañero y a mis padres y hermanos.....***

***“Para el logro del triunfo siempre ha sido indispensable pasar por la senda de los sacrificios”.***

Simón Bolívar

## **AGRADECIMIENTOS**

Me faltaran palabras de agradecimientos para las personas que de una u otra forma contribuyeron a la obtención de esta tesis de doctorado.

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora Dra. Gladys Vidal quien me incentivo desde mi formación de pregrado a ser alguien más en la vida, seguir más allá....., y por indicarme el camino hacia mi formación científica. Agradecer al Dr. José Luis Campos que a pesar de la distancia siempre mostró gran interés de ayudarme.

Además, durante el camino de esta tesis doctoral tuve la oportunidad de realizar distintas experiencias para la obtención de mis resultados. Por lo cual agradezco al Dr. Miguel Martínez quien no sólo permitió que realizara gran parte de mi tesis en su Laboratorio de Microbiología Ambiental y Bioremediación, sino que además tuvo el tiempo de analizar mis resultados y conversar de la vida, además agradecer a las personas que trabajan en su laboratorio como Ruth, quien tenía la paciencia de prepararme las cepas bacterianas siempre con una gran sonrisa, Paulina paso a ser una gran amiga y me ayudo en los ensayos microbiológicos durante mi embarazo, Evelyn, Guillermo y Pamela, quienes me brindaron palabras de aliento cuando los resultados no eran positivos. También quiero agradecer a la Dra. Marta Bunster, quien permitió que cuantificara el PHA en el laboratorio de Biofísica Molecular, especialmente a José Sepúlveda como también al Dr. Osvaldo Ulloa, Gadiel Alarcón y Pablo Riquelme del Laboratorio de Procesos Oceanográficos y Clima.

Agradecer a la Dra. María Angélica Mondaca por estar a mi lado en el momento de intentar el cultivo de cepas de levaduras en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, intentando hacer lo imposible por revivirlas!!. Al Dr. Héctor Mansilla, por su ayuda en interpretación de datos, explicación de fundamentos, como también por una frase que me dijo una vez “Mayra sin desanimarse”, esos fueron momentos muy complicados. También a la Dra. Carolina Baeza y especialmente a mis compañeros de doctorado Oscar Rozas y Claudio Salazar, personas muy importantes!! en la implementación de mis tratamientos terciarios como también en el manejo de software y agradecerles por las largas conversaciones que tuvimos de tratamientos e industria forestal, verdaderos libros abiertos para enriquecerme.

Al Dr. Roberto Urrutia y al Laboratorio de Bioensayos, en especial a Claudia Suarez quien me enseñó todo sobre *D. magna*, también a Rubí y Viviana, chicas con las cuales además de compartir laboratorio, logramos una muy bonita amistad.

Agradecer a los miembros del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental (GIBA) entre los años 2008 – 2013, entre estas la Sra. Jacqueline Decap, por transmitirme sus conocimientos y paciencia en las experiencias de laboratorio, María José, Francisca, Rocío, Gerardo, Leonardo, Carla, Daniela, María Elisa, Marisol, Ely, Mariela, Alejandra, Cindy, Alejandra, Guillermo, Catalina, Soledad, Constanza, Rodrigo, María Cecilia, Babet, Karen, Marianela, Nataly, Cristián, Daniel y Patricio, quienes fueron más que compañeros de grupo, transformándose en un verdadero grupo de amistad. También agradecer a mis compañeros de generación de doctorado 2008, como Catterina Sobenes, Alejandra Lafon, Juan José Ortiz, Denisse Balbina y Pablo Pedreros por las conversaciones de pasillo, en la cual conversábamos temas de la vida, a las secretarias Lorenita y Andrea por darse tener la disposición de solucionar mis inconvenientes de índole académico.

Finalmente agradecer a mis hijos Pablo y Maite, Leonardo Saavedra, mis padres Patricia López y Arnoldo Jarpa, hermanos (Marcela, Braulio y Claudio), Andrea Bustos, mi abuela Ana, mi tía Viviana y Rosa, todos ellos muy importantes en el trayecto de mi tesis, unos brindándome mucho amor (lo más importante), apoyo incondicional, apoyo psicológico y otros, ayudándome con el gran cuidado de mis hijos!!!!

MUCHAS GRACIAS A TODOS!



**2013**

**GRUPO DE INGENIERIA Y BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL (GIBA)**

**CENTRO DE CIENCIAS AMBIENTALES EULA-CHILE**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**

**Esta Tesis fue realizada con financiamiento otorgado por:**

Becas para Estudios de Doctorado en Chile (No D-21080125)

Proyecto AT-24100082

Programa de Becas de Apoyo a la realización de la tesis Doctoral



Programa Becas de Exención

Dirección de Postgrado

Universidad de Concepción



**Agradecimientos especiales a:**

Dr. Miguel Martínez

Laboratorio de Microbiología Ambiental y Bioremediación

Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de microbiología

Universidad de Concepción, Chile

Dra. Marta Bunster

Laboratorio de Biofísica Molecular

Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular

Universidad de Concepción, Chile

Dr. Osvaldo Ulloa

Laboratorio de Procesos Oceanográficos y Clima

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción, Chile

Dr. Roberto Urrutia

Laboratorio de bioensayos

Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile

Universidad de Concepción, Chile



## INDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	17
<b>ABSTRACT</b> .....	20
<b>CAPITULO I : INTRODUCCION</b> .....	23
1. Antecedentes generales .....	24
1.1. Industria forestal .....	27
1.1.1. Materia prima y sus constituyentes.....	27
1.1.2. Proceso de Producción de celulosa kraft y papel .....	28
1.1.3. Composición de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.....	31
1.1.4. Tratamiento de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel y toxicidad.....	33
1.1.4.1. Tratamiento secundario de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel por sistemas de tipo aeróbicos .....	34
1.1.4.2. Tratamientos terciarios en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel .....	38
2. Revalorización de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel a través de producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) .....	41
3. Toxicidad crónica contenidos en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.....	46
3.1. Efectos de toxicidad crónica en organismos expuestos a efluentes de celulosa kraft y papel .....	46
3.2. Detección de toxicidad a través del bioindicador <i>Daphnia sp</i> .....	49
<b>CAPITULO II: HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	52
1. HIPOTESIS.....	53
2. OBJETIVOS.....	53

2.1. Objetivo general.....	53
2.2. Objetivos específicos.....	53
<b>CAPITULO III: COMPARACION DE LA INFLUENCIA DE CARGA ORGANICA Y RELACION DE NUTRIENTES EN UN SISTEMA DE BIOMASA ADHERIDA DURANTE EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA DE CELULOSA KRAFT Y PAPEL.....</b>	<b>54</b>
1. INTRODUCCION.....	56
2. MATERIALES Y METODOS.....	57
2.1. Agua residual.....	57
2.2. MBBR.....	57
2.3. Métodos analíticos.....	59
2.4. Analisis microbiológicos.....	59
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	60
4. CONCLUSIONES.....	70
<b>CAPITULO IV: COMPARISON OF CHRONIC TOXICITY REMOVAL CONTAINED IN KRAFT MILL EFFLUENTS TREATMENT BY OPTIMIZATION OF CHEMICAL PRECIPITATION TRETAMENT, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Y FENTON PROCESS.....</b>	<b>74</b>
1. INTRODUCTION.....	76
2.EXPERIMENTAL.....	77
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	80
4. CONCLUSIONS.....	90
<b>CAPITULO V: POLYHYDROXYALKANOATE BIOSYNTHESIS FROM PAPER MILL WASTEWATER TREATED BY A MOVING BED BIOFILM REACTOR .....</b>	<b>96</b>
1. INTRODUCTION.....	98
2. MATERIALS AND METHODS.....	99

2.1. Raw wastewater .....	99
2.2. Inoculum.....	99
2.3. MBBR.....	99
2.4. Analytical Methods.....	101
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	103
3.1. Paper mill wastewater characteristics.....	103
3.2. Organic matter removal efficiency.....	103
3.3. PHA biosynthesis.....	106
3.4. Behaviour biomass during PHA biosynthesis.....	109
4. CONCLUSIONS.....	112
<b>CAPITULO VI: COMPARISON OF POLYHYDROXYALKANOATES BIOSYNTHESIS FROM DIFFERENT PAPER MILL WASTEWATER BY MOVING BED BIOFILM REACTOR</b> .....	115
1. INTRODUCTION.....	116
2. MATERIALS AND METHODS.....	117
2.1. Raw wastewater.....	117
2.2. Inoculum .....	118
2.3. MBBR operation.....	118
2.4. Analytical methods.....	119
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	121
3.1. Raw wastewater characteristics.....	121
3.2. PHAs biosynthesis .....	123
3.3. Biomass evolution.....	125
3.4. Organic matter removal efficiency.....	126

4. CONCLUSIONS.....	128
<b>CAPITULO VII: CHRONIC TOXICITY CONTAINED IN KRAFT MILL EFFLUENTS TREATED BY COMBINED BIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL TREATMENTS .....</b>	<b>133</b>
1. INTRODUCTION.....	134
2. MATERIALS AND METHODS.....	135
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	137
4. CONCLUSIONS.....	141
<b>CAPITULO VIII: DISCUSION.....</b>	<b>144</b>
1. La materia orgánica recalcitrante y su influencia en el toxicidad de los efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.....	147
2. Materia orgánica biodegradable y su valorización para producción de polihidroxialcanoatos (PHAs).....	156
3. Efectos de la tecnología en el toxicidad contenido en efluentes de celulosa kraft y papel.....	158
4. Conexión entre calidad de efluentes generados en la industria de celulosa kraft y papel y los requerimientos ecosistémicos.....	165
<b>CAPITULO IX: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES.....</b>	<b>168</b>
1. CONCLUSIONES.....	169
2. RECOMENDACIONES FINALES.....	170
<b>CAPITULO X: REFERENCIAS.....</b>	<b>172</b>
<b>ANEXO I: CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>192</b>
<b>ANEXO II: PORTADA DE ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>	<b>199</b>

## INDICE DE FIGURAS

### Página

#### CAPITULO I

<b>Figura 1.</b> Proceso productivo: (a) Industria de celulosa kraft, (b) Industria de papel.....	30
<b>Figura 2.</b> Estructura general de los PHAs.....	43
<b>Figura 3.</b> Estructura de algunos compuestos con toxicidad detectados en efluentes de la industria forestal, a): compuestos organoclorados; b): ácidos resinicos; c): fitoesteroles.....	47

#### CAPITULO III

<b>Figura 1.</b> Sistema MBBR implementado para el tratamiento de efluentes de la industria de celulosa kraft e industria papelera.....	58
<b>Figura 2.</b> Efecto de VCO y DBO <sub>5</sub> : N: P en la eficiencia de eliminación material orgánica. a) Fase I, b) Fase II.....	65
<b>Figura 3.</b> Efecto de VCO y DBO <sub>5</sub> : N: P en la características del lodo en los sistemas MBBR .....	67

#### CAPITULO IV

<b>Figure 1.</b> COD removal kinetics in kraft mill effluents .....	81
<b>Figure 2.</b> Contour diagram of response surface models for (a) chemical precipitation treatment, (b) UV/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and (c) Fenton Process.....	85
<b>Figure 3.</b> COD removal kinetics with optimizatized variables.....	87
<b>Figure 4.</b> TOC mineralizationfor UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> .....	88
<b>Figure 5.</b> Biodegradability index (BOD <sub>5</sub> / COD) evolution in chemical precipitation, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> .....	89

<b>Figure 6.</b> Evaluation of chronic toxicity in different effluents by <i>D. magna</i> .....	91
---	----

## **CAPITULO V**

<b>Figure 1.</b> Experimental setup for MBBR system.....	100
<b>Figure 2.</b> MBBR Performance during the operation.....	105
<b>Figure 3.</b> Concentration of total VFAs.....	106
<b>Figure 4.</b> PHA production during MBBR operation.....	108
<b>Figure 5.</b> Behaviour of the SVI and F/M during MBBR operation.....	109

## **CAPITULO VI**

<b>Figure 1.</b> PHA biosynthesis during MBBR operation.....	124
<b>Figure 2.</b> Behavior of biomass. SVI and F/M at OLR.....	126
<b>Figure 3.</b> MBBR performance. BOD <sub>5</sub> removal.....	127
<b>Figure 4.</b> MBBR performance, COD and Total phenolic compounds removal.....	129

## **CAPITULO VII**

<b>Figure 1.</b> Scheme of the different influent, effluents and sludge evaluated in this study.....	136
<b>Figure 2.</b> Evaluation of chronic toxicity in different effluents by <i>D. magna</i> .....	139

## **CAPITULO VIII**

<b>Figura 1.</b> Esquematización del tipo de materia orgánica, toxicidad y la potencial aplicación de una tecnología de tratamiento en efluentes de la industria de celulosa kraft y papelera.....	147
<b>Figura 2.</b> Comportamiento de la materia orgánica en los distintos tratamientos implementados .....	154
<b>Figura 3.</b> Comparación de la eficiencia en eliminación de DBO <sub>5</sub> y producción de PHAs entre efluentes de la industria de celulosa kraft y papel. PGW: desfibrador presurizado, TMP: pulpaje termomecánico .....	158

## INDICE DE TABLAS

### Página

#### CAPITULO I

<b>Tabla 1.</b> Industrias de celulosa kraft e industria papelera en Chile.....	25
<b>Tabla 2.</b> Principales constituyentes de la madera en <i>E. globulus</i> y <i>P. radiata</i> .....	27
<b>Tabla 3.</b> Propiedades físico-químico de algunos extractivos de la madera presentes en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.....	33
<b>Tabla 4.</b> Eficiencia de eliminación de sistemas de tratamientos secundarios en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.....	37
<b>Tabla 5.</b> Potenciales de reducción de algunos agentes oxidantes.....	39
<b>Tabla 6.</b> Comparación de propiedades fisicoquímicas de PHA y polipropileno.....	42
<b>Tabla 7.</b> Producción de Polihidroxialcanoatos mediante cultivos puros y mixtos con efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.....	45
<b>Tabla 8.</b> Efectos del tipo disrupción endocrinas ocasionadas por la exposición de efluentes de celulosa kraft o compuesto específico.....	51

#### CAPITULO III

<b>Tabla 1.</b> Caracterización físico-química efluentes de la industria de celulosa kraft y efluente de la industria papelera.....	62
<b>Tabla 2.</b> Comportamiento de compuestos aromáticos durante el MBBR.....	63
<b>Tabla 3.</b> Rendimiento operacional de los sistemas MBBR implementados.....	69

#### CAPITULO IV

<b>Table 1</b> Physicochemical characterization of STOE.....	80
<b>Table 2.</b> Circumscribed central composite ( $2^2$ ) for chemical precipitation, UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> .....	84

<b>Table 3.</b> Optimized values for variables and maximum COD removal for each treatment.....	86
--	----

## **CAPITULO V**

<b>Table 1.</b> MBBR system operational conditions.....	102
---	-----

<b>Table 2.</b> Physicochemical characterization of the raw wastewater.....	104
---	-----

<b>Table 3.</b> Performance of the MBBR reactor.....	111
--	-----

## **CAPITULO VI**

<b>Table 1.</b> MBBR operational conditions.....	120
--	-----

<b>Table 2.</b> Physicochemical characterization of the raw wastewater.....	122
---	-----

## **CAPITULO VII**

<b>Table 1.</b> Brooding time of <i>D. magna</i> exposed to different influent, effluent and sludge of this study.....	140
--	-----

## **CAPITULO VIII**

<b>Tabla 1.</b> Comportamiento de compuestos aromáticos durante el tratamiento con MBBR, precipitación química, UVH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y Fenton.....	152
---	-----

<b>Tabla 2.</b> Eficiencias de eliminación en diferentes sistemas de tratamientos físico-químicos y químicos utilizados en la industria de celulosa kraft.....	160
--	-----

<b>Tabla 3.</b> Evaluación de toxicidad aguda y crónica en efluentes de diferentes sistemas de tratamientos a través de <i>D. magna</i> .....	164
---	-----

## RESUMEN

En Chile la industria forestal ha experimentado un desarrollo acelerado con producciones aproximadas de 2,9 millones de ton de celulosa/ año y de 500.000 ton de papel/ año. En general estos efluentes se caracterizan por su alto contenido de sólidos suspendidos, materia orgánica medida como Demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y Demanda química de oxígeno (DQO), color por presencia de ligninas, derivados de ligninas, taninos, AOX (compuestos organoclorados) y compuestos extractivos de la madera, entre estos últimos, tales como ácidos resinicos, ácidos grasos y fitoesteroles, entre otros. Estudios previos han determinado que estos efluentes generan impactos en organismos acuáticos expuestos a efluentes de la industria forestal descargados al cuerpo de agua receptor, mencionando dentro de estos, presencia de toxicidad. Esta toxicidad, puede ser del tipo de toxicidad aguda, atribuida a la presencia de AOX, ácidos resinicos y ácidos grasos y también presencia de toxicidad crónica, debido a microcontaminantes presente en este tipo de efluentes, mencionando dentro de este tipo, aquellos cuya estructura básica es un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, como es el caso de los fitoesteroles.

El tratamiento de estos efluentes es realizado mediante tecnologías de tratamientos secundarios como lagunas aireadas, lodos activados y MBBR (Biorreactores de Biopelícula de Lecho Móvil), tecnologías que permiten altas eficiencias de eliminación de DBO<sub>5</sub>. Sin embargo, existe una fracción de compuestos recalcitrantes contenidos en la DQO que no son biodegradados como es el caso de AOX y extractivos de la madera, entre otros. En la actualidad algunas industrias forestales utilizan tratamientos terciarios de precipitación química, principalmente para eliminación de color de sus efluentes. Sin embargo, uno de los inconvenientes de este tratamiento, es la generación de una fase sólida que posteriormente deberá ser dispuesta. Por lo antes mencionado, como alternativa de tratamiento terciario, se plantean los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs). Los POAs poseen un alto poder oxidativo, el cual es proporcionado por la generación de radicales hidroxilos (OH•), radicales que generan cambios en la estructura química de agentes contaminantes, ya sea transformandolos y/o destruyéndolos. Lo antes mencionado podría indicar su contribución en la eliminación de DQO y de toxicidad crónica, contenido en los efluentes secundarios de esta industria. Donde una forma de determinar este tipo de toxicidad a través del uso de bioindicadores como *Daphnia magna*.

Por lo antes expuesto, esta tesis de doctorado tiene por objeto evaluar la eliminación de toxicidad presente en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel tratados por sistemas secundarios como MBBR y sistemas de tratamiento terciarios como precipitación química, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton mediante *D. magna*.

Los resultados obtenidos indican que el sistema MBBR es eficiente en eliminación de materia orgánica biodegradable, con valores promedios de 87,27 % y 82,70 % para DBO<sub>5</sub> y Carbono Orgánico Total (COT), respectivamente. Mientras que para el caso de materia orgánica recalcitrante, se obtuvieron eliminaciones del 59,35 % DQO, en cuya fracción recalcitrante se encuentran contenidos la lignina y compuestos fenólicos totales, entre otros. Los compuestos recalcitrantes poseen un alto peso molecular pero sin embargo, no son biológicamente activos y contribuyen al color del efluente (incrementos de la relación color/ DQO desde 0,19 a 0,36). Además, dentro de esta fracción recalcitrante, permanecen compuestos tales como extractivos de madera y/ o compuestos generados durante el tratamiento biológico que podrían poseer características biológicamente activas, principalmente por el alto coeficiente de partición octanol agua (log K<sub>ow</sub>) mayor a 6, como es el caso de los fitoesteroides.

Para el caso de los tratamientos terciarios se obtuvieron valores promedios de eliminación de DBO<sub>5</sub> y COT del 41,93 % y 37,32 %, respectivamente para Fenton, mientras que para UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 45,65 % DBO<sub>5</sub> y 57,75 % COT y para precipitación química del 75,70 % DBO<sub>5</sub> y 26,23 % COT. En cuanto a la eliminación de materia orgánica recalcitrante, el tratamiento de Fenton fue el más eficiente con eliminaciones del 90,66 % DQO, seguido de UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (66,21 % DQO) y precipitación química (45,00 %). Además, estos tres tratamientos permitieron una eliminación eficiente de ligninas y otros compuestos aromáticos, con disminuciones de las relaciones de color/ DQO, UV<sub>280</sub>/ DQO, UV<sub>272</sub>/ DQO, UV<sub>254</sub>/ DQO y UV<sub>215</sub>/ DQO, siendo posible la conversión de compuestos recalcitrantes en compuestos más simples y de menor peso molecular.

En cuanto a la eliminación de toxicidad determinada con *D. magna*, el sistema MBBR demostró ser eficiente en eliminación toxicidad aguda del efluente determinado como LC<sub>50</sub> 48h (Concentración Letal para el 50 % de los organismos). Sin embargo, estos efluentes presentaron toxicidad crónica, la cual fue determinada a través de la determinación de Tasa de Crecimiento Alométrica (TCA) y producción de neonatos, con máximos porcentajes de reducción de TCA de

11,57 % y con diferencias significativas para la concentración de 100 % ( $p < 0,05$ ). Posteriormente, en los tratamientos terciarios implementados, sólo la fase sólida de precipitación química registró valores de  $LC_{50}$  48h del 91,3 % y reducción en el porcentaje de reducción de TCA del 3,4 %. Por lo antes mencionado, se concluye que en los efluentes de precipitación química, UV/  $H_2O_2$  y Fenton fue posible la eliminación de toxicidad crónica.

Es importante mencionar que durante el tratamiento de estos efluentes se generan toneladas de lodos debido a la  $DBO_5$  eliminada (1,8 – 3,5 ton de lodos/ ton  $DBO_5$ ), el cual espera por oportunidades de valorización. Por esta razón, en esta tesis planteó otorgarle un valor agregado a la  $DBO_5$  bajo condiciones específicas de tratamiento, mediante el enriquecimiento de biosólidos con la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) ya que estos son la base de plásticos biodegradables. Los resultados obtenidos, indicaron que el MBBR al estar expuesto a cambios de VCO (Velocidad de Carga Orgánica) y relación de nutrientes ( $DBO_5$ : N: P) permitió la producción de PHAs, con máximos porcentajes de células que acumulan PHA del 85,10 % y 78,70 %, para relación de nutrientes de 100: 5: 1 y 100: 1: 0,3, respectivamente y ambas obtenidas con VCO de 2,99 kg  $BOD_5/m^3 \cdot d$ .

Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis, permiten concluir que tratamientos secundarios y terciarios permiten la eliminación de toxicidad aguda y crónica contenida en estos efluentes y que además es posible otorgarles un valor agregado a los efluentes tratados por los sistemas secundarios, como es la producción de PHA, disminuyendo las cargas de contaminantes que son vertidos en el ambiente acuático.

## ABSTRACT

In Chile, the forest industry has experienced a rapid development with a production approximately of 2.9 million tons of pulp/ year and 500,000 tons of paper/ year. In general these effluents are characterized by a high content of suspended solids, organic matter (Biological Oxygen Demand: BOD<sub>5</sub>; Chemical oxygen demand: COD), color by presence of lignin, lignin derivatives, tannin and Halogenated Organic Compounds (AOX) and wood extractives (resin acids, fatty acids and phytosterols, among others). Previous studies have determined that these effluents, when discharged to a receiving water body, generate impacts on aquatic organisms, such as toxicity. The toxicity can be acute toxicity and chronic toxicity. Acute toxicity was attributed to the presence of AOX, resin acids and fatty acids. Chronic toxicity was due to the presence of micro-pollutants, such as phytosterols, where the basic ring structure is a cyclopentanoperhydrophenanthrene ring. Effluent treatment is performed using secondary treatment technologies, such as aerated lagoons, activated sludge and MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor), which allow high removal efficiencies of BOD<sub>5</sub>. However, there fraction contains recalcitrant compounds that are not biodegraded (COD), such as AOX and wood extractives, among others. At present some forest industries, using chemical precipitation as tertiary treatment, mainly for color removal. However, one disadvantage of this treatment is the generation of a solid phase that needs to be disposed. Alternatively tertiary treatment can give rise to Advanced Oxidation Processes (AOPs) because they have high oxidative power for the generation of hydroxyl radicals (OH•), generating changes in the chemical structure of pollutants (e.g. transformation and/ or destruction). This may help in the removal of COD and toxicity contained in secondary effluents. One way to measure the toxicity is through the use of bioindicator, such as *Daphnia magna*.

This doctoral thesis aims to evaluate removal of toxicity present in kraft mill and paper mill effluents after secondary treatment (MBBR) and tertiary treatment systems such as chemical precipitation, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fenton Process using *D. magna*.

This study indicates that MBBR is efficient in the removal of biodegradable organic matter, with efficiencies of 87.27 % and 82.70 % for BOD<sub>5</sub> and Total Organic Carbon (TOC), respectively. The removal efficiency obtained for recalcitrant organic matter was 59.35 % COD. The recalcitrant fraction contains lignin and aromatic compounds, in addition to others, which have a high

molecular weight and are not biologically active, but contribute to the color of the effluent (increased Color/ COD from 0.19 to 0.36). However, this recalcitrant fraction contains compounds such as wood extractive and / or compounds generated during the biological treatment, which could be biologically active, principally due to the high octanol–water partition coefficient (log Kow) for the phytosterols (greater than 6). In the case of tertiary treatments, average values obtained for BOD<sub>5</sub> and TOC removal corresponding to 41.93 % and 37.32 %, respectively for the Fenton Process. For UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> average values were 45.65 % BOD<sub>5</sub> and 57.75 % TOC and chemical precipitation of 75.70 % BOD<sub>5</sub> and 26.23% TOC. In recalcitrant organic matter removal the Fenton Process was the most efficient (90.66 % COD), followed by UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (66.21 % COD) and chemical precipitation (45.00 %). Furthermore, these treatments allowed the efficient removal of lignin and other aromatic compounds with decreased color/ COD, UV<sub>280</sub>/ COD, UV<sub>272</sub>/ COD, UV<sub>254</sub>/ COD and UV<sub>215</sub>/ COD. This was possible due to the conversion of recalcitrant compounds to more simple compounds with a lower molecular weight.

The removal of toxicity was determined by *D. magna*, MBBR was efficient in the removal acute biological potential (LC<sub>50</sub> 48h, Concentration Lethal for 50 % of organisms). Nevertheless, chronic toxicity determined % Allometric Growth Rate (AGR) and *D. magna* neonates production with reductions in AGR of 11.57 % and with significant differences with respect to control only for the concentration 100 % (p <0.05). On the other hand, only physico-chemical sludge obtained values of LC<sub>50</sub> 48h (91.3 %) and reductions in AGR of 3.40 %. As mentioned above, it is concluded that chemical precipitation (liquid phase), UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fenton Process were able to eliminate chronic toxicity.

During operation, generates several tons of excess sludge due to BOD<sub>5</sub> removal (1.8 to 3.5 ton of sludge/ ton BOD<sub>5</sub>), which may present an opportunity for valorization. For this reason, in this thesis, an added value was given to the BOD<sub>5</sub> under specific treatment conditions, such as the enrichment of biosolids with producing polyhydroxyalkanoates (PHAs), corresponding to base of biodegradable plastics. The results indicated that the MBBR, when exposed to changes in Organic Loading Rate (OLR) and nutrient ratios (BOD<sub>5</sub>: N: P), the production of PHAs was enabled, with maximum percentages of cells that accumulate PHA of 85.10 % and 78.70 %, for

nutrient ratios 100: 5: 1 and 100: 1 : 0.3, respectively, and both obtained with OLR of 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> · d.

Considering the results obtained in this thesis, it can be concluded that the secondary and tertiary treatment allows the removal of toxicity contained within these effluents. It is also possible to give an added value to the effluents treated by secondary systems, such as the production of PHAs, consequently reducing pollutant loads that are discharged in the aquatic environment.

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCION**

## 1. Antecedentes generales

El crecimiento de la industria de celulosa kraft e industria de papel en Chile tiene un rol fundamental en la economía nacional representando el 3,5 % del PIB (Producto interno Bruto), siendo la segunda actividad económica más importante después de la minería (CORMA, 2010), ubicándose entre los principales países productores de celulosa y papel, junto a países como Canadá, Suecia, Finlandia, Estados Unidos, Portugal y Brasil. El mercado de la industria de celulosa kraft, se encuentra enfocado principalmente al mercado externo, a países como Estados Unidos y Asia, mientras que para el caso de la industria de papel su producción en su mayoría es enfocada al mercado interno y en menor porcentaje a exportaciones a países de Sudamérica, entre estos: Argentina, Perú, Colombia y México (Diagnóstico APL, 2005). El desarrollo de esta industria se da preferentemente en la Zona Centro Sur y Zona Sur del país debido a que las principales especies utilizadas como materia prima (*Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus*) poseen gran adaptación a las condiciones climáticas y de suelo de estas zonas, con una superficie de plantaciones forestales de 2,3 millones de hectáreas, con mayores porcentajes en Región del Bío-bío (Octava región), Región del Maule (Séptima región) y Región de la Araucanía (Novena región), con 40 %, 20 % y 20 %, respectivamente (INFOR, 2007).

En Chile existen 13 industrias de celulosa, de las cuales 9 utilizan procesos de celulosa kraft y 4 realizan procesos mecánicos, con producciones aproximadas de 2,9 millones de ton de celulosa/año, destacando la región del Bío-bío por su alta producción de celulosa kraft, generando un 46 % de la producción nacional (Xavier, 2006). En el caso de la industria de papel, existen 11 plantas, 4 de ellas ubicadas en la región del Bío-bío, con producciones aproximadas de 500.000 ton de papel/año (Tabla 1).

**Tabla 1.** Industrias de celulosa kraft e industria papelera en Chile.

Industria	Empresa	Región	Producción (miles ton /año)	Tratamiento	Descarga
Celulosa	Licancel S.A.	VII	145	TP, TS	Río Mataquito
	Laja	VIII	345	TP, TS (MBBR, LA)	
	Santa Fe	VIII	1160	TP, TS (MBBR, LA)	Río Biobío
	Pacífico	IX	490	TP, TS (MBBR, LO)	
	Nueva Aldea	VIII	850	TP, TS (LA) TT (DAF)	Río Itata
	Valdivia	X	430	TP, TS (LA) TT (DAF)	Río Cruces
	Constitución	VIII	335	TP, TS (LA)	
	Arauco I	VIII	260	TP, TS (LO)	Océano Pacífico
	Arauco II	VIII	470	TP, TS (LA)	
Papelera	Cartulinas CMPC S.A.	VII	360	TP, TS	Río Maule
	Cartulinas CMPC S.A.	X	70	TP, TS	Río Calle Calle
	Inforsa S.A. CMPC	VIII	195	TP, TS (MBBR)	Río Vergara
	Papeles Cordillera S.A.	RM	320	TP, TS (BAS), TT (Desinfección)	Río Maipo
	CMPC S.A.	VIII	80	TP, TS	Río Biobío
	CMPC S.A.	RM	33	TP, TS (LA)	Río Maipo
	Papeles Bio Bio SA	VIII	120	TP, TS (LA)	Río Biobío
	Cía. Papelera del Pacífico	VI	60	TP, TS	Estero Tronco
	Carrascal S.A.	RM	45	TP (DAF)	-
	Forestal y Papelera Concepción S.A.	VIII	50	TP, TS (LA), TT	Fuera ZPL
Papeles Industriales S.A.	RM	57	(Desinfección)	Estero Lampa	

TP: Tratamiento primario; TS: Tratamiento secundario; TT: Tratamiento terciario; MBBR: Movil Bed Biofilm Reactor; LA: Lodos activados; LO: Laguna aireada extendida; DAF: Floculación + Flotación.

Estudios han demostrado que esta industria, es una de las que más contaminantes emite al medio ambiente, clasificando estos principalmente en cuatro categorías: gases, efluentes, partículas y residuos sólidos (Ali & Sreekrishnan, 2001; Latorre *et al.*, 2007; Asghar *et al.*, 2007). En el caso de los ambientes acuáticos, este impacto se produce por los grandes volúmenes de efluentes vertidos, estimando valores de vertidos entre 20 – 200 m<sup>3</sup>/ ton papel (Thompson *et al.*, 2001; Hewitt *et al.*, 2006; Ahmad *et al.* 2007; Kansal *et al.*, 2008). Por lo antes mencionado, esta industria ha invertido en poder eliminar sus impactos ambientales desde el origen, implementando la mejor tecnología disponible (MTD), con el objetivo de mantener y/o mejorar la eficiencia de producción y aumentar su compromiso con el cuidado del medio ambiente. En el caso particular de la industria de celulosa kraft, esta ha adoptado la tendencia mundial de eliminación de compuestos órganoclorados (AOX) como dioxinas policloradas (PCDD) y dibenzofuranos policlorados (PCDF), compuestos generados durante la etapa de blanqueo (Yeber *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2001; Catalkaya & Kargi., 2007). La disminución de AOX ha sido posible reemplazando el cloro molecular, por procesos que ocupan dióxido de cloro, llamados ECF (Elemental Chlorine Free) y por aquellos que utilizan oxígeno, peróxido de hidrogeno, ozono y enzimas, denominados TCF (Total Chlorine Free) con los que se ha logrado una disminución de AOX entre 48 – 65 % (Kostamo *et al.*, 2004). Previa descarga al cuerpo de agua receptor de estos efluentes, es necesario la implementación de sistemas de tratamientos principalmente para eliminación de sólidos suspendidos y carga orgánica medida como DBO<sub>5</sub> (Demanda Biológica de Oxígeno) y DQO (Demanda Bioquímica de Oxígeno) (Thompson *et al.*, 2001), permitiendo mediante la implementación de estos sistemas la eliminación de toxicidad aguda. Algunas industrias, dependiendo de la sensibilidad de los ambientes acuáticos receptores, han debido implementar tratamientos terciarios de tipo físico-químico con el propósito de eliminar compuestos específicos que producen color (Stephenson & Duff, 1996a). Estudios previos mencionan que pese a la implementación de sistemas de tratamientos secundarios para los efluentes, en la actualidad se reportan efectos de toxicidad crónica en organismos expuestos. Dicha toxicidad se atribuye a la presencia de una compleja mezcla de compuestos tanto del tipo orgánico como inorgánico, con alto (10.000 Da) y bajo peso molecular (1.000 Da), presente en efluentes de celulosa kraft (Vidal *et al.*, 2001; Chamorro *et al.*, 2010; López *et al.*, 2011).

## 1. 1 Industria forestal

### 1.1.1 Materia prima y sus constituyentes

Las principales especies de árboles utilizadas para la producción de celulosa kraft y papel son *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus* debido a la productividad de estas o edad de corte, de 20 – 25 años y 10 – 15 años, respectivamente. En Chile, del total de superficie plantada, el 74% corresponden a *P. radiata* y el 26 % restante a *E. globulus* y otras especies como *Atriplex sp*, *Populus nigra*, *Pseudotsuga menziesii* (Xavier, 2006; Corma, 2010). La variabilidad entre *P. radiata* y *E. globulus*, no sólo se debe a las diferencias morfológicas sino también a su composición química. La Tabla 2, muestra los constituyentes de la madera constituida principalmente de celulosa (42 – 50 %), la cual es un polisacárido lineal que consiste en unidades  $\beta$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces (1 – 4)-glucosídicos, hemicelulosa (25 – 35 %) compuesta de diferentes unidades de carbohidratos, lignina (17 – 31 %) caracterizada por ser un polímero complejo tridimensional y finalmente, compuestos extractivos de la madera (0,2 – 7,0 %) entre los que se encuentran ácidos grasos, ácidos resínicos y fitoesteroles, entre otros (LaFleur, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1998; Del Rio *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2010). Estos compuestos son importantes debido a las propiedades físico-químicas que presentan, siendo responsables del color, olor y protección de la madera (Rintala & Puhakka, 1994; Diez *et al.*, 2002). Se ha determinado que *P. radiata*, presenta un mayor porcentaje de extractivos de la madera (0,5 – 7,0), en comparación a *E. globulus*, el cual presenta entre 0,2 – 3,2 (Lafleur, 1996).

**Tabla 2.** Constituyentes de la madera en *E. globulus* y *P. radiata*.

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

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

### 1.1.2. Proceso de Producción de celulosa kraft y papel

El proceso de producción de celulosa kraft consiste principalmente en la remoción de lignina y hemicelulosa a través de compuestos químicos con el propósito de disolverlos y facilitar su separación para la obtención de celulosa. En Chile, se utiliza principalmente el proceso kraft (Figura 1a) que permite la recuperación de reactivos realizándose un pulpaje de tipo químico donde las astillas son cocidas en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na<sub>2</sub>S) en la etapa de digestión, obteniendo un rendimiento de pulpa entre el 40 – 50 %, además de un residuo líquido conocido como licor negro (Thompson *et al.*, 2001). El licor negro, corresponde a una mezcla de reactivos y compuestos orgánicos (extractivos de la madera, color, DBO<sub>5</sub>, entre otros) el cual posee un alto valor energético y mediante su quema en caldera de recuperación, es posible obtención de energía calórica y reactivos (Pokhrel & Viraraghavan, 2004). Posteriormente, se realiza la etapa de blanqueo de la pulpa kraft, mediante una secuencia de blanqueo que cuenta con una serie de etapas en las cuales se adiciona dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en forma secuencial. Una secuencia de blanqueo ECF considerada convencional es D<sub>0</sub>E<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, donde D corresponde a una etapa de oxidación con ClO<sub>2</sub> en condiciones ácidas y E representa una etapa de extracción alcalina con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. con un lavado entre cada una de estas, obteniendo grupos carboxilos hidrofílicos, incrementando la solubilidad de la lignina para finalmente la obtención de celulosa (Calvo *et al.*, 2007).

Para el caso de la producción de papel, esta requiere de una etapa de producción de pulpa, la cual puede obtenerse mediante procesos químicos o mecánicos. En la producción química, los trozos de madera se mezclan con vapor de agua y productos químicos tales como hidróxido de sodio (NaOH), bisulfito sódico (NaHSO<sub>3</sub>) hasta separar las fibras de celulosa, mientras que en la producción mecánica las fibras de celulosa se separan por trituración de la madera sometiéndola a altas temperaturas y presiones. La pulpa obtenida presenta residuos de lignina, hemicelulosas, resinas y otros. La producción mecánica (Figura 1b), se puede realizar bajo distintos procesos, tales como: desfibrador presurizado (PGW) o pulpaje termomecánico (TMP). En el proceso PGW, la madera es descortezada en seco en un descortezador de tambor (por efecto de roce), utilizando la corteza como combustible para alimentar la caldera y producir vapor. Posteriormente los trozos descortezados y lavados son transportados a desfibradores de piedra presurizados

para la obtención de pulpa, en los cuales los trozos son presionados contra una piedra cilíndrica de material abrasivo que gira con velocidad constante hasta producir una pasta acuosa para posteriormente, pasar a un refinador transformándola en pulpa mecánica aceptada. Posteriormente pasa a la etapa de prensado, secado y finalmente se produce el papel. El proceso TMP consta de una primera etapa donde se ablandan las astillas con vapor de agua para facilitar la separación de las fibras, posteriormente se introducen las astillas a presión en una zona entre dos discos que rotan en direcciones opuestas y a muy corta distancia. La acción de una serie de ranuras y barras sobre la superficie de estos discos separa las fibras, pudiendo obtener hasta tres estaciones de refinado en serie. Una vez obtenida la pulpa, es clasificada y filtrada de impurezas para posteriormente pasar a una máquina papelera que formará la hoja de papel (Papernet, 2010).

Durante las etapas de producción de celulosa kraft y producción de papel, se generan compuestos aportan color y compuestos específicos, entre estos, compuestos del tipo recalcitrantes en los efluentes de vertidos (Vidal *et al.*, 2007; Chaparro *et al.*, 2010), los cuales según estudios realizados se les atribuye toxicidad. Esta toxicidad se debe a la presencia de extractivos de la madera liberados durante el proceso de producción de celulosa y papel, atribuyéndoles toxicidad aguda a la presencia de ácidos resínicos y en menor proporción ácidos grasos insaturados (Belmonte *et al.*, 2006) y toxicidad crónica a la presencia de fitoesteroles (Xavier *et al.*, 2005; Chamorro *et al.*, 2010; López *et al.*, 2011).

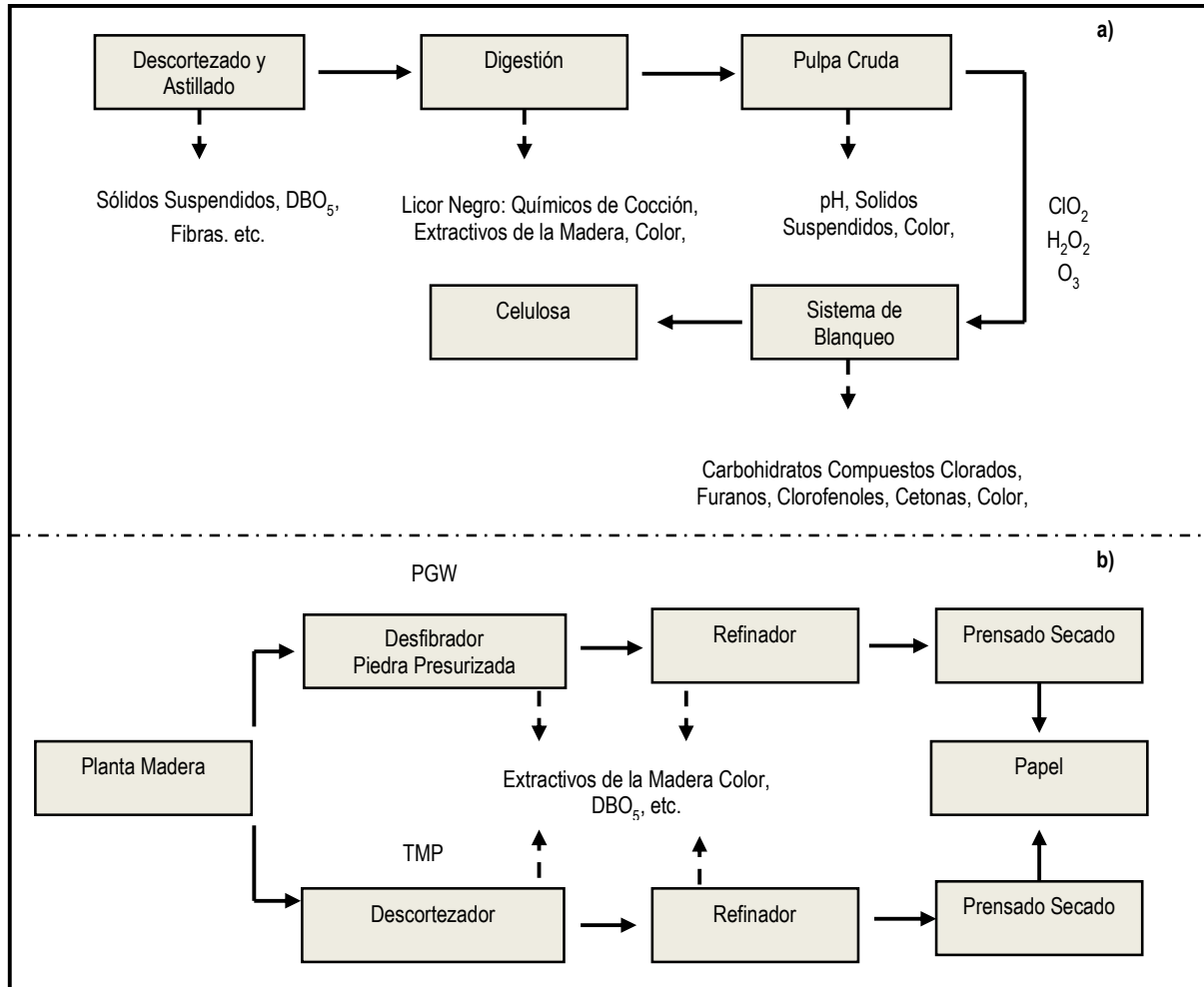


Figura 1. Proceso productivo: (a) Industria de celulosa kraft, (b) Industria de papel

### 1.1.3 Composición de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel

Los efluentes de la industria de celulosa kraft y papel poseen una variedad de compuestos tóxicos capaces de generar un efecto deletéreo en el ambiente acuático receptor si son descargados directamente (Catalkaya & Kargi, 2007). En estos efluentes existen más de 1000 compuestos orgánicos clorados, de los cuales sólo 300 han logrado ser identificados (Carrasco, 2004). En estos efluentes es posible identificar tres grupos principales de compuestos orgánicos, los que corresponden a productos de degradación del almidón, tales como sacáridos o ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos derivados de la lignina y otros contaminantes, tales como surfactantes (Amat *et al.*, 2005; Catalkaya & Kargi, 2007). En general estos efluentes se caracterizan por su alto contenido de sólidos suspendidos, carga orgánica (DBO<sub>5</sub> y DQO), color por presencia de ligninas, derivados de ligninas, taninos no polimerizados y AOX, estos últimos para el caso de celulosa kraft (Ali & Sreekrishnan, 2001; Carrasco, 2004). En el caso de los efluentes de celulosa kraft se ha detectado toxicidad aguda y crónica, atribuida a la presencia de compuestos orgánicos, tales AOX en los cuales el número y posición de los grupos de cloro en el anillo aromático, influirá en la biodegradabilidad y toxicidad aguda de estos y también a la presencia de extractivos de la madera como ácidos resínicos (Annachhatre & Gheewala, 1996; Belmonte *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008). Además en estos efluentes, se ha detectado toxicidad crónica atribuida también a extractivos de la madera, específicamente a fitoesteroles (Xavier *et al.*, 2005; Chamorro *et al.*, 2010; López *et al.*, 2011).

Los compuestos extractivos de la madera, son en general sustancias lipofílicas, apolares, constituidos principalmente de ácidos resínicos, fitoesteroles, triglicéridos, terpenos, fenoles polares y ácidos grasos (LaFleur, 1996). Estos compuestos son liberados a través del proceso de digestión del proceso productivo y pasan a formar parte del licor negro. Sin embargo, parte de estos compuestos, quedan adheridos en la fibra no blanqueada siendo posteriormente eliminados en el agua de lavado. Los extractivos de la madera que mayormente han sido estudiados son los ácidos resínicos y fitoesteroles (Belmonte *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2010).

Principalmente, los ácidos resínicos se caracterizan por ser terpenos tricíclicos, ácidos débiles, insolubles en agua, solubles en solventes orgánicos y neutros no polares, relativamente hidrofóbicos y lipofílicos, con un alto coeficiente de partición octanol agua ( $\log K_{ow}$ ) mayor a 4. Se

clasifican en dos grupos: abietanos (ácido abiético, dehidroabiético, neoabiético, palústrico y levopimárico) y pimáricos (pimárico, isopimárico y sandaracopimárico), siendo los más abundantes el ácido dehidroabiético (14 – 30 %) y ácido abiético (19 – 33 %) (Frigon *et al.*, 1999; Belmonte *et al.*, 2005). Debido a la estabilidad y resistencia que presenta la estructura de los ácidos resínicos frente a la degradación química, les permite resistir las etapas de digestión y blanqueo, siendo finalmente encontrado en efluentes de celulosa previamente tratados en concentraciones entre 0,008 – 1,36 mg/ L (Kamaya *et al.*, 2005; Quinn *et al.*, 2003).

Los fitoesteroles son compuestos hidrofóbicos pocos solubles en agua (solubles en diclorometano y metil-terc-butil-éter) y altamente lipofílicos con valores de log  $K_{ow}$  mayores a 6 (Hewitt *et al.*, 2000; Gúzman *et al.*, 2007) (Tabla 3). En estos efluentes se han encontrado fitoesteroles tales como campesterol, estigmasterol, estigmastanol, campestanol,  $\beta$ -sitoesterol, coumestrol y sitoestanol (Verta *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997). En general los fitoesteroles, se caracterizan por la presencia de una estructura química semejante al colesterol que es común a todos los esteroides el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y una cadena lateral, que los diferencia entre sí (Hovenkamp *et al.*, 2008). Por lo antes mencionado, los fitoesteroles cumplen una función similar a la del colesterol en el cuerpo humano, participando en las rutas endocrinas y con importancia en la formación y mantención de las membranas celulares (Guang-Guo *et al.*, 2002). El fitoesterol que se encuentra en mayor concentración, y que ha sido objeto de mayor investigación, es el  $\beta$ -sitoesterol (> 50 %), debido tanto a las concentraciones en que se encuentra presente en el licor negro como también en los efluentes de celulosa kraft sometidos a un tratamiento biológico (Xavier *et al.*, 2009). En menor proporción, se encuentran el campesterol, estigmasterol, estigmastanol, campestanol,  $\beta$ -sitoestanol y coumestrol, entre otros (Cook *et al.*, 1997), con concentraciones en efluentes de descargas entre 0,16 – 0,33 mg/ L, 0,02 – 0,07 mg/ L y 0,06 mg/ L para  $\beta$ -sitoesterol, estigmasterol y campesterol, respectivamente (Xavier *et al.*, 2009, Chamorro *et al.*, 2010). La persistencia de fitoesteroles se ha transformado en un problema para la industria, principalmente por su baja biodegradación encontrándolos finalmente en los efluentes que son vertidos al cuerpo de agua receptor e incluso disponible en los sedimentos cercanos a estos vertidos. Esto hace que la industria de celulosa kraft y papel sea una de las principales vías de ingreso de estos compuestos al ambiente acuático (Orrego *et al.*, 2005). Chamorro *et al.* (2013) registraron en sedimentos cercanos a esta industria presencia de algunos

grupos de extractivos de la madera como terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos), esteroides y compuestos derivados de ácidos resinosos (ácidos de resina), resultados que concuerdan con estudios previos (Chamorro *et al.*, 2010a, b). La retención de estos compuestos se relacionó a la alta concentración de materia orgánica en los sedimentos, sugiriendo además que la presencia de ácidos de resina puede deberse a la biodegradación de ácidos resinosos durante el tratamiento secundario de estos efluentes o por su temprana diagénesis en sedimentos (Tavendale *et al.*, 1997).

**Tabla 3.** Propiedades físico-químico de algunos extractivos de la madera presentes en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.

Compuesto	Peso molecular (g/ mol)	Log K <sub>ow</sub>	Solubilidad mg/ L 20°C	Referencia
Ácidos resinosos				
Ac. Abiético	302,5	4,6 – 7,5	2,75	1
Ac. Dehidroabiético	300,4	5,7 – 7,2	5,11	1 – 3
Fitoesteroides				
Estigmasterol	412,7	10,2	< 0,0001	4 – 6
Estigmasteranol	416,7	n.r.	< 0,0001	7
β-sitosterol	414,7	9,6	< 0,0001	4, 5, 7
Campesterol	412,6	n.r.	< 0,0001	4, 5

n.r.: no registrado; (1):Kamaya *et al.*, 2005; (2) Pen & Roberts, 2003; (3) Belmonte *et al.*, 2006; (4) Cook *et al.*, 1997; (5) Güçlü-Üstündag & Temelli, 2004; (6) MacLachy *et al.*, 1997; (7) Mahmood-Khan & Hall, 2003.

#### 1.1.4 Tratamiento de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel y toxicidad

Generalmente el tratamiento de efluentes de la industria forestal, consta de un tratamiento primario (floculación y sedimentación) y tratamiento secundario. El objetivo del tratamiento primario principalmente es remover los sólidos suspendidos alcanzando eficacias del 80 – 90 % (Thompson *et al.*, 2001), mientras que los tratamientos secundarios son utilizados principalmente para eliminación de materia orgánica (DQO, DBO<sub>5</sub> y COT). Los tratamientos secundarios consisten en sistemas biológicos, ya sea de tipo aeróbico o anaeróbico/aeróbico, siendo los más utilizados los de tipo aeróbico convencionales como las lagunas aireadas y lodos activados,

mediante los cuales ha sido posible obtener eliminaciones de carga orgánica y toxicidad aguda de estos efluentes.

#### **1.1.4.1 Tratamiento secundario de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel por sistemas de tipo aeróbicos**

Existen relaciones que determinan la biodegradabilidad del efluente, Thompson *et al.* (2001) mencionan que relaciones de DBO<sub>5</sub>/ DQO entre 0,4 – 0,5 permiten que estos efluentes sean tratados biológicamente. La Tabla 4 muestra las tecnologías utilizadas en el tratamiento de estos efluentes mencionando dentro de las tecnologías convencionales de tratamiento las lagunas aireadas y lodos activados. Estas tecnologías se caracterizan por su eficiencia en eliminación de DBO<sub>5</sub> y DQO, sobre el 90 % y entre 30 – 67 %, respectivamente, como también por la eliminación de toxicidad aguda asociada a compuestos orgánicos (Navia *et al.*, 2003; Kostamo *et al.*, 2004; Pokhrel & Viraraghavan, 2004). Thompson *et al.* (2001) estudió diferentes tratamientos utilizados en efluentes de la industria de celulosa kraft, mencionando a las lagunas aireadas y lodos activados como los procesos más utilizados para minimizar las descargas al ambiente.

Las lagunas aireadas y lodos activados se caracterizan por operar con tiempos de retención hidráulicos (TRH) entre 3,1 – 54,2 h y 9,8 – 45,6 h, respectivamente (Thompson *et al.*, 2001; Belmonte *et al.*, 2006; Kostamo *et al.*, 2004). Estos sistemas requieren para la oxidación microbiana de la materia orgánica entre 30 – 100 mg O<sub>2</sub>/ L (Pokhrel & Viraraghavan, 2004) y mediante lagunas aireadas, se han observado eliminaciones entre 73 – 95 % y 30 – 60 % para DBO<sub>5</sub> y DQO, respectivamente (Schnell *et al.*, 2000; Belmonte *et al.*, 2006) mientras que con lodos activados se han obtenido eficiencias de eliminación entre 73,5 – 99,2 % para DBO<sub>5</sub> y 30,3 – 67,0 % para DQO (Diez *et al.*, 2002). Los requerimientos actuales en las plantas de tratamiento de aguas residuales industriales han obligado a esta industria implementar nuevas tecnologías que puedan ser construidas en un menor espacio y similares en eficiencias a los sistemas convencionales antes mencionados. Por lo cual en la actualidad existen implementados de forma exitosa para el tratamiento de estos efluentes, sistemas de tipo aeróbico de biomasa adherida como son los biorreactores de biopelícula de lecho móvil (MBBR). Los MBBR son reactores de mezcla completa que mediante difusores de aire introducen burbujas al sistema desde el fondo

del reactor, donde la biomasa está adherida a un soporte inerte o carriers con una densidad de cerca 1 g/ cm<sup>3</sup> que les permite moverse fácilmente en el reactor, incluso hasta fracción de llenado del 70% (Odegaard, 2000; Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Villamar *et al.*, 2009). Dentro de las ventajas que presentan los MBBR se mencionan: evitar recirculación de lodos, permitir alta concentración de biomasa, capacidad de eliminar altas concentraciones de contaminantes orgánicos presentes en estos efluentes, mayor estabilidad del sistema y obtención de lodos de mejores características (Runsten *et al.*, 1994; Odegaard, 2000; Villamar *et al.*, 2009). En los MBBR se han obtenido eliminaciones entre 85,0 – 99,0 % y 24,0 – 60,0 % para DBO<sub>5</sub> y DQO, además de eliminación de nutrientes (Nitrógeno: N, Fósforo: P), siendo estas de 19,0 % N y 7,5 % P, con TRH que varían entre 4,8 – 48 h (Borch-Due *et al.*, 1997; Jahren *et al.*, 2002; Villamar *et al.*, 2009). La eliminación de toxicidad crónica en estos efluentes ha sido realizada principalmente en lagunas aireadas y lodos activados, obteniendo eficiencias de eliminación de fitoesteroles entre 35,0 – 100 % y 40,0 – 90,0 % para lodos activados y lagunas aireadas, respectivamente (Strömberg *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997; Kostamo & Kukkonen, 2003; Kostamo *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2009). Sin embargo, Chamorro *et al.* (2010a) registraron en MBBR eliminación de toxicidad crónica determinada como eliminación de actividad estrogénica con valores entre 80,0 – 83,0 %. A pesar de las eficiencias en eliminación de toxicidad crónica antes mencionada, no es claro si estas eficiencias se deben a su biodegradación, transformación química y/o adsorción en el lodo biológico (Fernández *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2007). Xavier *et al.* (2009), estudiaron la eliminación de fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) en lodos activados y lagunas aireadas, determinando en lodos activados porcentajes de biodegradación de un 78,4 % y 91,1 % y de adsorción en el lodo de 21,6 % y 8,9 % para  $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol, respectivamente. En lagunas aireadas, los porcentajes de adsorción en el lodo fueron considerablemente mayores, con valores del 100 % y 91 % para  $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol, respectivamente, y sin biodegradación para  $\beta$ -sitoesterol y solo del 9 % para el estigmasterol. Chamorro *et al.* (2010b) estudiaron la adsorción de compuestos con actividad estrogénica en lodos de MBBR, determinando que la actividad estrogénica acumulada por adsorción en lodos fue de un 22 % y 28 % para TRH de 2 d y 1 d, respectivamente, sugiriendo que el grupo de fitoesteroles específicamente el  $\beta$ -sitoesterol es uno de los responsables de actividad estrogénica. La falta de biodegradación de estos compuestos en los sistemas de tratamiento permitirán a través de estos

efluentes una vía de ingreso de compuestos con toxicidad en ecosistemas acuáticos, siendo posible la asociación de estos con partículas o materia orgánica disuelta y almacenamiento en los sedimentos (Orrego *et al.*, 2005; Orrego *et al.*, 2006, Chamorro *et al.*, 2013). Sin embargo, por ingesta o por procesos de adsorción estos compuestos pueden ser bioacumulados, permitiendo la circulación de compuestos con toxicidad a través de las cadenas alimentarias (Fernández *et al.*, 2007).

**Tabla 4.** Eficiencia de eliminación de sistemas de tratamientos secundarios en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.

Parámetro	Unidad	Biomasa libre		Biomasa adherida
		Lodo activado <sup>1-5,8</sup>	Laguna aireada <sup>4,6-8</sup>	MBBR <sup>9-13</sup>
TRH	h	9,8 – 45,6	3,1 – 54,2	4,8 – 48
pH		7,5 ± 0,6	7,4 ± 0,6	7,7 ± 0,4
DQO	%	30,3 – 67,0	30,0 – 60,0	24,0 – 60,0
DBO <sub>5</sub>	%	73,5 – 99,2	73,0 – 95,0	85,0 – 99,0
Fenoles totales (UV <sub>215</sub> )	%	3,6	8,0 – 20,0	4,2 – 39,3
Nitrógeno Total	mg/L	3,7 ± 2,8	n.r	0,5 ± 0,1
Fósforo Total	mg/L	6,5 ± 3,5	n.r	0,7 ± 0,2
Ácidos grasos volátiles	mg/L	1,9 – 256,1 <sup>a</sup>	n.r	16,6 – 35,0 <sup>b</sup>
Esteroles	mg/L	0,02 – 3,4 <sup>c</sup>	n.r	< 0,0002
Esteroles	%	35 – 100	40 – 90	80,0 – 83,0 <sup>d</sup>

n.r.: no registrado; a: ácido. acético, ácido. Propiónico, ácido. Iso-butírico, ácido n-butírico, ácido iso-valérico, ácido n-valérico; b: acid. Acético, acid. Propiónico, acid. Butírico; c: β-sitosterol, estigmasterol, campesterol; d: actividad estrogénica expresada como equivalentes 17-a-etinilestradiol; (1): Diez *et al.*, 2001; (2): Diez *et al.*, 2002; (3): Kostamo *et al.*, 2004; (4): Belmonte *et al.*, 2006; (5): Bengtsson *et al.*, 2008; (6): Chamorro *et al.*, 2005; (7): Chamorro *et al.*, 2009; (8): Xavier *et al.*, 2009; (9) Villamar *et al.*, 2009; (10): Chamorro *et al.*, 2010a; (11): Chamorro *et al.*, 2010b; (12): Pozo *et al.*, 2012; (13): Jarpa *et al.*, 2012.

#### 1.1.4.2 Tratamientos terciarios en efluentes de la industria celulosa kraft y papel

En la actualidad, algunas industrias de celulosa kraft y papel utilizan como tratamiento terciario procesos de precipitación química con el propósito de eliminar color del efluente. El color de los efluentes es atribuido a la presencia de compuestos recalcitrantes, tales como extractivos de la madera, taninos, lignina, derivados de lignina, entre otros y generalmente estos contaminantes se encuentran como materiales en suspensión, coloidales o disueltos (Stephenson & Duff, 1996a).

La precipitación química se basa en la adición de sales de aluminio o hierro los cuales actúan como coagulantes, mediante la desestabilización de la suspensión coloidal y su floculación posterior. La eficiencia del tratamiento puede ser alterada por fluctuaciones de pH, dosis del coagulante y el tiempo (Westerhoff *et al.*, 2005). Estudios realizados específicamente en efluentes de celulosa kraft, determinaron eliminación de Carbono Total (CT), color y turbidez del 88 %, 90 %, 98 %, respectivamente. Estos resultados fueron obtenidos con rangos de pH entre 4,0 – 6,5 para cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), sobre 7,4 para sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ), 5,0 – 6,0 para cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) y 5,8 - 6,8 para sulfato de aluminio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) (Stephenson & Duff (1996b)). A pesar de las eficiencias obtenidas mediante precipitación química, este tratamiento presenta desventajas tales como las altas dosis de coagulantes utilizados y generación de una fase sólida, en la cual se encuentran los compuestos precipitados tales como AOX y extractivos de la madera como ácidos resinícos, fitoesteroles, entre otros y que deberá ser dispuesta (Stephenson & Duff, 1996a).

Por lo antes mencionado, como alternativa para el tratamiento terciario, debido a la baja eficacia y falta de estudios de la eliminación de toxicidad en precipitación química, los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) son una alternativa al tratamiento de los efluentes provenientes de los sistemas biológicos, con el propósito de eliminar la materia orgánica recalcitrante (Catalkaya & Kargi, 2008) y la toxicidad crónica presente en estos efluentes.

Los POAs han sido aplicados especialmente en donde los métodos convencionales pierden eficiencia (Altesor *et al.*, 2008) pudiendo utilizarse solos o combinados (Marco *et al.*, 1997; Bijan & Mohseni, 2005; Forero *et al.*, 2007). Los POAs están basados en procesos químicos, capaces de producir cambios en la estructura química de los contaminantes mediante la generación de

radicales hidroxilos  $\text{OH}^\bullet$  y adición de átomos de oxígeno generando radicales peróxidos, iniciando con ello la degradación oxidativa de compuestos recalcitrantes obteniendo como productos finales de reacción  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y sales (Muñoz *et al.*, 2006). Existen diversos agentes oxidantes, siendo el flúor el de mayor potencial de reducción (3,03) mientras que el más bajo es el cloro (1,36) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Potenciales de reducción de algunos agentes oxidantes.

Especie	$E_o$ (V, 25°C)
Fluor	3,03
Radical hidroxilo	2,80
Oxígeno atómico	2,42
Ozono	2,07
Peróxido de hidrógeno	1,78
Radical perhidroxilo	1,70
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Ácido hipocloroso	1,49
Cloro	1,36

$E_o$ : potencial de reducción

Entre las principales tecnologías de oxidación avanzada se encuentran los sistemas homogéneos y sistemas heterogéneos, con generación de radicales con o sin irradiación ultravioleta (UV). Cabe mencionar entre los sistemas homogéneos, los sin irradiación como: ozonización ( $\text{O}_3$ ),  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ , Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ) y con irradiación:  $\text{O}_3/\text{UV}$ ,  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ , foto-Fenton ( $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ). En el caso de sistemas heterogéneos, se encuentran  $\text{UV}/\text{TiO}_2$ ,  $\text{UV}/\text{ZnO}$ ,  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ ,  $\text{O}_2/\text{UV}/\text{ZnO}$ ,  $\text{O}_3/\text{UV}/\text{ZnO}$  entre otros (Masten & Davies, 1994; Andreozzi *et al.*, 1999; Fontanier *et al.*, 2006; Assalin *et al.*, 2009).

Estudios previos han demostrado que POAs incrementan la eliminación de contaminantes emergentes a los cuales se les ha atribuido toxicidad crónica del tipo endocrino mencionando entre estos compuestos: productos farmacéuticos, productos de cuidado personal (PPCP),

surfactantes, entre otros (Ying *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2006; Bolong *et al.*, 2009). En efluentes de la industria forestal, se han estudiado la aplicación de O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/ UV, O<sub>3</sub>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton, foto-Fenton, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y UV/ TiO<sub>2</sub> para la eliminación del contenido de carga orgánica y de la toxicidad presente en estos efluentes. Es así como con procesos de UV/ TiO<sub>2</sub> se han obtenido eliminaciones de 79,6% y 94% para COT y toxicidad, respectivamente (Muñoz *et al.*, 2006; Catalkaya & Kargi, 2008). Para el caso del O<sub>3</sub>, Amat *et al.* (2005) mencionan que la oxidación es viable, obteniendo una completa degradación de productos de la lignina (compuestos fenólicos) y una disminución de carga orgánica de hasta un 76 % para DQO, del 51 % para COT y de entre 36,0 y 90,0 % para los ácidos resinícos (Fontanier *et al.*, 2006; Ledakowics *et al.*, 2006; Eskelinen *et al.*, 2010). Estos resultados se deben a que el O<sub>3</sub> una vez disuelto en agua puede reaccionar con muchos compuestos orgánicos mediante dos vías: por reacción directa del ozono molecular o indirecta a través de la formación de oxidantes secundarios, especialmente especies de radicales libres (Rodríguez *et al.*, 2008). Además, se han realizados estudios de O<sub>3</sub> en combinación con luz UV y con sistemas biológicos, obteniendo para esta última combinación eliminaciones del 75,5 %, 59,1 %, 77,0 % y 52,3 % de DQO, COT, color y fenoles totales respectivamente, permitiendo además la conversión de moléculas de alto peso molecular (10.000 Da) a moléculas de bajo peso molecular (1.000 Da) (Assalin *et al.*, 2009; Bijan & Mohseni., 2005). Mansilla *et al.* (1997) realizaron estudios con O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/ UV, O<sub>2</sub>/ ZnO/ UV, O<sub>2</sub>/ TiO<sub>2</sub>/ UV y O<sub>3</sub>/ ZnO/ UV, obteniendo para los dos primeros, una eliminación de un 30 % de color después de 15 minutos de reacción, sin cambio significativo de pH (9,5 – 10,8), además de una eliminación de DQO del 20 %. En el caso de O<sub>2</sub>/ ZnO/ UV, O<sub>2</sub>/ TiO<sub>2</sub>/ UV, O<sub>3</sub>/ ZnO/ UV, obtuvieron una disminución de color (40 %), en el primer minuto de tratamiento, con disminuciones de pH de 10,8 a 8 y una eficiencia en eliminación de DQO del 50 %. Para el caso de la DBO<sub>5</sub>, en ambos casos existe un incremento de esta, la cual se explica por la oxidación de compuestos con alto peso molecular a compuestos más biodegradables. Para el caso de Fenton y foto-Fenton se han registrado eliminaciones de DQO mayores al 60 %, 20 – 96 % para COT, 82 – 85 % para color y del 87 % para β-sitosterol (Pérez *et al.*, 2002; Torrades *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2007; Eskelinen *et al.*, 2010) y cuando se ha aplicado UV /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se han registrado eliminaciones del 74 %, 41 % y entre 8 – 45 %, para DQO, color y COT, respectivamente (Catalkaya & Kargi, 2007).

Por lo antes mencionado, debido a las ventajas que presentan los POAs en comparación a los tratamientos terciarios de tipo convencional, podrían ser un tratamiento efectivo para la eliminación de compuestos con toxicidad crónica presentes en estos efluentes (Forero *et al.*, 2007). Esto se debe a que incrementan la biodegradabilidad de los efluentes, aumentando la relación DBO<sub>5</sub>/ DQO, ya que eliminan materia orgánica y compuestos recalcitrantes (Hostachy *et al.*, 1997; Bijan & Mohseni, 2005; Fontanier *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2008).

## **2. Revalorización de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel a través de producción de polihidroxicanoatos (PHAs)**

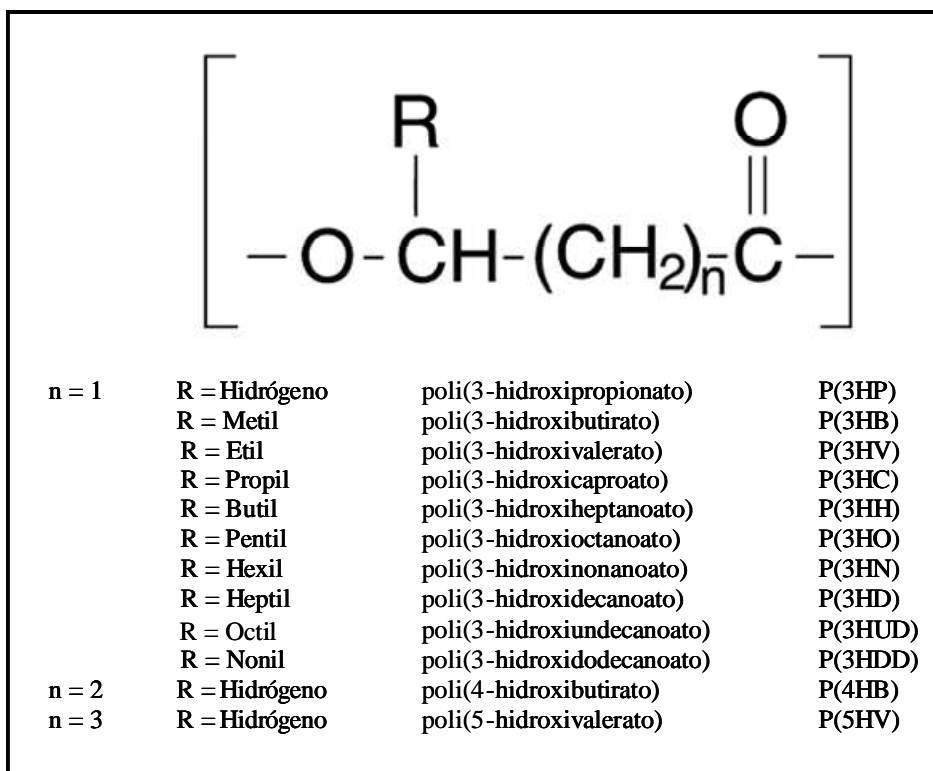
La industria de celulosa kraft y papel durante el tratamiento biológico de sus efluentes genera varias toneladas de exceso de lodo por día (Malmqvist *et al.*, 2004) con valores aproximados entre 1,8 – 3,5 ton lodo/ ton DBO<sub>5</sub> removida. Estos lodos, posteriormente deberán ser quemados en calderas de biomasa para generación de energía y sus cenizas deberán ser dispuestas en lugares de acopio propios de la empresa, constituyendo un costo. Por lo antes descrito, han comenzado a realizarse estudios sobre producción de polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de este tipo de efluentes con el propósito de otorgar un valor agregado a estos lodos generados, correspondiendo a una alternativa prometedora en la producción de plásticos biodegradables debido a que sus características físicas, mecánicas y térmicas son similares a las de los plásticos sintéticos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Comparación de propiedades fisicoquímicas de PHA y polipropileno.

Propiedades	PHA	Polipropileno
Peso molecular (Dalton)	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
Elongación al quiebre (%)	30 – 70	60
Cristalización (%)	8 – 69	400
Tm (°C)	42 – 178	176
Costo (\$/ Kg)	0,22 – 0,53	0,18

Chen, 2010

Los PHAs son una familia de poliésteres compuestos principalmente por ácidos R-3 hidroxialcanoicos, siendo sintetizados de manera natural por más de 300 especies bacterianas, mencionando entre estas: *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli* recombinante (Lee, 1996; Luengo *et al.*, 2003). Estos microorganismos acumulan el PHAs en forma de gránulos intracelulares, siendo el principal uso para las células el servir de reserva de carbono y energía (Chen & Li, 2008). La estructura de los PHAs se representa en la Figura 2 donde n puede ser n = 1 con un grupo R = Hidrógeno, metil, etil, propil, butil, pentil, hexil, heptil, octil o nonil; n = 2 con R=Hidrógeno o n = 3 con R = Hidrógeno. Los PHAs son clasificados en dos grandes grupos basándose en el número de átomos de carbono en las unidades monoméricas, encontrando los que poseen entre 3 – 5 átomos de carbono y los que poseen entre 6 – 16 átomos de carbono. El poli(3-hidroxi butirato) o [P(3HB)] es el tipo más común de PHAs, aunque se pueden obtener distintos tipos de biopolímeros dependiendo del tipo del sustrato, como el poli(3-hidroxi valerato), [(P(3HV))], poli(3-hidroxi propionato) o [(P(3HP))] y poli(4-hidroxi butirato) o [(P(4HB))] (Poirier *et al.*, 1995; Chen & Li, 2008).



**Figura 2.** Estructura general de los PHAs (Adaptado de Poirier *et al.*, 1995).

El mecanismo de biosíntesis de los PHAs deriva de intermediarios de la síntesis de ácidos grasos cuya producción depende de factores como el tipo de sustrato (Yan *et al.*, 2006; Chua *et al.*, 2003), condiciones desbalanceadas de fuente de carbono (alternancia de alta carga orgánica o “banquete” y de baja carga orgánica o “hambruna”), pH (Chua *et al.*, 2003), tipo de bacteria y enzimas especializadas para la síntesis de PHAs que éstas posean (Nelson *et al.*, 2008). Además de limitación de elementos esenciales como N (nitrógeno), P (fósforo), S (azufre), O (oxígeno), Mg (magnesio) (Punrattanasin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). El almacenamiento de PHAs se da preferentemente luego de períodos de “hambruna” de la célula, ya que la célula limita el crecimiento celular y favorece el almacenamiento de la fuente de carbono principalmente debido a que cantidad de enzimas y ARN requerido para esos procesos es menor (Días *et al.*, 2006).

Por las características antes mencionadas, los PHAs han sido comercialmente producidos por fermentación desde cultivos puros de cepas, utilizando como sustratos acetato, glucosa, entre

otros (Bengtsson *et al.*, 2008), registrando para *Alcaligenes latus* producciones de PHAs del 88 % del peso seco del lodo y del 76 % del peso seco del lodo para *Escherichia coli* recombinante (Wang & Lee, 1997; Lee & Chang, 1994; Chua *et al.*, 2003). Sin embargo, los costos de producción resultan altos, alcanzando en algunos casos hasta cinco veces el costo de producción de plásticos derivados del petróleo, con valores entre 0,22 – 0,53 \$/ Kg (Chen *et al.*, 2010). Por lo antes mencionado, la tendencia ha sido la sustitución de la fuente de carbono utilizada como sustrato por el uso de contaminantes orgánicos, tales como: aguas municipales, efluentes de la industria de celulosa kraft y papel e industria lechera, entre otras (Braunegg *et al.*, 1998; Satoh *et al.*, 1999; Chua *et al.*, 2003; Chen & Li, 2008; Bengtsson *et al.*, 2008). La Tabla 7 muestra estudios de producción de PHAs mediante cultivos puros y mixtos con efluentes de la industria de la industria de celulosa kraft y papel, encontrando en cultivos puros de cepas que utilizan como sustratos glucosa, ácidos grasos y efluentes de celulosa kraft producciones mayores al 60 % del peso seco del lodo y producciones de PHAs entre 0,1 – 2.000 ton/ año (Chen, 2010; Tobella *et al.*, 2005). Con cultivos microbianos mixtos, se han registrado producciones de PHAs mayores al 30 % del peso seco del lodo en sistemas batch, lodos activados y en MBBR (Yan *et al.*, 2006; Chen & Li, 2008; Pozo *et al.*, 2011; Pozo *et al.*, 2012). Estos resultados resultan prometedores para la producción de PHAs, debido a que en cultivos mixtos es posible simplificar el control de los sistemas de tratamiento, disminuyendo por ejemplo los costos en los procesos de esterilización requeridos en cultivos puros (Takabatake *et al.*, 2002; Bengsston *et al.*, 2008).

En cuanto a la biodegradación de PHAs, esta es realizada por microorganismos que contienen la enzima PHA depolimerasa, capaz de degradar PHAs hasta CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O ya sea en unos meses hasta algunos años y bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Pettinari *et al.*, 2004). La biodegradabilidad del PHAs estará determinada por sus propiedades físicas y químicas. Los PHAs de bajo peso molecular son más susceptibles a la biodegradación. También influye la temperatura de fusión, donde a un mayor punto de fusión presentado por el polímero su biodegradabilidad decrece, es decir, su biodegradabilidad enzimática decae. Otros factores a considerar en la biodegradabilidad de los PHAs son la población microbiana y la temperatura (Nishida & Tokiwa, 1992).

**Tabla 7.** Producción de Polihidroxicanoatos mediante cultivos puros y mixtos con efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.

Cultivo	Productividad	Fuente de Carbono	AGV/ AGV <sub>T</sub> (mg DQO/ mg DQO)	Producción PHA (% Peso seco células)	Referencia
Puro					
<i>Ralstonia eutrofa</i>	300 – 2000 <sup>a</sup>	Glucosa + propionato		> 75	
<i>Ralstonia eutrofa</i>	1 <sup>a</sup>	Ácidos grasos	n.r.	> 80	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,1 – 1 <sup>a</sup>	Ácido laurico		> 50	
<i>Pseudomonas putida</i>	0,1 <sup>a</sup>	Ácidos grasos		> 60	
<i>Sphingopyxis chilensis</i>	N.D.	Efluente celulosa kraft	n.r.	80 – 90	2
<i>Wautersia sp</i>					
Mixtos					
Batch	0,23 <sup>b</sup>	Acetato (Lodo celulosa)	n.r.	43	3
Batch	0,001 <sup>b</sup>	Efluente celulosa kraft y papel		> 15	3
Fermentación/ Lodo activado/			0,35 (Ác. acético)		4
Batch	0,11 <sup>c</sup>	Efluente papelera	0,38 (Ác. propiónico)	32 – 48	
			0,18 (Ác. butírico)		
Fermentación/ SBR/ Batch	0,6 – 0,8 <sup>c</sup>	Efluente papelera	n.r.	77	5
Batch	0,10 – 0,14 <sup>c</sup>	Efluente celulosa kraft	n.r.	30	6
MBBR	N.D.	Efluente celulosa kraft	n.r.	16	7

n.r.: no registrado; a: ton/ año; b: g/ L • h; c: Kg / Kg DQO; d: % células que acumulan PHA; (1): Chen, 2010; (2): Tobella *et al.*, 2005; (3): Yan *et al.*, 2006; (4): Bengtsson *et al.*, 2008; (5) Jiang *et al.*, 2012; (6): Pozo *et al.*, 2011; (7): Pozo *et al.*, 2012.

### **3. Toxicidad crónica contenida en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel**

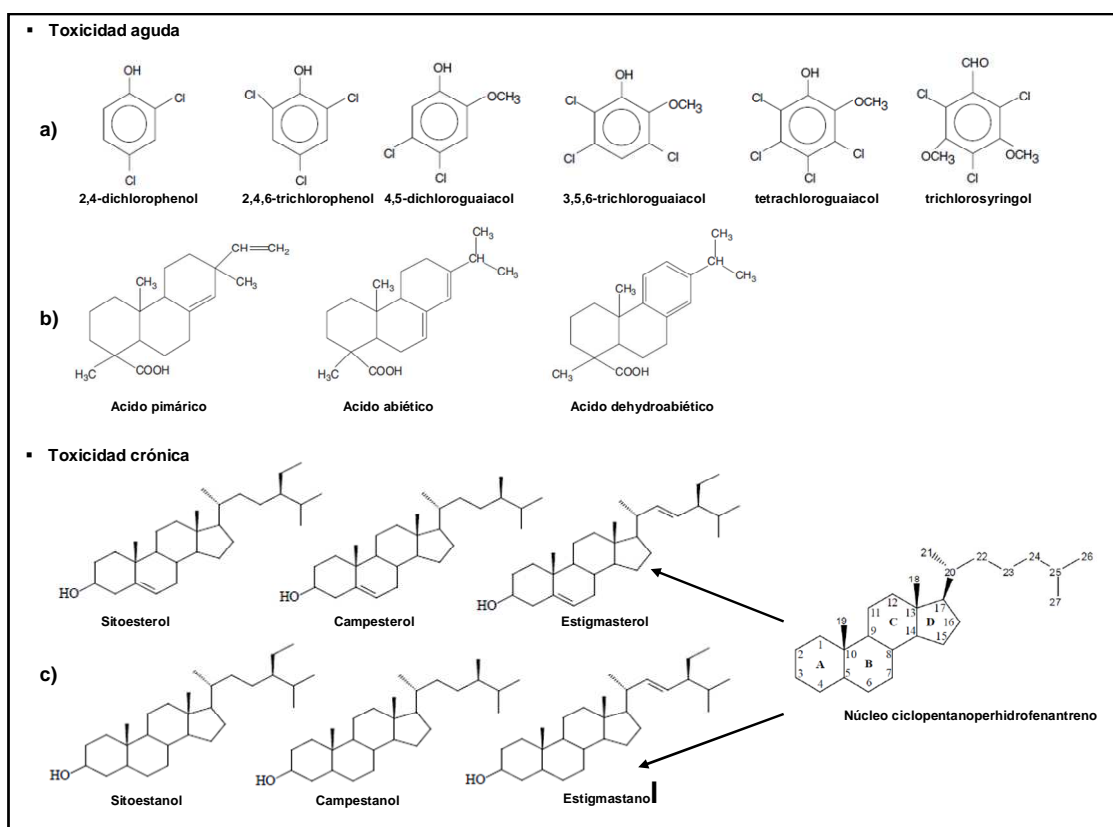
#### **3.1 Efectos de toxicidad crónica en organismos expuestos a efluentes de celulosa kraft y papel**

Los efectos de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel han sido estudiados por más de 40 años, detectando efectos en organismos expuestos principalmente en efluentes de la industria de celulosa kraft (Orrego *et al.*, 2006; Hewitt *et al.*, 2008). Por este motivo, ha sido necesaria la aplicación de normativas a los cuales esta industria ha respondido logrando una reducción significativa de efectos agudos en el medio ambiente. Sin embargo, en la actualidad diversos estudios atribuyen a estos efluentes una toxicidad crónica, debido a la presencia de compuestos como extractivos de la madera, específicamente fitoesteroles (Chamorro *et al.*, 2010a, b; López *et al.*, 2011).

El efecto que pueda ocasionar dichos compuestos en organismos expuestos, dependerá de la sensibilidad de las especies expuestas, materia prima utilizada durante el proceso productivo, sistemas de pulpaje y blanqueo, características físico-químicas del efluente y capacidad de dilución del cuerpo de agua receptor, entre otros (Orrego *et al.*, 2005; Chamorro *et al.*, 2010a, b). Las propiedades físico-químicas de cada compuesto (coeficiente de partición octanol/ agua:  $K_{ow}$ ), determinará la solubilidad o insolubilidad en agua, como también si son compuestos altamente lipofílicos. Dichos efectos pueden ser observados en distintos niveles de organización jerárquica, desde nivel molecular al ecosistémico, donde a medida que aumenta el nivel de organización, aumenta el nivel de complejidad (Ali & Sreerishnan, 2001; Guzmán *et al.*, 2007).

Por lo antes mencionado, la mayoría de estos estudios han sido realizados en niveles de organización biológica más simples, es decir, a nivel de organismo (Altesor *et al.*, 2008), determinando presencia de compuestos con tendencia a procesos de adsorción y bioacumulación en organismos expuestos, principalmente por los valores  $\log K_{ow}$  que poseen (ácidos resinícos  $\log K_{ow}$  mayores a 4 y fitoesteroles  $\log K_{ow}$  mayores a 6), constituyendo una vía de entrada al ambiente acuático (Cook *et al.*, 1997; Khan & Hall, 2003). Estudios previos han registrado que los fitoesteroles provocarían toxicidad crónica con efectos del tipo de disrupción endocrino en organismos expuestos (LaFleur, 1996), entendiendo por compuestos disruptores endocrinos (CDEs) aquellos compuestos capaces de presentar actividad estrogénica,

antiestrogénica o androgénica en organismos expuestos a dichos compuestos (Argemi *et al.*, 2005). Es decir, existen sustancias químicas, naturales o artificiales, capaces de actuar como agonistas o antagonistas hormonales alterando la síntesis, almacenamiento y metabolismo hormonal de organismos (Servos *et al.*, 1996). Dentro de los compuestos presentes en estos efluentes, los considerados CDEs son el  $\beta$ -sitoesterol, estigmastanol, campesterol y estigmasterol (Xavier *et al.*, 2006; López *et al.*, 2011). Esto es debido a que los fitoesteroles presentan una estructura química semejante al colesterol, que es común a todos los fitoesteroles (núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno) y una cadena lateral que los diferencia entre sí (Figura 3) (Hovenkamp *et al.*, 2008). Por lo antes mencionado, los fitoesteroles cumplen una función similar a la del colesterol, participando en las rutas endocrinas (Fernández *et al.*, 2003) y con importancia en la formación y mantención de las membranas celulares (Guang-Guo *et al.*, 2002).



**Figura 3.** Estructura de algunos compuestos con toxicidad detectados en efluentes de la industria forestal, a): compuestos organoclorados; b): ácidos resinicos; c): fitoesteroles.

La Tabla 8 muestra estudios realizados en Suecia, Canadá, Finlandia, Estados Unidos, Nueva Zelandia y Chile, en los cuales se ha registrado toxicidad crónica del tipo de disrupción endocrina, específicamente en efluentes de celulosa kraft sobre peces expuestos (*Perca fluviatilis*, *Rutilus rutilus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*, *Gambusia affinis holbrooki*, *Percilia gillissi* y *Trichomycterus aerolatus*, entre otros). Dentro de los efectos encontrados, se mencionan: disminución del tamaño de gónadas, disminución de los niveles de esteroides sexuales en plasma, retraso madurez sexual, alteración de la expresión de las características secundarias, disminución de la producción de huevos, entre otros. La disminución del tamaño de las gónadas ha sido demostrada en estudios realizados en *P. fluviatilis*, *R. rutilus*, siendo reportada más notoriamente en Finlandia, Nueva Zelandia, Suecia y Canadá, coincidiendo para los dos últimos, retraso de la maduración sexual para *R. rutilus* (Van Der Kraak *et al.*, 1992; Munkittrick *et al.*, 1994; Orrego *et al.*, 2005; Orrego *et al.*, 2006; Hewitt *et al.*, 2008). La vitelogenina plasmática (Vtg) es frecuentemente utilizada como biomarcador para peces machos expuestos a sustancias estrogénicas y normalmente está presente sólo en plasma de peces hembras en estado de madurez sexual, sin embargo frente a la exposición de CDEs, puede verse inducida la síntesis de Vtg tanto en peces machos como juveniles hembras. Orrego *et al.* (2005) registraron un aumento de los niveles de Vtg, inducción del citocromo P4501A (CYP1A), utilizado para medir la actividad de la 7-etoxyresorufina-O-deetilasa (EROD) el cual es utilizado como biomarcador de exposición a dioxinas y compuestos similares a dioxinas, aumento de la madurez del tejido gonadal (presencia de oocitos en estado vitelogénico) y aumento del índice gonadosomático (IGS), en muestras de *O. Mykiss* expuestos a sedimentos de la zona de impacto de descarga de efluentes de celulosa kraft. Estudios realizados en Hemisferio Norte, señalan inducción, reducción o inhibición de los niveles de vtg en ambos sexos (Hewitt *et al.*, 2008). Chiang *et al.* (2010) estudiaron el efecto sobre especies nativas chilenas (*P. gillissi*, *T. aerolatus*), confirmando disrupción endocrina en poblaciones silvestres de peces de ríos chilenos. Dentro de los efectos observados, mencionan alteraciones a nivel molecular en las hembras de ambas especies, con altas producciones de esteroides sexuales y además inducción de maduración gonadal y en periodo de desove, inhibición de madurez, demostrando además alteraciones del equilibrio homeostático debido a que las hembras desvían parte de la energía requerida para el crecimiento somático hacia el desarrollo de estructuras reproductivas. Cody & Bortone (1997) evidenciaron en

hembras de *G. affinis holbrooki* (pez mosquito), la alteración de características sexuales secundarias con masculinización de hembras mediante la formación de un gonopodium, siendo este una elongación en la aleta anal desarrollada típicamente en machos, demostrándose así la biodisponibilidad de los compuestos disruptores endocrinos para este tipo de efluentes.

### **3.2 Bioindicador *Daphnia sp.***

*Daphnia sp* es un cladóceros de la clase crustácea y representante de la comunidad zooplanctónica de aguas dulces y que forma parte de cadenas alimenticias en los ambientes dulceacuícolas (Larsson & Dodson, 1993). Este organismo se caracteriza por presentar una alta sensibilidad a contaminantes en comparación a otras especies de invertebrados (Gaete *et al.*, 1999), presenta ciclos de vida cortos y se reproduce de forma partenogenética. La reproducción partenogenética le permite la obtención de múltiples generaciones clones, evitando con ello diferencias genéticas entre organismos (Olmstead & LeBlanc., 2000; Barata *et al.*, 2004). *Daphnia sp.* ha sido históricamente utilizada en los test de toxicidad aguda de sustancias químicas en el medio acuático (USEPA., 1994), como también en estudios de toxicidad crónica (López *et al.*, 2011), correspondiendo al único tipo de bioensayos con invertebrados acuáticos reconocidos por organizaciones internacionales como la U.S. *Environmental Protection Agency* (USEPA), la Comunidad Económica Europea (CEE) y la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), siendo requeridos regularmente en todos los países. Los ensayos de toxicidad aguda, están basados en respuestas letales como mortalidad o inmovilidad, determinando la concentración letal 50 (LC<sub>50</sub>), la cual determina la concentración del tóxico que es capaz de matar o inmovilizar el 50 % de la población en 48 horas (USEPA 1994, Nch 2083, 1999). Posteriormente, son realizados los test de toxicidad crónica en los cuales se evalúan la capacidad reproductiva o crecimiento de los individuos, relacionando además el crecimiento abdominal con respecto al crecimiento total de su cuerpo mediante la determinación de la tasa de crecimiento alométrico (TCA) (USEPA 1994; Olmstead & LeBlanc, 2002; López *et al.*, 2011). En los últimos años alteraciones en el desarrollo sexual de *Daphnia sp.* han sido utilizados como criterio de valoración tras la exposición a compuestos con toxicidad crónica (López *et al.*, 2011). Estos resultados han entregado información útil desde un punto de vista ecológico, debido a que

entrega concentraciones de seguridad del compuesto ensayado para la población expuesta, mencionando que en el medio natural estos compuestos, se encuentran concentraciones de muy pequeñas (0,16 – 0,33 mg/ L, 0,02 – 0,07 mg/ L y 0,06 mg/ L para  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y campesterol, respectivamente) que pueden resultar inocuas a corto plazo, pero ser extremadamente peligrosas para la fauna durante su ciclo de vida (Xavier *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2010). López *et al.* (2011), estudiaron distintas combinaciones de efluentes de celulosa kraft (*P. radiata*, mezcla *P. radiata* 50%: *E. globulus* 50%) con fitoesteroles ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol), registrando reducciones del TCA del 17 % y 27 % en el día 14 y 21 del bioensayo. Mientras que Xavier *et al.* (2005), observaron incrementos del largo del cuerpo y de la longitud abdominal del 20 % y 2 %, cuando *D. magna* fue expuesta a concentraciones de efluentes de celulosa kraft del 10 % y 20 %, respectivamente, evidenciando un efecto positivo en el crecimiento abdomen/ cuerpo de hembras expuestas al 5 % del efluente, relacionando estos efectos con alteraciones endocrinas.

**Tabla 8.** Efectos del potencial biológicos del tipo de toxicidad crónica ocasionados por la exposición de efluentes de celulosa kraft o compuesto específico.

Especie	Efluente y/o compuesto	Principal efecto	Referencia
<i>Perca fluviatilis</i> / <i>Rutilus rutilus</i>	Celulosa kraft	Reduce tamaño gónadas, mortalidad larval	1 – 2
<i>Gambusia holbrokii</i>	Celulosa kraft	Decrecimiento de hormonas masculinas.	3
<i>Zoarces viviparous</i>	Celulosa kraft	Mayor porcentaje de embriones	4
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Celulosa kraft	Inducción de EROD y VIT, Decrecimiento de hormonas	5 – 7
<i>Percilia gillissi</i> , <i>Trichomycterus aerolatus</i>	Celulosa kraft	Incremento esteroides sexuales, inducción maduración sexual	8
<i>Salmo trutta</i>	Fitoesteroles	Mortandad de ovas	9
<i>Gambusia affinis</i>	Celulosa kraft	Formación de gonopodio (hembra)	10

(1) Sandström, 1994; (2) Sandström, 2003; (3) Jenkins *et al.*, 2003, (4) Larsson *et al.*, 2002; (5) Oakes *et al.*, 2005; (6) Orrego *et al.*, 2005; (7) Orrego *et al.*, 2006; (8) Chiang *et al.*, 2009; (9) Lehtinen *et al.*, 1996; (10) Cody & Bortone., 1997; EROD: ethoxyresorufin-O-deethylase; VIT: vitelogenina en machos.

## **CAPITULO II**

### **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## **1. HIPOTESIS**

A pesar de los cambios tecnológicos en los procesos de digestión y blanqueo, en la actualidad siguen observándose efectos de toxicidad en organismos expuestos a efluentes de la industria celulosa kraft y papel del tipo de toxicidad crónica, la cual es atribuida a compuestos de origen natural como son los extractivos de la madera. Por lo que se plantea la siguiente hipótesis:

Mediante la combinación de tratamientos secundarios y terciarios es posible eliminar la toxicidad contenida en efluentes de celulosa kraft y papel.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la toxicidad de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel tratados por sistemas de tratamientos secundarios y terciarios.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Conocer la eficiencia de sistemas de tratamientos secundarios para revalorizar y eliminar materia orgánica presente en efluentes de la industria celulosa kraft y papel.
- Conocer la eficiencia de sistemas de tratamientos terciarios en la eliminación de materia orgánica presente en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.
- Evaluar la eliminación de toxicidad presente en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.
- Conocer el destino final de la toxicidad posterior a los tratamientos implementados.

## CAPITULO III

# COMPARACION DE LA INFLUENCIA DE CARGA ORGANICA Y RELACION DE NUTRIENTES EN UN SISTEMA DE BIOMASA ADHERIDA DURANTE EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA DE CELULOSA KRAFT Y PAPEL

**Jarpa, M.,** Villamar, C. A., Aguayo, P. Martínez, M. and Vidal, G. (2014). Comparación de la influencia de carga orgánica y relación de nutrientes en un sistema de biomasa adherida durante el tratamiento de efluentes de la industria de celulosa kraft y papel. *Water Science and Technology (In redaction)*.

## **Comparación de la influencia de carga orgánica y relación de nutrientes en un sistema de biomasa adherida durante el tratamiento de efluentes de la industria de celulosa kraft y papelera**

Jarpa, M<sup>1</sup>., Villamar, C.A<sup>1</sup>., Aguayo, P<sup>2</sup>., Martínez, M. and Vidal, G.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental. Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología Ambiental y Bioremediación, Facultad de Ciencias. Biológicas. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

Autor de correspondencia: glvidal@udec.cl

### **RESUMEN**

Efluentes de la industria de celulosa kraft e industria papelera fueron tratados mediante un sistema MBBR en dos Fases (Fase I: Efluente celulosa kraft; Fase II: Efluente industria papelera), para evaluar el efecto de la VCO (Velocidad de Carga Orgánica) y relación de nutrientes (DBO<sub>5</sub>: N: P) en la eficiencia de eliminación de materia orgánica. En la Fase I, se aplicaron VCO entre 0,09 – 0,25 Kg DBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d con una relación de nutrientes de 100:3:1, además de VCO entre 0,44 – 0,91 Kg DBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d con una relación de nutrientes de 100:1:1. En la Fase II, se aplicaron VCO entre 0,13 – 2,99 DBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d para la relación de nutrientes de 100:5:1 y de 2,99 Kg DBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d para 100:1: 0,3. Las máximas de eficiencias de DBO<sub>5</sub> y DQO fueron entre 94,5 – 99,2 % y 59,1 – 72,5 % con VCO aplicadas entre 0,09 – 0,25 Kg DBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d, en la Fase I. En la Fase II, la máxima eliminación de DBO<sub>5</sub> de 98,7 % se obtuvo a una VCO aplicada de 0,13 Kg DBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d y bajo una relación de nutrientes de 100:5: 1, sin embargo al disminuir dicha relación a 100: 1: 0,3, las eficiencias disminuyeron entre 83,9 – 87,2 % DBO<sub>5</sub> y entre 58,1 – 64,9 % DQO. Además se obtuvieron valores de velocidad específica de consumo de materia orgánica (R<sub>DBO5</sub>) entre 0,07 –

0,59 g DBO<sub>5</sub> elim/g SSV d y 0,16 – 0,19 g DBO<sub>5</sub> elim/g SSV d para la Fase I y Fase II, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que tanto un aumento de VCO como una disminución de la relación de nutrientes afectan las eficiencias de eliminación de materia orgánica.

**Palabras Clave:** Efluentes de la industria de celulosa kraft y papel, MBBR, VCO, relación de nutrientes.

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria forestal en Chile ha experimentado un desarrollo acelerado con producciones aproximadas de 2,9 mill ton celulosa kraft/ año y 500 mil ton papel/ año, para la industria de celulosa kraft e industria de papel, respectivamente. El tratamiento de sus efluentes consta de un tratamiento primario con eficacias de eliminación de sólidos suspendidos entre 80,0 – 90,0 % (Thompson *et al.*, 2001) y un tratamiento secundario que es realizado en sistemas de tratamientos de tipo convencional, principalmente lodos activados con eliminaciones de materia orgánica, entre 73,5 – 99,2 % para DBO<sub>5</sub> y 50,0 – 92,4 % para DQO, operando usualmente con velocidades de carga orgánica (VCO) entre 0,07 – 0,021 Kg DBO<sub>5</sub>/ Kg SSV · d y tiempos de retención hidráulico (TRH) entre 3,1 – 54,2 h (Thompson *et al.*, 2001; Belmonte *et al.*, 2006; Kostamo *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2009). En la actualidad, los sistemas de biomasa adherida como biorreactores de biopelícula de lecho móvil MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor), debido a sus ventajas como estabilidad ante cambios operativos, obtención de altas concentraciones de biomasa, operar a altas cargas orgánicas entre 0,07 a 2,9 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup>·d y TRH entre 1,7 – 85 h (Chamorro *et al.*, 2010, Jarpa *et al.*, 2012), han sido satisfactoriamente utilizados para el tratamiento de estos efluentes obteniendo eficacias entre 85,0 – 99,0 % para DBO<sub>5</sub> y 24,0 – 82,0 % DQO (Odegaard, 2000; Villamar *et al.*, 2009; Pozo *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de las altas eficiencias en eliminación de materia orgánica, existen pocos estudios que relacionen parámetros de operación tales como VCO, TRH y relaciones de nutrientes DBO<sub>5</sub>: N: P en el

comportamiento de la eficiencia de eliminación de materia orgánica en sistemas MBBR (Sigrun *et al.*, 2002; Rusten *et al.*, 2005; Ødegaard *et al.*, 2006). Uno de los principales inconvenientes en el tratamiento de estos efluentes, es su limitación en concentración de nutrientes específicamente nitrógeno (N) y fósforo (P), por lo cual es necesario su adecuada dosificación y con ello asegurar la actividad bacteriana y por ende garantizar eficientes eliminaciones en materia orgánica (Slade *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2011). Mientras que en caso del parámetro de VCO, el cual relaciona la cantidad de materia orgánica por unidad de reactor y unidad de tiempo, este es dependiente directamente de la concentración del sustrato y del TRH (Jing *et al.*, 2011).

Por lo antes mencionado el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de parámetros operacionales como VCO y relación de nutrientes DBO<sub>5</sub>: N: P en la eficiencia de eliminación de materia orgánica en efluentes de la industria celulosa kraft y papel tratados por un sistema MBBR.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Agua residual

**Efluente de celulosa kraft:** El efluente fue obtenido después de la descarga del sistema de tratamiento primario de una industria de celulosa kraft local que utiliza como materia prima *Eucalyptus globulus* (Fase I).

**Efluente de la industria de papel:** El efluente fue obtenido después de la descarga del sistema de tratamiento primario de una industria de papel con proceso PGW (Pressurized Ground Wood) que como materia prima *Pinus radiata* (Fase II).

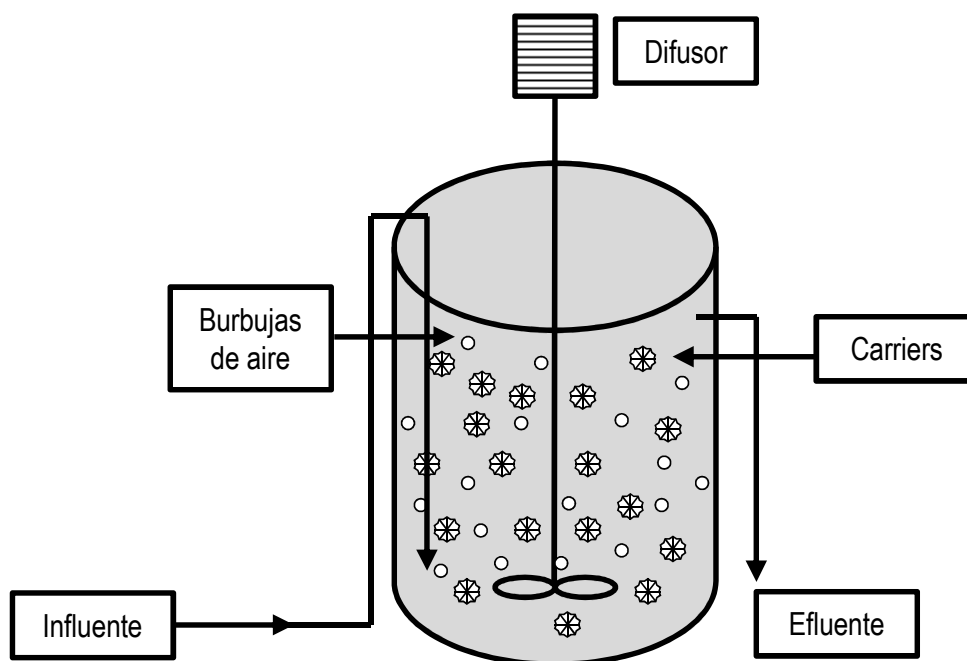
Posteriormente ambos efluentes fueron almacenados en oscuridad a  $4 \pm 1$  °C.

### 2.2 MBBR

Se implementó un MBBR de 0,85 L (Figura 1) con 200 soportes de polietileno tipo AMB (Assisting Moving Bed) con un área de superficie específica de 850 m<sup>2</sup>/ m<sup>3</sup>. En la Fase I, fue operado para el tratamiento de efluentes de la industria de celulosa kraft, con un tiempo de operación de 148 d. En esta fase fue inoculado con un lodo proveniente de un sistema lodos activados de aguas

servidas a una concentración de biomasa 10 g SSV/ L y fue mantenido a  $18,1 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$  y con una concentración de oxígeno disuelto (OD) mayor a 6,0 mg/ L. En la Fase II, fue operado para el tratamiento de efluentes de la industria de papel, con un tiempo de operación de 300 d. En esta fase el sistema fue inoculado en dos etapas: al inicio (5,91 g SSV/ L) y al día de operación 75 d (7,40 g SSV/ L), con lodos provenientes del tratamiento de aguas servidas. El MBBR fue mantenido a  $19,1 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$  y a una concentración entre 6,0 – 7,6 mg/ L de OD.

La estrategia de operación del MBBR, consistió en un incremento de VCO desde 0,09 a 0,91 Kg  $\text{DBO}_5/\text{m}^3\text{ d}$  en la Fase I y desde 0,13 a 2,99 Kg  $\text{DBO}_5/\text{m}^3\text{ d}$  para Fase II y la aplicación de diferentes relaciones de nutrientes de  $\text{DBO}_5:\text{N}:\text{P}$ , correspondiendo a 100: 3: 1 y 100: 1: 1 para Fase I y de 100: 5: 1 y 100: 1: 0,3 para Fase II. En cada fase, se realizó una adecuada relación teórica de nutrientes mediante la adición de N como urea y P como Fosfato de Potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Las eficiencias de eliminación de  $\text{DBO}_5$ , DQO, fueron calculados de acuerdo a la ecuación 1:



**Figura 1.** Sistema MBBR implementado para el tratamiento de efluentes de la industria de celulosa kraft e industria papelera.

$$E(\%) = \frac{Q_i \cdot C_i - Q_o \cdot C_o}{Q_i \cdot C_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde E (%) es el porcentaje de eliminación; Q es el caudal (L/ d); C el parámetro de concentración (mg/ L); subíndice “i” y “o” corresponde a la entrada o salida del efluente, respectivamente.

### 2.3 Métodos analíticos

DQO, DBO<sub>5</sub>, Sólidos Suspendidos Totales (SST), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), Índice Volumétrico del Lodo (IVL), Nitrógeno Total (NT), Fósforo Total (PT) y P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, fueron determinados de acuerdo al Standard Methods (APHA-AWWA-WPCF 1998). Los compuestos fenólicos totales fueron determinados por espectrofotómetro (Model Spectronic Unicam UV-visible Series Genesys TM10) a longitud de onda de 215 nm (UV 215) (cubetas de cuarzo 1 x 1) y el color fue determinado por espectrofotómetro a 440 nm (Chamorro *et al.*, 2005) mientras que el pH se determinó con electrodo (Model inoLab ® Level 1/pH). Previo a la determinación de parámetros físico-químicos, las muestras de agua residual obtenidas de los MBBR fueron filtradas a través de filtros de tamaño de poro de 0,45 µm.

### 2.4 Análisis y actividad microbiológica

La actividad de la biomasa bacteriana se realizó mediante la técnica de respirometría utilizando un sistema de monitorización de oxígeno biológico (BOM, Modelo YSI 5300) de acuerdo a Pozo *et al.*, 2012. Los recuentos totales de biomasa suspendida y adherida utilizando recuento por microscopia de fluorescencia con tinción DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol), cuyo tratamiento de las muestras se realizó de acuerdo a Hobbie *et al.* (1977).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 1 muestra la caracterización física-química de los efluentes crudos previos al tratamiento con MBBR utilizados en este estudio. En la Fase I, se registraron valores de pH entre 7,10 – 7,20, materia orgánica medida como DQO y DBO<sub>5</sub> en concentraciones de 467,90 mg/ L y 159,01 mg/ L, respectivamente. En el caso de la Fase II, el pH registró un rango entre 6,33 – 7,67, concentraciones de DQO de 839,01 mg/ L y de DBO<sub>5</sub> de 441,03 mg/ L. Además ambos efluentes, poseen nutrientes correspondiendo para la Fase I valores promedios de 3,50 mg NT/ L y 0,08 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - P/ L y de 0,53 mg NT/ L y 1,01 mg PT/ L para Fase II y con relaciones de nutrientes de DBO<sub>5</sub>: N: P de 100: 1: 0,01 y 100: 0,1: 0,2. Por lo antes señalados, es necesario una adecuada dosificación de nutrientes a estos efluentes y así asegurar los requerimientos crecimiento bacteriano y por ende una adecuada eliminación de materia orgánica (Slade et al., 2004; Lewis et al., 2011). Por lo antes mencionado se ha indicado en estudios previos que relaciones de DBO<sub>5</sub>: N: P = 100: 5: 1 son óptimas para el crecimiento bacteriano, sin embargo a relaciones de 100: 5: 0,3 es posible alcanzar eliminaciones superiores al 90 % de DBO<sub>5</sub> (Diez et al., 2002; Villamar et al., 2009).

Adicionalmente, la Tabla 2 muestra el comportamiento de los compuestos aromáticos antes y después del MBBR, demostrando que ambas fases existe un mínimo efecto sobre la eliminación de compuestos específicos tales como lignina, compuestos fenólicos totales y eliminación de color. En la Fase I, se registra un incremento de color/ DQO y de las relaciones de UV<sub>280</sub>/ DQO, UV<sub>272</sub>/ DQO, UV<sub>254</sub>/ DQO, UV<sub>215</sub>/ DQO en las VCO estudiadas, sin embargo a medida que incrementa la VCO y disminuye DBO<sub>5</sub>: N: P, las relaciones van en disminución. EL mismo incremento de las relaciones desde el influente al efluente se obtuvo en la Fase II, no obstante, no existe la tendencia de disminución frente a un aumento de VCO y disminución de DBO<sub>5</sub>: N: P. Los valores obtenidos pueden ser explicados por las respectivas eficiencias obtenidas en eliminación de materia orgánica expresada como DB<sub>5</sub> y DQO para cada Fase (datos mostrados posteriormente). Además estos incrementos podrían explicarse por la polimerización de compuestos fenólicos de bajo peso molecular generados por los residuos de la lignina durante el tratamiento biológico de estos efluentes, otorgándoles color (Vidal et al., 2001; Milestone et al., 2004; Vidal et al., 2007; Wang et al., 2011). La lignina es un polímero caracterizado por la

complejidad de su estructura química no definida que contiene diversos grupos cromóforos, además posee un alto peso molecular y un gran número de enlaces de tipo enlaces éter y enlaces C-C, características que la hacen estable ataque enzimático de microorganismos (Konduru *et al.* 2001; Leiviskä *et al.*, 2009; Area *et al.*, 2010). Los resultados en este estudio, coinciden con investigaciones previas en lagunas aireadas y MBBR, en los cuales se obtuvieron incrementos entre 0,10 – 0,11 para color/ DQO, 0,11 – 0,28 UV<sub>280</sub>/ DQO, 0,27 – 0,31 UV<sub>272</sub>/ DQO y 0,13 – 0,35 UV<sub>254</sub>/ DQO, donde además por ultrafiltración determinaron que las fracciones de peso molecular < 1.000 Da y de 1.000 – 10.000 Da la DQO es inferior al 20 %, y para la fracción > 10.000 Da la DQO fue del 60 % (Chamorro *et al.*, 2005; Villamar *et al.*, 2009).

**Tabla 1.** Caracterización físico-química efluentes de la industria de celulosa kraft y efluente de la industria papelera.

Parámetro	Unidad	Fase I		Fase II	
		Rango	Promedio <sup>a</sup>	Rango	Promedio <sup>a</sup>
pH		7,10 – 7,20	7,15 ± 0,05	6,33 – 7,67	7,00 ± 0,94
DQO	mg/ L	445,50 – 491,40	467,90 ± 33,20	825,21 – 857,40	839,00 ± 12,80
DBO <sub>5</sub>	mg/ L	140,01 – 168,02	159,01 ± 12,70	405,02 – 484,11	441,03 ± 26,55
Nitrógeno Total	mg/ L	1,52 – 5,70	3,50 ± 3,20	0,50 – 0,60	0,53 ± 0,05
Fósforo Total	mg/ L	N.D.	N.D.	0,80 – 1,41	1,01 ± 0,21
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> – P	mg/ L	0,10 – 1,41	0,08 ± 0,10	N.D.	N.D.

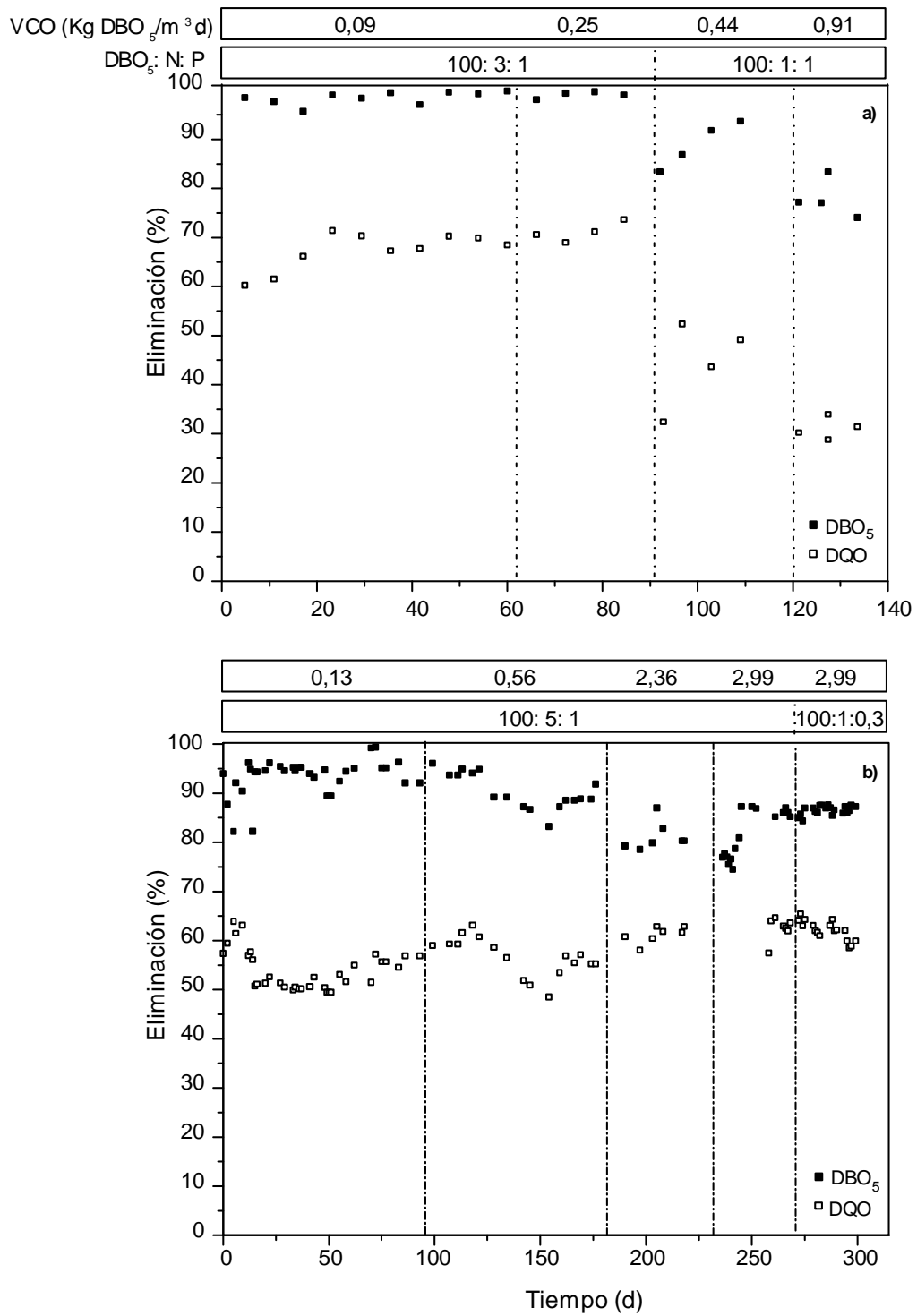
a: Promedio calculado con 6 determinaciones;N.D: No Determinado.

**Tabla 2.** Comportamiento de compuestos aromáticos durante el MBBR.

Periodo	Influente	Efuyente (Fase I)				Influente	Efuyente (Fase II)				
		100:3:1		100:1:1			100:5:1			100:1:0,3	
VCO (kg DBO <sub>5</sub> / m <sup>3</sup> · d)	0,09 – 0,91	0,09	0,25	0,44	0,91	0,13 – 2,99	0,13	0,56	2,36	2,99	2,99
Color/ DQO*	0,19	0,41	0,36	0,37	0,32	0,07	0,16	0,21	0,19	0,18	0,11
UV <sub>280</sub> / DQO*	0,25	0,44	0,41	0,41	0,35	1,15	3,62	3,81	3,66	3,71	3,86
UV <sub>272</sub> / DQO*	0,28	0,49	0,46	0,44	0,39	1,15	3,44	3,95	3,26	3,58	3,72
UV <sub>254</sub> / DQO*	0,34	0,58	0,56	0,53	0,46	0,99	2,74	2,80	2,83	3,10	3,31
UV <sub>215</sub> / DQO	0,27	0,53	0,48	0,47	0,39	0,06	0,25	0,31	0,32	0,31	0,25

\*: valores (x 1000); todos los valores corresponden a promedios

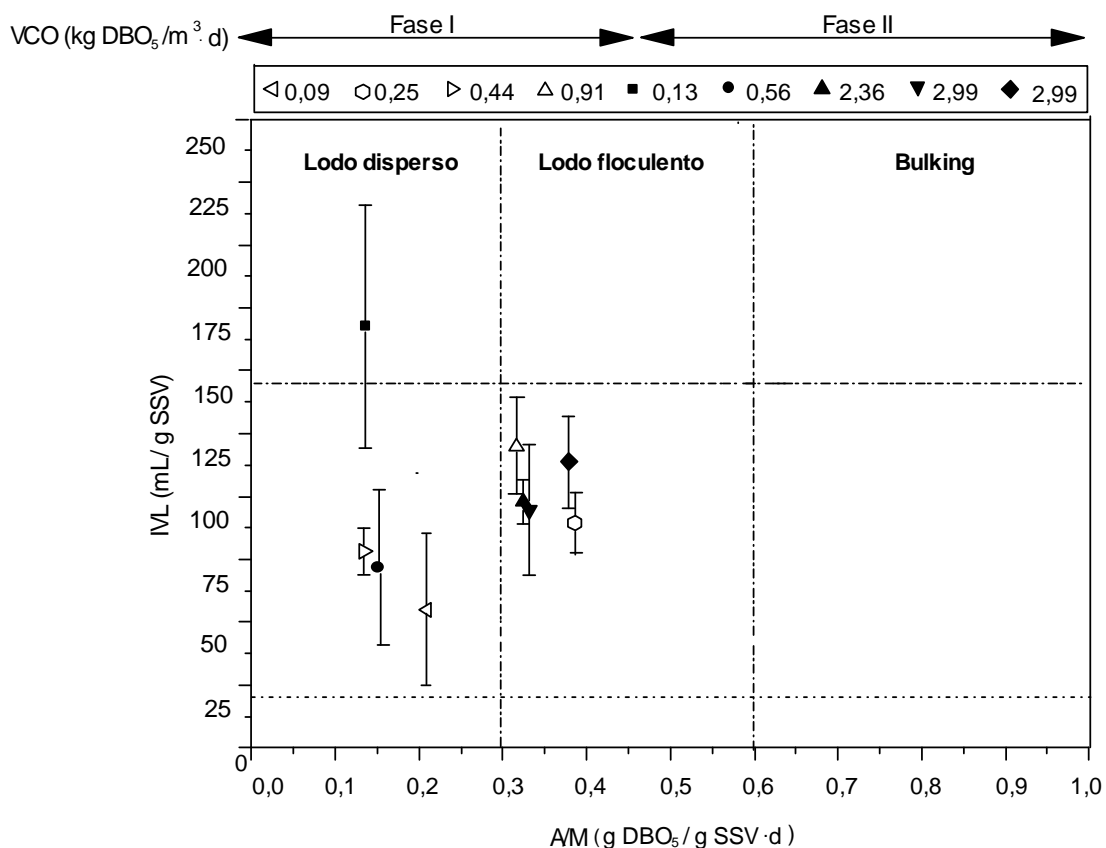
La Figura 2 muestra la influencia de parámetros como VCO y relación de DBO<sub>5</sub>: N: P en la eficiencia de eliminación de materia orgánica determinada como DBO<sub>5</sub> y DQO durante el tiempo de operación del MBBR. La Figura 2a muestra la eficiencia en la Fase I, es posible evidenciar que la VCO y relación de DBO<sub>5</sub>: N: P influyen la eliminación de materia orgánica del efluente. Los porcentajes de eficiencia se encuentran entre 94,5 – 99,2 % para DBO<sub>5</sub> y entre 59,1 – 72,5 % para DQO operando con VCO de 0,09 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y 0,25 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y DBO<sub>5</sub>: N: P = 100: 3: 1. Sin embargo, ante una disminución de relación DBO<sub>5</sub>: N: P a 100: 1: 1 y el incremento de VCO desde 0,44 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d a 0,91 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d, el MBBR presenta una inestabilidad en eficiencias de materia orgánica. Las máximas eficiencias de eliminación de DBO<sub>5</sub> correspondieron al 93,9 % y 83,2 % para 0,44 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y 0,91 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d, respectivamente e inferiores al 50 % para DQO en ambas VCO. La disminución en eficiencia podría atribuirse a la deficiencia de nutrientes como N y P, ya que los microorganismos requieren de una dosificación adecuada para la eliminación de materia orgánica (Slade *et al.*, 2004). Estudios realizados por Diez *et al.* (2002) señalan que desbalance de estos nutrientes puede favorecer el crecimiento de bacterias filamentosas pudiendo ocasionar bulking y propiedades de baja sedimentabilidad del lodo. La Figura 2b, muestra la eficiencia en eliminación de materia orgánica para la Fase II con VCO de 0,13 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y 0,56 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d, y 100: 5: 1. Donde los máximos de eliminación de DBO<sub>5</sub> correspondieron al 98,7 % y al 95,6 %, respectivamente. Sin embargo para las VCO de 2,36 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y 2,99 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d, se observa una disminución de las eficiencias con rangos entre 78,1 – 86,6 % y 74,1 – 86,6 %, respectivamente. Para la relación de 100: 1: 0,3, la máxima eficiencia en eliminación de DBO<sub>5</sub> correspondió a 87,2 % a 2,99 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d. En el caso de eficiencia de eliminación de DQO, esta mantuvo valores estables durante el tiempo de operación del sistema, con eficiencias de eliminación entre 48,1 – 58,1 %, obteniendo la máxima eficiencia de eliminación de DQO para 2,99 kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y bajo la relación 100: 1: 0,3. Diez *et al.* (2002) observaron con DBO<sub>5</sub>: N: P = 100: 5: 0,3 se obtienen altas eficiencias de eliminación de DBO<sub>5</sub> superiores al 90 % en lodos activados, mientras que en sistemas MBBR se han obtenido eficiencias de DBO<sub>5</sub> entre 85,0 – 99,0 % y de hasta el 60 % para DQO con DBO<sub>5</sub>: N: P = 100: 5:1 (Villamar *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2010; Pozo *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Efecto de VCO y DBO<sub>5</sub>: N: P en la eficiencia de eliminación materia orgánica. a) Fase I, b) Fase II.

En sistemas de biomasa suspendida como lodos activados comúnmente se utiliza la relación de IVL y A/M (Alimento/ Microorganismo) por su influencia en la estabilidad del sistema de tratamiento (Ramalho, 1996). Sin embargo, para sistemas con biomasa adherida como los MBBR, la relación A/M no es un parámetro crítico de operación. No obstante, permite concluir que estos sistemas son capaces de presentar estabilidad frente a incrementos de VCO y por lo cual requieren menores TRH para reducir la materia orgánica a niveles eficientes (Javid *et al.*, 2013). Además, autores como Slade *et al.* (2004) y Díez *et al.* (2002) mencionan que para tratamientos de efluentes con microorganismos, es necesario considerar el parámetro de relación DBO<sub>5</sub>: N: P debido a que un desbalance de alguno de estos nutrientes afecta las eficiencias de materia orgánica y además favorece el crecimiento de bacterias filamentosas, ocasionando bulking y propiedades de baja sedimentabilidad del lodo. Por lo antes mencionado, la Figura 3 describe el efecto de la VCO y la relación de DBO<sub>5</sub>: N: P en la evolución de la biomasa suspendida y adherida durante la operación del sistema MBBR por medio de la relación de IVL y A/M. Durante la Fase I, el sistema MBBR mostró buena sedimentabilidad del lodo para 0,25 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y 0,91 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d con relaciones de A/M entre 0,3 – 0,6 g DBO<sub>5</sub>/ g SSV · d y valores promedio entre 98,9 y 126,1 mL/ g SSV. Mientras que para 0,09 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y 0,44 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d, el lodo correspondió a lodo disperso. Ramalho (1996), menciona que lodos con óptimas condiciones de sedimentabilidad se obtienen con valores entre 35 – 135 mL/ g SSV para IVL y entre 0,3 – 0,6 g DBO<sub>5</sub>/g SSV·d para A/M. Estudios previos en sistemas MBBR con efluentes de celulosa kraft, registraron lodos floculentos operando con incrementos de VCO de 0,14 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d, 0,25 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y 1,09 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y relaciones de nutrientes de 100:5:1, 100:3:1 y 100:1:1 (Villamar *et al.*, 2009). Para el caso de la Fase II, con VCO inferiores a 0,56 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d indica lodo disperso con valores promedios entre 71,7 – 167,5 mL/ g VSS y 0,13 – 0,14 g DBO<sub>5</sub>/ g SSV · d, para IVL y A/M, respectivamente. Sin embargo, a medida que incrementa la VCO desde 2,36 a 2,99 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d se demuestra una estabilidad del sistema en cuanto a condiciones de lodo floculento con valores promedios entre 94,6 – 113,8 mL/ g SSV y 0,32 – 0,37 g DBO<sub>5</sub>/ g SSV · d. Los resultados obtenidos en este estudio, demuestran que el MBBR no registró estabilidad de la biomasa frente a incrementos de VCO y relación de DBO<sub>5</sub>: N: P, como en el caso de la Fase I, sin embargo las eficiencias en eliminación de materia orgánica en ambas fases fueron altas (Figura 2). Javid *et al.* (2013) mencionan que los MBBR frente a

incrementos de VCO, la eficiencia del tratamiento tiene poca relación con la sedimentabilidad del lodo.



**Figure 3.** Efecto de VCO y DBO<sub>5</sub>: N: P en la características del lodo en los sistemas MBBR.

Finalmente la Tabla 3, resume el rendimiento operacional del MBBR para la Fase I y Fase II. Durante el tiempo de operación del MBBR se determinaron los índices de biodegradabilidad (DBO<sub>5</sub>/ DQO), donde al ingreso de la Fase I este índice osciló entre 0,33 – 0,40. Mientras que en la Fase II, correspondió entre 0,39 – 0,74. Estos resultados demuestran que el efluente crudo previo al tratamiento con MBBR de la Fase II, es mayormente biodegradable en comparación al efluente de la Fase I (Chamorro *et al.*, 2005, Villamar *et al.*, 2009). Posterior al tratamiento, se obtuvieron disminuciones de DBO<sub>5</sub>/ DQO en la fase I con valores entre 0,01 – 0,12, concluyendo

la persistencia de materia orgánica recalcitrante. Mientras que en la Fase II los índices DBO<sub>5</sub>/DQO correspondieron entre 0,31 – 0,80. Autores como Rodrigues *et al.* (2008) y Lucas *et al.* (2012) mencionan que índices de DBO<sub>5</sub>/DQO mayores que 0,3 indican presencia de compuestos biodegradables, mientras que índices DBO<sub>5</sub>/DQO menores que 0,3 indican presencia de una fracción de materia orgánica recalcitrante. Además, se evaluó la velocidad específica de consumo de materia orgánica y la velocidad específica de consumo de oxígeno, con valores de velocidad específica de consumo de materia orgánica ( $R_{\text{DBO}_5}$ ) entre 0,07 – 0,59 g DBO<sub>5</sub> elim/ g SSV · d y 0,16 – 0,19 g DBO<sub>5</sub> elim/ g SSV · d, para la Fase I y Fase II, respectivamente. Mientras que la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $r_{\text{O}_2}$ ) correspondió a 0,08 – 0,13 g O<sub>2</sub> cons/ g SSV · d y 0,13 – 0,17 g O<sub>2</sub> cons/ g SSV · d, para Fase I y Fase II, respectivamente. En ambas fases las máximas  $r_{\text{O}_2}$  coinciden con las máximas eficiencias de eliminación de DBO<sub>5</sub> y en la Fase I el aumento de  $R_{\text{DBO}_5}$  sobre  $r_{\text{O}_2}$  podría ser atribuido a la formación de una mayor biopelícula, a pesar de la disminución de nutrientes desde 100: 3: 1 a 100: 1: 1, con un recuento total de bacterias/mL para Fase I fue entre  $1,5 \times 10^5$  –  $6,6 \times 10^5$  y un mayor número de estas para la Fase II entre  $1,4 \times 10^7$  –  $2,9 \times 10^7$ . Pozo *et al.* (2011), determinaron en tratamientos de la industria de celulosa kraft valores de  $r_{\text{O}_2}$  entre 0,04 – 0,12 mg O<sub>2</sub> cons/ g SSV · min estudiando dos relaciones de DBO<sub>5</sub>: N: P de 100:5: 1 y 100:1: 0,2.

**Tabla 3.** Rendimiento operacional de los sistemas MBBR implementados.

Parámetro	Unidad	Fase I				Fase II				
		0,09	0,25	0,44	0,91	0,13	0,56	2,36	2,99	2,99
VCO	Kg DBO <sub>5</sub> /m <sup>3</sup> · d									
DBO <sub>5</sub> : N: P		100:3:1	100:3:1	100:1:1	100:1:1	100:5:1	100:5:1	100:5:1	100:5:1	100:1:0,3
Periodo	d	1 – 66	69 – 92	99 – 120	127 – 148	1 – 99	100 – 179	180 – 225	226 – 270	271 – 300
TRH	h	40,01 ± 0,03	17,02 ± 0,02	8,01 ± 0,01	4,02 ± 0,01	47,80 ± 0,77	12,20 ± 0,20	6,06 ± 0,05	3,06 ± 0,05	3,08 ± 0,01
DBO <sub>5</sub> /DQO <sub>i</sub>		0,33 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,65 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,64 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,02
DBO <sub>5</sub> /DQO <sub>e</sub>		0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,45 ± 0,04	0,45 ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,80 ± 0,04
R <sub>DBO5</sub>	g DBO <sub>5</sub> elim/g SSV · d	0,07 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,29 ± 0,04	0,59 ± 0,16	0,19 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,01
r <sub>O2</sub>	g O <sub>2</sub> cons/g SSV · d	0,08 ± 0,00	N.D.	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,00
Recuento total	bact/ mL	1,5 x 10 <sup>5</sup>	N.D.	5,9 x 10 <sup>5</sup>	6,6 x 10 <sup>5</sup>	2,9 x 10 <sup>7</sup>	3,3 x 10 <sup>7</sup>	1,4 x 10 <sup>7</sup>	1,5 x 10 <sup>7</sup>	1,6 x 10 <sup>7</sup>

N.D.: No Determinado; i: influente; e: efluente.

#### 4. CONCLUSIONES

Mediante la implementación del MBBR para el tratamiento de efluentes de la industria de celulosa kraft e industria papelera fue posible la obtención de altas eficiencias en eliminación de materia orgánica. Las máximas eficiencias para DBO<sub>5</sub> y DQO en la Fase I fueron entre 94,5 – 99,2 % y 59,1 – 72,5 % con VCO de 0,09 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y 0,25 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d a DBO<sub>5</sub>: N: P = 100:3: 1. Mientras que en la Fase II, las máximas eliminaciones de DBO<sub>5</sub> fueron de un 98,7 % y 95,6 % para 0,13 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d y 0,56 Kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup> ·d, respectivamente, y ambas a DBO<sub>5</sub>: N: P = 100:5: 1. No obstante, en ambas fases al disminuir las relaciones de DBO<sub>5</sub>: N: P, disminuyeron las eficiencias del MBBR. Por lo antes mencionado se concluye que disminuciones de DBO<sub>5</sub>: N: P influirían mayormente en las eficiencias del MBBR debido a que estos sistemas son capaces de soportar incrementos de VCO sin influenciar finalmente en sus eficiencias de eliminación de materia orgánica.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto Fondecyt 1070509, Fondecyt 1120664, Beca Conicyt A.T. 24100082, Beca ALFA N° II-0311-FA-FCD-FI-FC.

#### REFERENCIAS

- APHA-AWWA-WPCF. 1998. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> Ed. Washington DC, 1325 pp.
- Area, M., Carvalho, M., Ferreira, P., Felissia, F., Barboza, O. & Bengoechea. 2010. The influence of pulping and washing conditions on the properties of Eucalyptus grandis unbleached kraft pulps treated with chelants. *Bioresources Technology*, 101(6): 1877 – 1084.
- Belmonte, M., Xavier, C., Decap, J., Martínez, M., Sierra-Álvarez, R. & Vidal, G. 2006. Improved aerobic biodegradation of abiético acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation. *Journal of Hazardous Materials*, 135: 256 – 263.
- Chamorro, S., Xavier, C. & Vidal, G. 2005 Behavior of aromatic compounds contained in kraft mill effluents treated by aerated lagoon. *Biotechnology Progress*, 21: 1567 – 1571.

- Chamorro, S., Pozo, G., Jarpa, M., Hernández, V., Becerra, J. & Vidal, G. 2010. Monitoring endocrine activity in kraft mill effluent treated by aerobic moving bed bioreactor syst em. *Water Science & technology*, 62(1): 154 – 161.
- Diez, M. C., Castillo, G., Aguilar, L., Vidal, G., & Mora, M.L. 2002. Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus radiata* kraft mill wastewater. *Bioresource Technology*, 83:131 – 138.
- Konduru, R., Liss, S. & Allen, D. 2001. Recalcitrant organics emerging from biological treatment of kraft mill effluents. *Water Quality Research Journal of Canada*, 36: 737 – 757.
- Leiviskä, T., Rämö, J., Nurmesniemi, H., Poykio, R. & Kuokkanen. 2009. Size fractionation of wood extractives, lignin and trace elements in pulp and paper mill wastewater before and after biological treatment. *Water Research*, 43: 3199 – 3206.
- Lewis, R., Van-Leeuwen, J., Smernik, R., Chow, C., Everson, A., Nothrop, S. & Beecham. 2011. Changes in the organic character of post-coagulated *Pinus radiata* sulfite pulp mill wastewater under aerated stabilization basin treatment—A laboratory scale study. *Chemical Engineering Journal*, 175: 160 – 168.
- Lucas, M., Peres, J., Amor, C., Prieto-Rodríguez, L., Maldonado, M. & Malato, S., 2012. Tertiary treatment of pulpmill wastewater by solar photo-Fenton. *Journal of Hazardous Materials*, 225–226, 173–181.
- Milestone, C., Fulthorpe, R. & Tuthridge, R. 2004. The formation of color during biological treatment of pulp and paper process. *Water Science & Technology*, 50 (3): 87 – 94.
- Odegaard, H. 2000. Advanced compact wastewater treatment based on coagulation and moving bed biofilm processes. *Water Science and Technology*, 42 (12): 33 – 48.
- Odegaard, H. 2006. Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm process. *Water Science & technology*, 53(9): 17 – 33.
- Pozo, G., Villamar, A., Martínez, M. & Vidal, G. 2012. Effect of organic load and nutrient ratio on the operation stability of the moving bed birreactor for kraft mill wastewater treatment and the incidente of polyhydroxyalnoate biosynthesis. *Water Science & technology*, 66(2): 370 – 376.

- Hobbie, J. E., Daley, R. J. & Jasper, S. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 1225 – 1228.
- Jarpa, M., Pozo, G., Baeza, R., Martínez, M. & Vidal, G. 2012. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47: 1 – 8.
- Javid, A., Hassani, A., Ghanbari, B. & Yaghmaeian, K. 2013. Feasibility of utilizing Moving Bed Biofilm Reactor and Retrofit municipal wastewater treatment plants. *International Journal of Environmental Research*, 7 (4): 963 – 972.
- Jing, Y., Fong, M. & Lim, Ch. 2011. Optimization on thermophilic aerobic treatment of anaerobically digested palm oil mill effluent (POME). *Biochemical Engineering Journal*, 55: 193 – 198.
- Kostamo, A., Holmbom, B. & Kukkonen, J.V. 2004. Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mills and mechanical pulp mills. *Water Research*, 38: 972 – 982.
- Ramalho, R. 1996. Tratamiento de Aguas Residuales. Barcelona, Editorial Reverté. S.A.
- Rodrigues, A., Boroski, M., Shimada, N., Garcia, J., Nozaki, J., Hioka, N., 2008. Treatment of pulp and paper mill wastewater by coagulation-flocculation followed by heterogeneous photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 194, 1–10.
- Rusten, B. 2006 Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacultural engineering*, 34: 322 – 331.
- Slade, A., Ellis, R., vanden Heuvel, M. & Stuthridge, T. 2004. Nutrient minimisation in the pulp and paper industry: an overview. *Water Science & technology*. 50 (3), 111 – 122.
- Sigrun, J.J., Rintala, A.R. & Ødegaard, H. 2002. Aerobic moving bed biofilm reactor treating thermomechanical pulping whitewater under thermophilic conditions. *Water Research*, 36, 1067 – 1075.
- Thompson, G., Swain, J. & Forster, M. 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresourse Technology*, 77: 275 – 286.
- Vidal, G., Navia, R., Levet, L., Mora, M. L. & Diez, M. 2001. kraft mill anaerobic effluent color enhancement by a fixed-bed adsorption system. *Biotechnology Letters*, 23: 861 – 865.

- Vidal, G., Belmonte, M., Calderón, M. & Chamorro, S. 2007. Significativos avances ambientales registra en Chile la industria de celulosa kraft blanqueada. *Induambiente*, 15 (87): 6 – 30.
- Villamar, C.A., Jarpa, M., Decap, J. & Vidal, G. 2009. Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus*. *Water Science & Technology*, 59 (3): 507 – 514.
- Wang, J., Chen, Y., Wang, Y., Yuan, S. & Yu, H. 2011. Optimization of the coagulation-flocculation process for pulp mill wastewater treatment treatment using a combination of uniform design and response surface methodology. *Water Research*, 45: 5633 – 5640.
- Xavier, C., Mosquera-Corral, A., Becerra, J., Hernández, V. & Vidal, G. 2009. Activated sludge versus aerated lagoon treatment of kraft mill effluents Containing  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 44: 327 – 335.

## CAPITULO IV

# COMPARISON OF CHRONIC TOXICITY REMOVAL CONTAINED IN KRAFT MILL EFFLUENTS BY OPTIMIZATION OF CHEMICAL PRECIPITATION, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> AND FENTON PROCESS

**Jarpa, M.**, Rozas, O., Salazar, CL., Baeza, C., Campos, J.L., Mansilla, H.D. and Vidal, G. (2014). Comparison of chronic toxicity removal contained in Kraft mill effluents treatment by optimization of chemical precipitation treatment, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fenton process. *Chemosphere*, (In redaction).

## Comparison of chronic toxicity removal contained in Kraft mill effluents by optimization of chemical precipitation, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fenton process

Jarpa, M<sup>a</sup>., Rozas, O<sup>b</sup>., Salazar, CL<sup>c</sup>., Baeza, C<sup>a</sup>., Campos, J.L<sup>d</sup>., Mansilla, H.D<sup>b</sup>. and Vidal, G<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Engineering and Environmental Biotechnology Group, Environmental Science Center EULA-Chile. University of Concepción. Concepción, Chile.

<sup>b</sup> Faculty of Chemical Sciences, University of Concepción. Concepción, Chile.

<sup>c</sup> Faculty of Engineering, University of Concepción. Concepción, Chile.

<sup>d</sup> Dept. Chemical Engineering, School of Engineering. University of Santiago de Compostela, Spain.

\*Corresponding author: glvidal@udec.cl

### Abstract

Kraft mill effluents (secondary treatment outlet effluent: STOE) was treated by chemical precipitation, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fenton Process (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>) in lab-scale reactors for Chemical Oxygen Demand (COD) and chronic toxicity removal. Effects of variables such as Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, Fe(II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and ranges of pH were evaluated depending on the treatment with a circumscribed central composite (CCC) model and a response surface methodology. The optimal condition for chemical precipitation was 984.2 mg Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> and pH 5.2, while for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was 51.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to pH 5.1 and 5.5 mM Fe (II): 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and pH 2.8 for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>. Under such optimized conditions, the COD removal were of 84.7 %, 80.0 % and 93.6 % with reaction times of 57 min, 75 min and 10 min for chemical precipitation, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>, respectively. In this study chronic toxicity was recorded in STOE and sludge formed during the chemical precipitation with maximum reductions in percentages of Allometric Growth Rate (AGR) of 11.5 for STOE without dilution (100 %, p <0.05). While for chemical precipitation sludge, the maximum reductions of AGR corresponded to 3.4 % for dilution of 75%. Through the results we conclude that the treatments implemented are effective in chronic toxicity removal in the effluents generated.

*Keywords:* Kraft mill effluents, Chemical precipitation, AOPs, COD, chronic toxicity.

## 1. Introduction

Kraft mill effluents requires a primary treatment for suspended solids removal (80 to 90 %) and secondary treatment for removing organic matter measured as BOD<sub>5</sub>, (Biological Oxygen Demand) and COD (Chemical Oxygen Demand). Secondary treatments are able to remove BOD<sub>5</sub> and COD a range of 73 – 99 % and 30 – 50 %, respectively (Chamorro *et al.*, 2005; Villamar *et al.*, 2009; Jarpa *et al.*, 2012). However, some refractory compounds have been identified after secondary treatments (aerated lagoon, activated sludge). For example, phytosterols has been found in concentrations ranging between 0.01 – 3.4 mg L<sup>-1</sup> (Chamorro *et al.*, 2010). Xavier *et al.* (2009) have reported removal of phytosterols between 41 – 99 % after activated sludge, nevertheless the removal mechanism is not well understood. Phytosterols can be adsorbed on the sludge material due to hydrophobic affinity ( $\log K_{ow} > 6$ ) and has been identified a potential source of chronic toxicity expressed as estrogenic activity in exposed organisms (López *et al.*, 2011). The estrogenic effects of these effluents have been evaluated in invertebrates as *Daphnia magna*, finding effects on growth, reproduction and development of sex characteristics (Olmstead and Le Blanc, 2000; López *et al.*, 2011). Chamorro *et al.* (2010) have reported removal of estrogenic activity between 80 – 83 % after MBBR systems (Moving Bed Biofilm Reactor), respectively.

In order to remove potential sources of chronic toxicity it is necessary to evaluate treatments in a tertiary stage. Currently, chemical precipitation treatment based in the addition of coagulants is used in the industry mainly for color removal, accounting for 90 – 96 % color removal. However after chemical precipitation there are several refractory compound remaining in solution (De los Santos *et al.*, 2009). Advanced oxidation processes (AOPs) could be utilized as an alternative of tertiary treatment (Merayo *et al.*, 2013). AOPs during the last decade have been used as efficient methods for transforming pollutants, are based on the “in situ” generation of hydroxyl radicals (OH<sup>•</sup>) for mineralization of organic and recalcitrant compounds due to its high reduction potential of 2.8 V (Gültekin and Ince, 2007; Jamil *et al.*, 2011). Previous studies in kraft mill effluents with AOPs have been focused mainly in color removal 82 – 85 % and organic matter removal, with COD removal above 60% and between 20 – 94% for COT (Carbon Organic Total) using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton Process (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>, O<sub>3</sub>, UV/TiO<sub>2</sub> (Fontanier *et al.*, 2006; Catalkaya and Kargi, 2007; Eskelinen *et al.*, 2010). Despite the high effectiveness of AOPs have been few researches have in chronic toxicity removal following these technologies. Studies have found effects on reproduction of

*Ceriodaphnia dubia* with decreases from 19.2 to 6 UTC (UTC: concentration that could inhibit 25 % of reproduction).

Therefore H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could be an alternative for tertiary treatment in kraft mill effluents removing potential sources of chronic toxicity. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> advantage for their low cost in reagents and small electrical energy demand and OH<sup>•</sup> are produced by interaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with ferrous salts (equation 1). Additionally Fe (III) can react with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the so called Fenton-like (equation 2–4) regenerating Fe (II) and supporting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>. Furthermore, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (equation 5) could be a promising alternative for the treatment of these effluents because the generation OH<sup>•</sup> is accelerated by UV radiation (Pérez *et al.*, 2007; Catalkaya and Kargi, 2007).



Consequently, the goal of this work was to optimize the reaction conditions of chemical precipitation treatment, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> for removing COD and chronic toxicity contained in kraft mill effluents. Optimization was achieved by a circumscribed central composite (CCC).

## 2. Experimental

### 2.1. Effluent

Kraft mill effluent used in this study was obtained after secondary treatment (secondary treatment outlet effluent: STOE) of a local kraft mill industry that processes *Pinus radiata* with an ECF (Elementary Chlorine Free) bleaching system. Effluent was stored in dark at 4°C±1 (Vidal *et al.*, 2001).

## 2.2. Tertiary treatments

**Chemical precipitation:** performed in Jar Test (VELP Scientifica FC4S) of 1 L sample volume using as coagulant  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  at  $20 \pm 1.1^\circ\text{C}$ . The experimental pH ranged from 5.0 – 6.5. The samples were stirred for 4 min at 200 rpm followed by coagulation for 8 min at 45 rpm and flocculation for 13 min at 15 rpm. The samples were allowed to settle for 30 min, subsequently the aqueous phase and solid phase were stored at  $4^\circ\text{C} \pm 1$  for physico-chemical analysis and toxicity test.

**UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ :** a direct irradiation was performed in petri dishes (0.2 L) with 4 x 8W lamps (UVC,  $\lambda$  254 nm). The radiation energy was  $500 \mu\text{W cm}^{-2}$  (measured with a UVX radiometer, Shortwave Meter UVP J – 225), at a distance of 0.2 m from the lamp to the top of the solution at  $25.4 \pm 1.7^\circ\text{C}$ , adding a  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration with constant stirring. The experimental pH ranged from 3.0 – 7.0.

**$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ :** performed in petri dishes (0.2 L) using  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , at temperature of  $19.4 \pm 1.1^\circ\text{C}$  with constant stirring and protected from light. The experimental pH was 2.8.

pH was adjusted with NaOH (1.0 N) or HCl (1.0 N) solutions for each experiment.

## 2.3. Optimization and response surface modeling

A circumscribed central composite (CCC) model (2<sup>2</sup>) was used to optimize reaction conditions for chemical precipitation, UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ , resulting in a polynomial equation and a three-dimensional representation with a response factor (Y) of COD removal. Two variables were studied for each treatment, each at two levels (high and low, or +1 and -1) and the interaction between the variables was assessed. Eleven experiments were performed including three central points (0) to give model statistical consistency and star point (+1.4, -1.4). The variables for chemical precipitation were  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  concentration and pH, UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  were for  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration and pH and  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  were Fe(II) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration. Data analysis and determination of the polynomial response surfaces and optimizations were carried out Mode 7.0™ software. Statistical validity for each treatment was determined by ANOVA with a confidence level of 95 % (Pérez *et al.*, 2007).

## 2.4. Analytical determinations

COD (Chemical Oxygen Demand), BOD<sub>5</sub> (Biological Oxygen Demand), TSS (Volatile Suspended Solids), TN (Total Nitrogen), TP (Total Phosphorus) were measured according to Standard Methods (APHA-AWWA-WPCF 1998). TOC (Total Organic Carbon) was determined by ANOVA kit spectrophotometer. Total phenolic compounds (UV<sub>215</sub>), aromatics compounds (UV<sub>254</sub>), lignin

derivates (UV<sub>272</sub>, UV<sub>280</sub>) and color (VIS<sub>440</sub>) were determined by spectrophotometer Model Spectronic Unicam UV-visible Genesys TM Series 10 (Chamorro et al., 2005). The pH was determined with selective electrode (Model inoLab ® Level1/pH). Samples were membrane filtered through 0.45 µm pore size filters.

## 2.5. Chronic toxicity

Chronic toxicity was determined in Kraft mill effluents before (secondary treatment outlet effluent: STOE) and after tertiary treatments through female *D. Magna* (neonates < 24 h) following standard procedures for chronic toxicity bioassays (USEPA, 1994). Stock cultures and bioassays were maintained at 20.0±1.1°C with 16 h light: 8 h dark photoperiod. The Daphnids were fed three times weekly with unicellular green algae *Selenastrum capricornatum* and supplemented with a suspension baker's yeast, trout chow and alfalfa with an equivalent carbon content of 7.2 mg C L<sup>-1</sup> on Monday and Wednesday, and 10.8 mg C L<sup>-1</sup> on Friday. The ranges of dilution of Kraft mill effluents for chronic toxicity studies were established after acute toxicity testing (data not show) to minimize test organism mortality. Each bioassay of chronic toxicity consist of ten replicates of 70 mL (containing one organism) was established for each dilution, including control. The dilutions used for STOE were 25 %, 50 % and 100 % (diluted with reconstituted water), while for kraft mill effluent after tertiary treatment the dilutions used were 12.5 %, 25 %, 50 % and 75 % (diluted with reconstituted water). Only for the sludge of chemical precipitation were carried out bioassays (USEPA, 1994; Sotero-Santos *et al.*, 2005). Chronic toxicity was measured for reproduction (neonates production) and the variation in the proportion of body length with body width expressed as the percentage of Allometric Growth Rate (% AGR), calculated according to López *et al.* (2011), as show in Equation 6.

$$AGR (\%) = \left[ \left( \frac{\text{Body Length}}{\text{Body Width}} \right) - 1 \right] \cdot 100 \quad (6)$$

Data obtained were processed statistically by checking normality ( $\chi^2$  test) and homogeneity of variances (Bartlett's test). The significance of differences in reproductive parameters and allometric growth was determined by ANOVA followed by Tukey's test, all with TOXSTAT statistical package (USEPA, 1994).

### 3. Results and Discussion

Physicochemical characterization of STOE is shown in Table 1. The pH values ranged from 6.9 to 7.6. The average values for COD, TOC and BOD<sub>5</sub> were 268.9 mg L<sup>-1</sup>, 116.2 mg L<sup>-1</sup> and 30.0 mg L<sup>-1</sup>, respectively, calculated biodegradability index (BOD<sub>5</sub>/COD ratio) is within a low range between 0.09 to 0.13. Previous studies indicate that BOD<sub>5</sub>/COD ratio < 0.3 is indicative of recalcitrant organic matter presence (Rodrigues *et al.* 2008; Lucas *et al.*, 2012). Nitrogen and phosphorus are commonly added in secondary treatment to ensure performance of microorganisms for BOD<sub>5</sub> removal (Slade *et al.*, 2004). STOE used in this study show low nutrient concentrations, corresponding to 0.5 mg L<sup>-1</sup> for TP, while TN concentration is under the detection limit (0.50 mg L<sup>-1</sup>). Finally were determined total phenolic compounds in concentrations between 25.6 to 35.1 mg L<sup>-1</sup>, color of 2.6 (AU), concentration of 0.2 mg TSS L<sup>-1</sup> and lignin derivatives among others, these values recorded in this study are consistent with previous research (Villamar *et al.*, 2009).

**Table 1.** Physicochemical characterization of STOE.

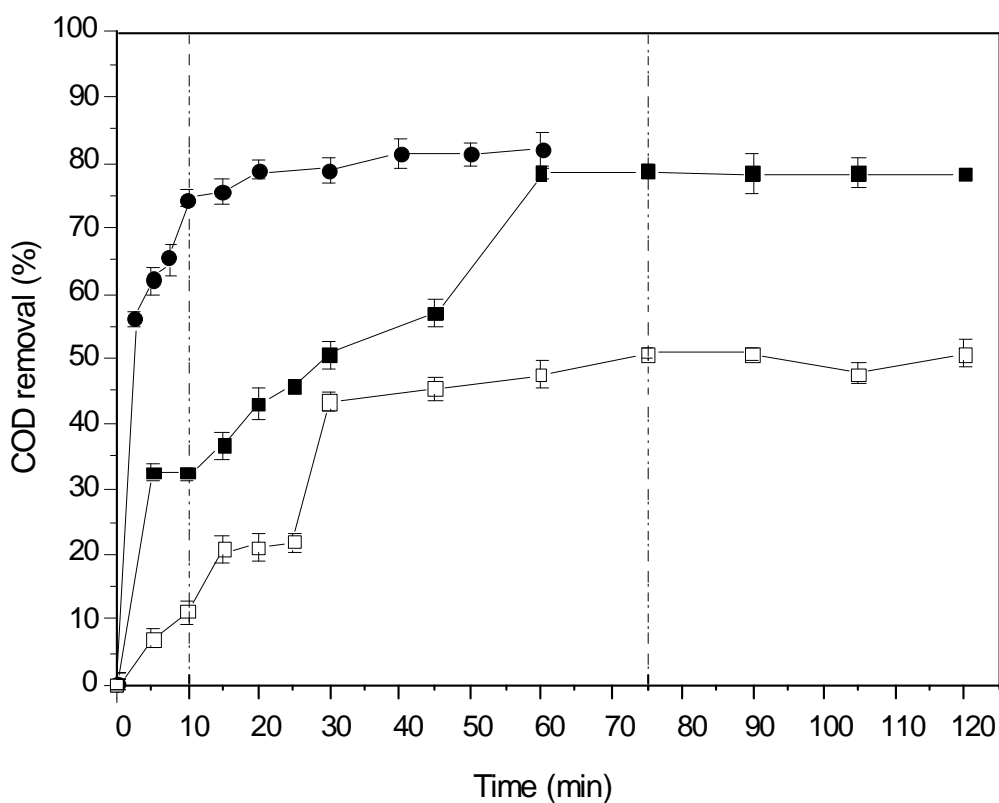
Parameter	Unid	Range	Average
pH		6.9 – 7.6	7.2 ± 0.5
COD	mg L <sup>-1</sup>	267.7 – 270.1	268.9 ± 1.7
BOD <sub>5</sub>	mg L <sup>-1</sup>	25.7 – 34.2	30.0 ± 6.0
TOC	mg L <sup>-1</sup>	112.5 – 120.0	116.2 ± 5.2
Total phenolic compounds (UV <sub>215</sub> )	mg L <sup>-1</sup>	25.6 – 35.1	30.3 ± 6.6
Aromatics compounds (UV <sub>254</sub> )	abs	4.5	4.5 ± 0.0
Lignin derivatives (UV <sub>272</sub> )	abs	2.3 – 2.6	2.4 ± 0.2
Lignin derivatives (UV <sub>280</sub> )	abs	2.1 – 2.3	2.2 ± 0.1
Color (VIS <sub>440</sub> )	abs	2.6	2.6 ± 0.0
Total Nitrogen (TN)	mg L <sup>-1</sup>	LDT	LDT
Total Phosphorus (TP)	mg L <sup>-1</sup>	0.5	0.5 ± 0.0
TSS	mg L <sup>-1</sup>	0.2 – 0.3	0.2 ± 0.0

LDT: Low detection limit (< 0.5)

Kinetics of COD removal for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> were conducted to determine the minimum reaction time needed for maximum COD removal previous to factorial experimental design (Figure 1).

The ranges used in this study for kinetics COD removal were based on previous investigations in kraft mill effluents (Catalkaya and Kargi, 2007; Perez *et al.*, 2007; Catalkaya and Kargi, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008). Kinetics experiment of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were performed at pH 3 and with 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reaching a maximum at 75 min with a COD removal of 50.7 % and 78.7 % for pH 3 and 7, respectively. While kinetics experiment H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> were performed at pH 2.8 at a concentration of 4.2 mM Fe (II) and 42.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1: 10), reaching a maximum at 10 min with COD removal of 74.4 %.

On the other hand, for chemical precipitation operation time of 57 min were done following (Westerhoff *et al.*, 2005) and Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> concentration and the pH ranges were those used today in industry.



**Figure 1.** COD removal kinetics in STOE. UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiment 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: pH 7 (■) and pH 3 (□). T = 25.4±1.7 °C (UV dosage of 500 μW cm<sup>-2</sup>). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> experiment 4.2 mM Fe (II): 42.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●). pH 2.8, T = 19.4±1.1°C.

The circumscribed central composite used to optimize the reaction conditions for chemical precipitation, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> are described in Table 2. The ranges of variables chosen were based in the case of chemical precipitation Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> concentration and the pH ranges were those used today in industry, correspond between 500 – 1500 mg Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> and pH 5.0 – 6.5. While UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> were base on studies in Kraft mill effluents correspond between 10.5 – 60 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pH 3.0 – 7.0 for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> between 1.5 – 8.0 mM Fe (II) and 7.0–40.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for. Columns 1 and 2 (chemical precipitation), 5 and 6 (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 9 and 10 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>) present the real and codified values for variables in study. The columns 4, 8 and 12 indicate to the factor response (COD removal) for chemical precipitation (Y<sub>CHP</sub>), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Y<sub>H</sub>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (Y<sub>FP</sub>). The polynomials describing the response factor as a result of the Mode 7.0™ software (Eqs. 6–8). The values of X<sub>1</sub> and X<sub>2</sub> represent the variables for each treatment and values in parenthesis describe the relative error associated with each coefficient (Pérez *et al.*, 2007). For chemical precipitation pH (X<sub>2</sub>) raises as the most important variable for COD, while Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> concentration (X<sub>1</sub>) has a less significant role. For case of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> the variable most important was H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (X<sub>1</sub>) and Fe (II) concentration (X<sub>1</sub>), respectively. Furthermore was not observed for all tertiary treatments studied, synergism or antagonism effects between variables. The Figure 2 shows contour diagram that represents the polynomials. The maximum COD removal for: a) chemical precipitation was 76.3 % with optimized variables between 918.9 to 1049.4 mg Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> and pH 5.0 – 5.3 (Figure 2a), b) for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> corresponded to COD removal of 74.0 % with optimized variables between 48.3 to 54.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pH 4.6 to 5.6 (Figure 2b) and c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> corresponded COD removal of 84.6 % with optimized variables between 10.9 to 39.7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 4.9 to 7.0 mM Fe (II) (Figure 2c). Ahmad *et al.* (2007) and Rodrigues *et al.* (2008), mentioned that the variable pH plays an important role in chemical precipitation for removing mainly to TSS (Total Suspended Solid), turbidity, color removal in the treatment kraft mill effluents. As mentioned above, Stephenson and Duff, (1996) have determined pH ranges for different coagulants, corresponding between 4.0 – 6.5 for FeCl<sub>3</sub>, above to 7.4 for FeSO<sub>4</sub>, 5.0 – 6.0 for AlCl<sub>3</sub> and between 5.5 – 6.8 for Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, however it all depends of the characteristics of the effluent to be treated. For UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Jamil *et al.* (2011) indicate that OH• generated from the direct photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were the main responsible species of COD removal and the addition of excess above 147 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, coupling of the hydrogen peroxide may occur or it also reacts with these radicals and hence acts as an inhibiting agent of COD removal. In the case H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> if it is known that operational parameters such

as Fe (II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, pH, temperature and initial concentration of the contaminant influence in the efficiency of the process (Gogate and Pandit, 2004). Nevertheless, an excess of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or Fe (II) might be detrimental since these species can react with some of the intermediates as OH•, responsible for the direct oxidation of the organic matter (Pérez *et al.*, 2007). However, according to Lucas *et al.* (2012), the availability of Fe (II) becomes the main rate-limiting step of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> because the regeneration of Fe (II) from Fe (III) is slower than the consumption of ferrous iron (Hermosilla *et al.*, 2012). By the above authors as Chamarro *et al.* (2001) have mentioned typical range for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> reactants is about 1 part of Fe (II) per 5–25 parts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

$$\begin{aligned}
 Y_{CHP} = & 73.2(\pm 4.5) + 5.1[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3](\pm 2.7) - 9.9[\text{pH}](\pm 2.7) \\
 & - 16.4 [\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3]^2(\pm 3.3) - 7.3[\text{pH}]^2(\pm 3.3) \\
 & + 8.4[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3][\text{pH}](\pm 3.8)
 \end{aligned}$$

(6)

$$\begin{aligned}
 Y_H = & 69.7 (\pm 1.1) + 12.8 [\text{H}_2\text{O}_2](\pm 0.6) + 4.2[\text{pH}](\pm 0.6) - 9.5[\text{H}_2\text{O}_2]^2(\pm 0.7) \\
 & - 2.5 [\text{pH}]^2(\pm 0.7) - 6.1[\text{H}_2\text{O}_2][\text{pH}] (\pm 0.9)
 \end{aligned}$$

(7)

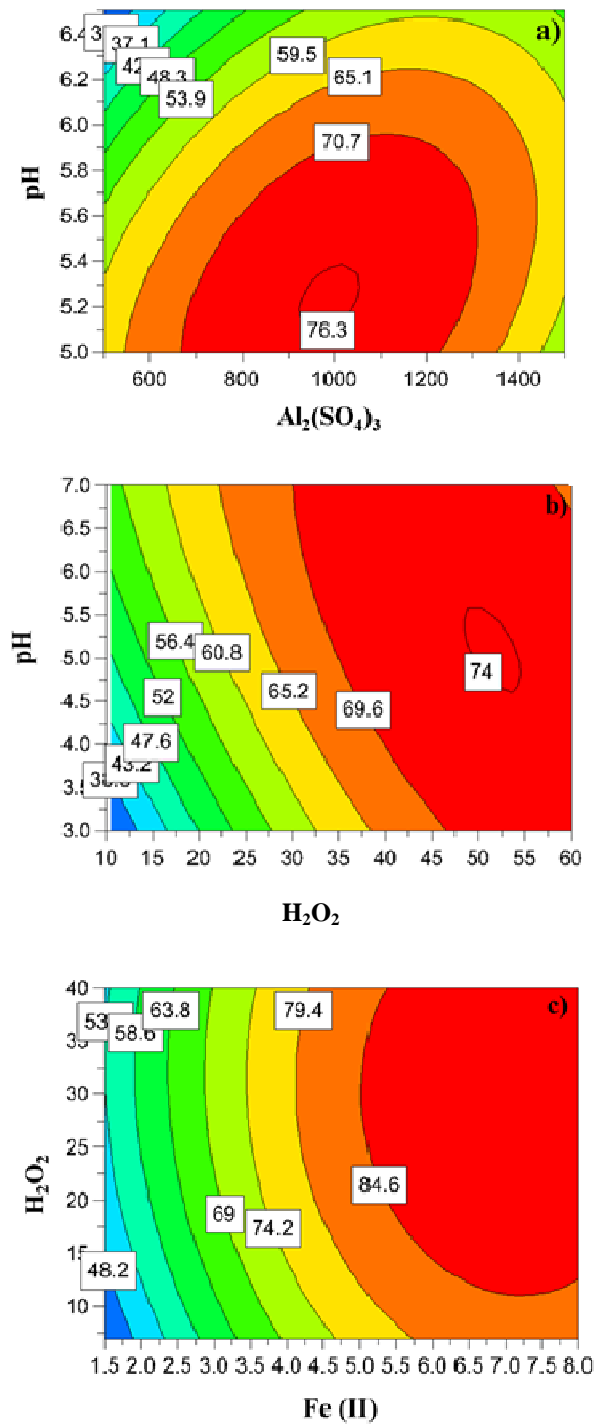
$$\begin{aligned}
 Y_{FP} = & 82.5 (\pm 2.4) + 17.9 [\text{Fe(II)}](\pm 1.4) + 3.5[\text{H}_2\text{O}_2](\pm 1.4) - 12.4[\text{Fe(II)}]^2(\pm 1.7) \\
 & - 4.2 [\text{H}_2\text{O}_2]^2(1.7)
 \end{aligned}$$

(8)

**Table 1.** Circumscribed central composite ( $2^2$ ) for chemical precipitation, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>.

Column	Chemical precipitation				UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup>			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Run	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> mg/ L	pH	Y <sub>CHP</sub> calc. %	Y <sub>CHP</sub> exp. %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mM	pH	Y <sub>H</sub> calc. %	Y <sub>H</sub> exp. %	Fe(II) mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mM	Y <sub>FP</sub> calc. %	Y <sub>FP</sub> exp. %
1	500(-1)	5.0(-1)	62.6	56.8	10.5(-1)	3.0(-1)	34.4	35.7	1.5(-1)	7.0(-1)	43.0	46.1
2	1500(+1)	5.0(-1)	55.9	60.9	60.0(+1)	3.0(-1)	72.3	71.2	8.0(+1)	7.0(-1)	81.5	82.1
3	500(-1)	6.5(+1)	25.9	23.8	10.5(-1)	7.0(+1)	55.1	56.5	1.5(-1)	40.0(+1)	52.7	50.4
4	1500(+1)	6.5(+1)	53.0	61.7	60.0(+1)	7.0(+1)	68.7	67.7	8.0(+1)	40.0(+1)	86.0	81.2
5	293(-1.4)	5.8(0)	33.0	39.3	0.3(-1.4)	5.0(0)	32.5	30.7	0.2(-1.4)	23.5(0)	32.2	31.3
6	1707(+1.4)	5.8(0)	47.4	38.3	70.2(+1.4)	5.0(0)	68.9	70.4	9.3(+1.4)	23.5(0)	82.9	85.6
7	1000(0)	4.7(-1.4)	72.5	73.7	35.3(0)	2.2(-1.4)	58.6	58.5	4.8(0)	0.2(-1.4)	69.0	66.1
8	1000(0)	6.8(+1.4)	44.4	40.4	35.3(0)	7.8(+1.4)	70.6	70.4	4.8(0)	46.8(+1.4)	79.1	83.9
9	1000(0)	5.8(0)	73.2	76.8	35.3(0)	5.0(0)	69.8	68.7	4.8(0)	23.5(0)	82.5	80.8
10	1000(0)	5.8(0)	73.2	73.1	35.3(0)	5.0(0)	69.8	71.8	4.8(0)	23.5(0)	82.5	81.7
11	1000(0)	5.8(0)	73.2	69.8	35.3(0)	5.0(0)	69.8	68.8	4.8(0)	23.5(0)	82.5	85.1

Response factor: Y is defined as COD removal for Chemical precipitation (Y<sub>CHP</sub>), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Y<sub>H</sub>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (Y<sub>FP</sub>) after 57 min, 75 min y 10 min, respectively. Y calc.: Y calculated for software; Y exp.: Y experimental.

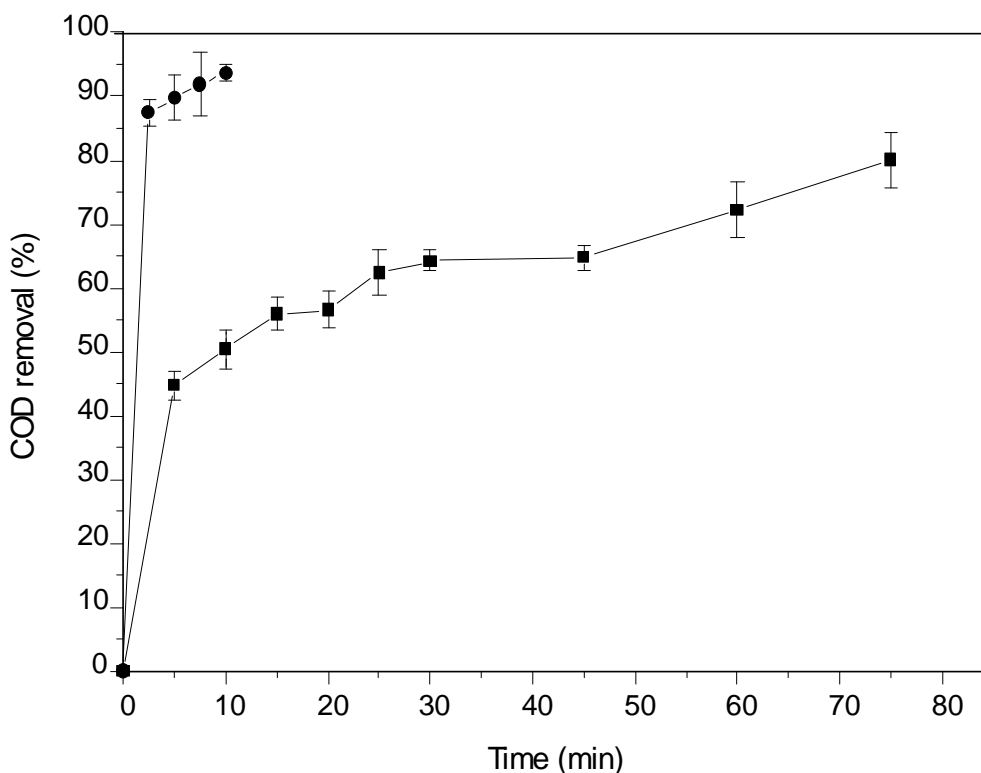


**Figure 2.** Contour diagram of response surface models for (a) chemical precipitation treatment, (b) UV/  $\text{H}_2\text{O}_2$  and (c)  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ .

Within the optimized variables obtained with the Contour diagram of response surface, middle points were selected for analyzing the behavior of COD removal kinetics. The figure 3 depict the kinetics of COD removal obtained with the selected optimized reaction variables for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>. In kinetics experiments for a) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaching a maximum COD removal of 80% after reaction time of 75 min and 51.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and pH 5.1, b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> reaching a maximum COD removal of 93.6% after reaction time of 10 min and 5.5 mM Fe(II): 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration. In the case of chemical precipitation, corresponded to 84.7% COD after reaction time of 57 min and 984.2 mg Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> and pH 5.2. These results are summarized in Table 3. Authors as Srivastava *et al.* (2005) and Garg *et al.* (2010) determined COD removal between 63 – 74 % for chemical precipitation using Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> at concentrations above 2 g L<sup>-1</sup>, pH 5.0 and a reaction time of 120 min. Furthermore for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been reported COD removal above 50 % under conditions of pH 3.0, 147.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration to 75 min (Jamil *et al.*, 2011). While for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> have been reported COD removal between 55 – 90 % 0.9 – 13.6 mM Fe (II) and between 29.4 – 58.8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to pH 3 (Jamil *et al.*, 2011; Hermosilla *et al.*, 2012).

**Table 3.** Optimized values for variables and maximum COD removal for each treatment

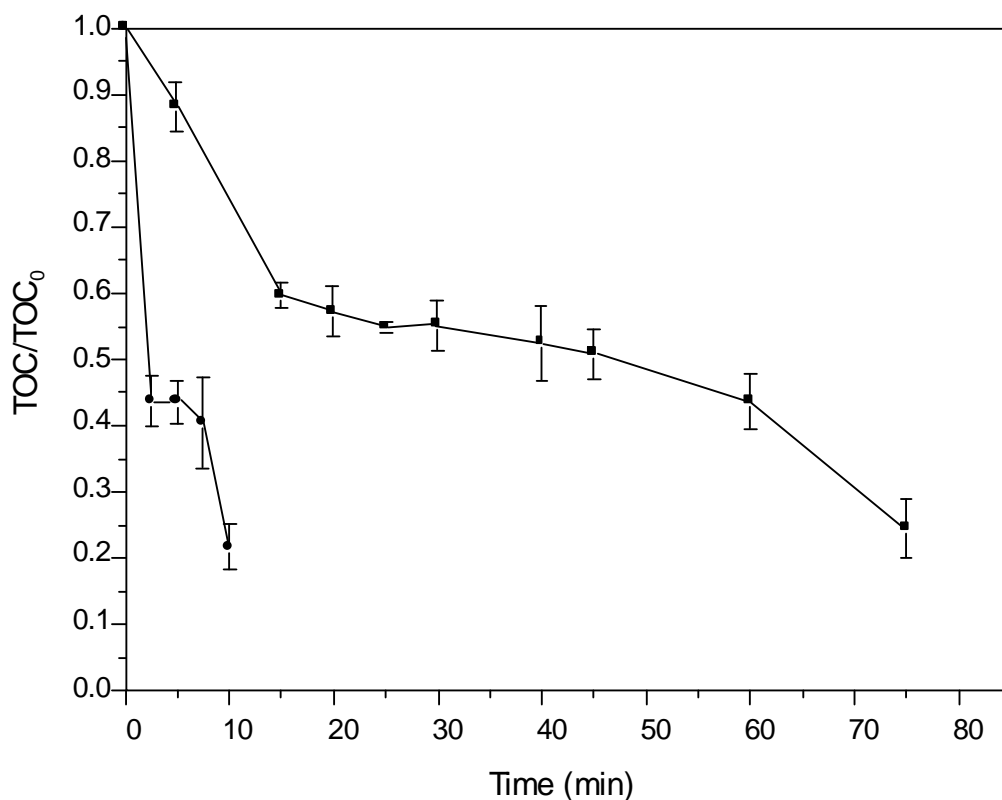
Variables	Unit	Chemical precipitation	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Fe <sup>2+</sup>
pH		5.2	5.1	
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	mg L <sup>-1</sup>	984.2		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	mM		51.4	25
Fe(II)	mM			5.5
COD	%	84.7	80.0	93.6



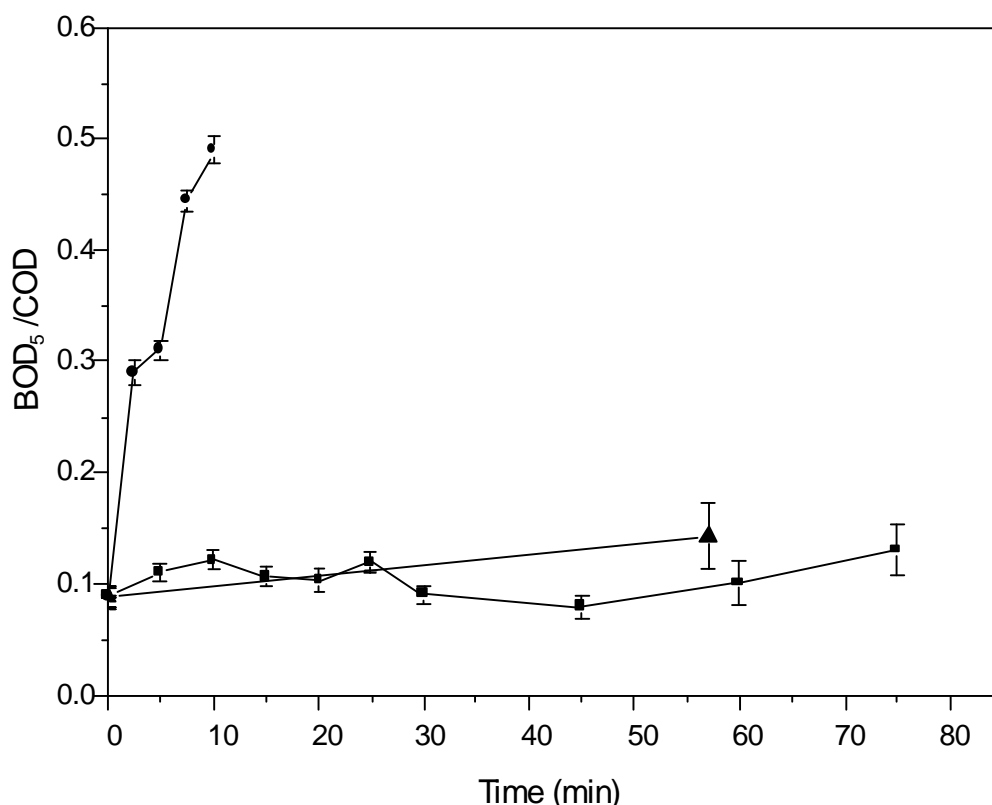
**Figure 3.** COD removal kinetics with the optimized variables obtained with the Contour diagram of response surface, a) UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conditions: 51.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: pH 5.1 (■), b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> conditions 5.5 mM Fe (II): 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●), pH 2.8.

As shown in Figure 4, the TOC removal for both AOPs reached similar mineralization but in different times with TOC/ TOC<sub>0</sub> ratio almost 80% in both cases, with reaction time of 10 min and 75 min for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The above mentioned may explain because in this study H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> increase the biodegradability of compounds of high molecular weight to low molecular weight results presented subsequently (Jamil *et al.*, 2011). However Garcia-Segura and Brillas, 2011 mentioned that the effectiveness of AOPs is limited by the formation of recalcitrant carboxylic acids as oxalic acid is the most common by-product from aromatics compounds as the case of kraft mill effluents because is hardly destroyed with OH• largely prolonging the reaction time (Garcia-Segura and Brillas, 2011). In the case of chemical precipitation TOC removal was 43.6 %. Previous studies with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determined TOC removal between 8.0 – 45 % with concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> between 25 – 50 mM and pH of 3 – 11 (Catalkaya and Kargi, 2007; Catalkaya and Kargi, 2008). In the case of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> has registered TOC removal ranging from 20 to 40 % with concentrations 1.8 mM Fe (II) and 147.1 mM

$\text{H}_2\text{O}_2$  and 294.1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  to pH 3.0 (Perez *et al.*, 2002) and between 63.4 to 84.6 % TOC removal with 5 mM Fe (II) and 50 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and pH 3.0 to 5.0 (Catalkaya and Kargi, 2007). The Figure 5 shows biodegradability index ( $\text{BOD}_5/\text{COD}$ ), when the effluent was submitted to  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  the biodegradability increase significantly until 0.49. Nevertheless for precipitation treatment, UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  index  $\text{BOD}_5/\text{COD}$  decrease to 0.14, 0.13, respectively. Due to which,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  appears as the most efficient in to transform the organic matter to more biodegradable forms. Furthermore, Eskelinen *et al.* (2010) and Rodrigues *et al.* (2008) obtained  $\text{BOD}_5/\text{COD}$  ratio of 0.14 to 0.22 after chemical precipitation, whereas with UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  and photocatalysis were obtained ratios of 0.11 and 0.63 to 0.71, respectively, confirming the levels of recalcitrant organic matter removal of POAs.



**Figure 4.** TOC mineralization for UV/  $\text{H}_2\text{O}_2$  (■) and  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  (●).



**Figure 5.** Biodegradability index (BOD<sub>5</sub>/ COD) evolution in chemical precipitation (▲ ), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (■) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (●).

Despite the high effectiveness of AOPs have been few researches have in chronic toxicity removal following these technologies. Eskelinen *et al.* (2010) obtained phytosterols removal above 90 % specifically for  $\beta$ -sitosterol and stigmastanol with 5 g CaO L<sup>-1</sup> and pH 12. Whereby AOPs are a promising alternative for mineralization of recalcitrant compounds due to its high reduction potential of OH<sup>•</sup> (Gültekin and Ince, 2007; Jamil *et al.*, 2011). The Figure 6 show chronic toxicity in *D. magna* obtained in this study for STOE and after tertiary treatment. López *et al.* (2011) attributed the presence of chronic toxicity to the variation in the proportion of body length with body width expressed as reductions of Allometric Growth Rate (% AGR). Chronic toxicity was observed in STOE with reductions of % AGR between 6.1 to 11.5 with significant differences with respect to control only for STOE without dilution (100 %, p <0.05). Furthermore, chemical precipitation sludge shows reductions of 0.6 % and 3.4 % for dilutions of 50 % and 75 %. Nevertheless for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> not register reductions of % AGR which are efficient in chronic toxicity removal. López et

al. (2011) studied different combinations of STOE (*P. radiata*, mixture *P. radiata* 50 %: 50 % *Eucalyptus globulus*) containing added phytosterols ( $\beta$ -sitosterol, stigmasterol), obtained reductions of AGR of 17 % and 27 % for the day 14 and 21, respectively. Other studies support increases of body width with respect to the body length of 20 % and 2 % when *D. magna* were exposed STOE of 10 % and 20 %, respectively (Olmstead and LeBlanc, 2000). These results could be associated with remaining recalcitrant compounds contained in STOE such as phytosterols where chronic toxicity has been demonstrated and have been found in effluent discharge in concentrations between 0.16–0.33 mg L<sup>-1</sup> for  $\beta$ -sitosterol, 0.02 – 0.07 mg L<sup>-1</sup> for stigmasterol and 0.06 mg L<sup>-1</sup> for campesterol (Xavier *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2010). Whereby these effluents are input of potential source of chronic toxicity in aquatic ecosystems because are associated with particles or dissolved organic matter and sediment (Orrego *et al.*, 2006; Chamorro *et al.*, 2013).

#### **4. Conclusions**

Chemical precipitation, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> under such optimized conditions for circumscribed central composite (CCC) model are efficient in COD removal with 84.7 %, 80.0 % and 93.6 % with reaction times of 57 min, 75 min and 10 min, respectively. In addition these treatments were able to chronic toxicity removal in the effluents generated. However, chronic toxicity was recorded in STOE and sludge formed during the chemical precipitation with maximum reductions % AGR of 11.5 for STOE without dilution (100 %,  $p < 0.05$ ) and reductions of 3.4 % for dilutions of 75 %, respectively. Through these results, it is suggested in the case of chemical precipitation occur a phase of change of compounds with potential chronic toxicity.

#### **Acknowledgements**

This work was partially supported by Fondecyt Grant No 1120664 and a Conicyt AT 24100082.

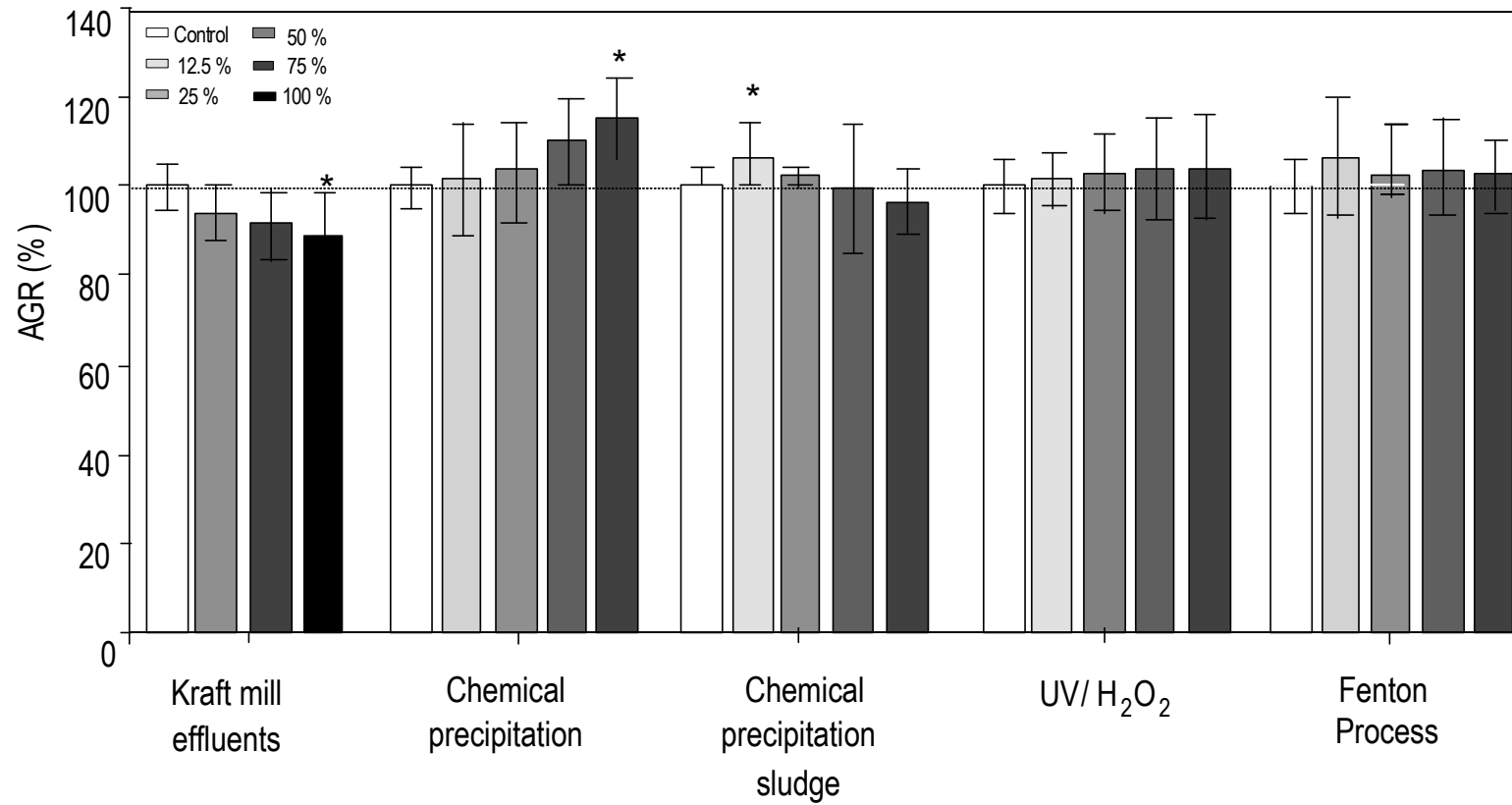


Figure 6. Evaluation of chronic toxicity in different effluents by *D. magna*.

## References

- APHA-AWWA-WPCF. 1998. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> Ed. Washington DC, 1325 pp.
- Assalin, M., Santos, E., Durán, N., 2009. Combined system of activated sludge and ozonation for the treatment of kraft E1 effluent. *J. Environ. Res. Publ. Health*, 6, 1145–1154.
- Chamorro, S., Xavier, C., Vidal, G., 2005. Behavior of aromatic compounds contained in kraft mill effluents treated by aerated lagoon. *Biotechnol. Progr.*, 21, 1567–1571.
- Chamorro, S., Pozo, G., Jarpa, M., Hernández, V., Becerra, J., Vidal, G., 2010. Monitoring endocrine activity in Kraft mill effluent treated by aerobic moving bed bioreactor system. *Water Sci. technol.* 62(1), 154–161.
- Chamorro, S., Hernández, V., Matamoros, V., Domínguez, C., Becerra, J., Vidal, G., Piña, B., Bayona, J. 2013. Chemical characterization of organic microcontaminant sources and biological effects in riverine sediments impacted by urban sewage and pulp mill discharges. *Chemosphere*, 90, 611 – 619.
- Catalkaya, E., Kargi, F., 2007. Color, TOC and AOX removals from pulp mill effluent by advanced oxidation processes: A comparative study. *J. Hazard. Mater.*, 139, 244–253.
- Catalkaya, E., Kargi, F., 2008. Advanced oxidation treatment of pulp mill effluent for TOC and toxicity removals. *J. Environ. Manage.*, 87, 396–404.
- De los Santos Ramos, W., Poznyak, T., Chairez, I., Cordova, R., 2009. Remediation of lignin and its derivatives from pulp and paper industry wastewater by the combination of chemical precipitation and ozonation. *J. Hazard. Mater.*, 169, 428–434.
- Eskelinen, K., Särkkä, H., Agustiono, T., Sillanpää, M., 2010. Removal of recalcitrant contaminants from bleaching effluents in pulp and paper mills using ultrasonic irradiation and Fenton-like oxidation, electrochemical treatment, and/or chemical precipitation: A comparative study. *Desalination*, 255, 179–187.
- Fontanier, V., Farines, V., Albert, J., Baig, S., Molinier, J., 2006. Study of catalysed ozonation for advanced treatment of pulp and paper mill effluents. *Water Res.*, 40, 303–310.

- Garcia-Segura, S., Brillas, E. 2011. Mineralization of the recalcitrant oxalic and oxamic acids by electrochemical advanced oxidation processes using a boron-doped diamond anode. *Water Res.*, 45, 2975–2984.
- Garg, A., Mishra, I. M., Chand, S., 2010. Effectiveness of coagulation and acid precipitation processes for the pre-treatment of diluted black liquor. *J. Hazard. Mater.*, 180, 158–164.
- Gogate, P. Pandit, A. 2004. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Adv. Environ. Res.*, 8, 501–511.
- Gültekin, I., Ince, N., 2007. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. *J. environ. Manage.*, 85, 816–832.
- Hermosilla, D., Merayo, N., Ordoñez, R., Blanco, A., 2012. Optimization of conventional Fenton and ultraviolet-assisted oxidation processes for the treatment of reverse osmosis retentate from a paper mill. *Waste manage.*, 32, 1236–1243.
- López, D., Chamorro, S., Silva, J., Bay-Schmith, E., Vidal, G., 2011. Chronic effects of *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* kraft mill effluents on *Daphnia magna* and phytosterols. *B. Environ. Contam. Tox.*, 87, 633–637.
- Jarpa, M., Pozo, G., Baeza, R., Martínez, M., Vidal, G., 2012. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor, *J. Environ. Sci. Health, A.*, 47, 1–8.
- Jamil, T., Ghaly, M., El-Seesy, I., Souaya, E., Rabab, N. 2011. A comparative study among different photochemical oxidation processes to enhance the biodegradability of paper mill wastewater, *J. Hazard. Mater.*, 185, 353–358.
- Lucas, M., Peres, J., Amor, C., Prieto-Rodriguez, L., Maldonado, M., Malato, S., 2012. Tertiary treatment of pulp mill wastewater by solar photo-Fenton. *J. Hazard. Mater.*, 225–226, 173–181.
- Merayo, N., Hermosilla, D., Blanco, L., Cortijo, L., Blanco, A. 2013. Assessing the application of advanced oxidation processes, and their combination with biological treatment, to effluents from pulp and paper industry, *J. Hazard. Mater.*, 262, 420 – 427.

- Olmstead, A., LeBlanc, G., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex Characteristics of *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 2107–2113.
- Orrego, R., Burgos, A., Moraga, G., Inzunza, B., Gonzales, M., Valenzuela, A., Barra, R., Gavilán J. 2006. Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): biomarker responses along a pollution gradient in the Biobío river, Chile. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 (9), 2280 – 2287.
- Pérez, M., Torrades, F., Garcia-Hortal, J., Doménech, X. & Peral, J. 2002. Removal of organic contaminants in paper pulp treatment effluents under Fenton and photo-Fenton conditions *Appl. Catal., B*, 36: 63 – 74.
- Pérez, M., Graells, M., Del Valle, L., Centelles, E., Mansilla, H., 2007. Fenton and Photo-Fenton degradation of 2-chlorophenol: Multivariate analysis and toxicity monitoring. *Catal. Today.*, 124, 163–171.
- Rodrigues, A., Boroski, M., Shimada, N., Garcia, J., Nozaki, J., Hioka, N., 2008. Treatment of pulp and paper mill wastewater by coagulation-flocculation followed by heterogeneous photocatalysis. *J. Photoch. Photobio. A.*, 194, 1–10.
- Sotero-Santos, R., Rocha, O., Povinelli, J., 2005. Evaluation of water treatment sludge toxicity using *Daphnia* bioassay. *Water Res.*, 39, 3909–3917.
- Srivastava, V., Mall, I., Mishra, I. 2005., Treatment of pulp and paper mill wastewaters with poly aluminium chloride and bagasse fly ash. *Colloid. Surface. A.*, 260, 17–28.
- Slade, A., Ellis, R., vandenHeuvel, M., Stuthridge, T., 2004. Nutrient minimisation in the pulp and paper industry: an overview. *Water Sci. Technol.*, 50(3), 111–122.
- Torrades, F., Pérez, M., Mansilla, H., Peral, J., 2003. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of cellulose bleaching effluents. *Chemosphere*, 53, 1211–1220.
- USEPA. 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and Receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-91/002. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

- Vidal, G., Navia, R., Levet, L., Mora, M., Diez, M., 2001. Kraft mill anaerobic effluent Color enhancement by a fixed-bed adsorption system. *Biotechnol. Lett.*, 23(11), 861–865.
- Villamar, C.A., Jarpa, M., Decap, J., Vidal, G., 2009. Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus*. *Water Sci. Technol.*, 59(3), 507–514.
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S. & Wert, E. 2005. Fate of Endocrine-Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 6649 – 6663.
- Xavier, C., Mosquera-Corral, A., Becerra, J., Hernández, V. & Vidal, G. 2009. Activated sludge versus aerated lagoon treatment of kraft mill effluents Containing  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol. *J. Environ. Sci. Health. A.*, 44, 327–335.

## CAPITULO V

# POLYHYDROXYALKANOATE BIOSYNTHESIS FROM PAPER MILL WASTEWATER TREATED BY A MOVING BED BIOFILM REACTOR

**Jarpa, M.**, Pozo, G., Baeza, R., Martínez, M. and Vidal, G. (2012). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47: 1 – 8.

## **Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor**

Jarpa, M<sup>1.</sup>, Pozo, G<sup>1.</sup>, Baeza, R<sup>1.</sup>, Martinez, M<sup>2.</sup> and Vidal, G<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Environmental Science Center EULA-Chile, University of Concepción, P.O. Box 160–C, Concepción, Chile;

<sup>2</sup>Microbiology Department, University of Concepción, P.O. Box 160–C, Concepción, Chile

Corresponding author: glvidal@udec.cl

### **Abstract**

Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in paper mill wastewater treated by a Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) was evaluated. A MBBR was operated during 300 d. The increasing effect of the Organic Load Rate (OLR) from 0.13 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d to 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and the influence of two relationship of BOD<sub>5</sub>: N: P (100: 5: 1 and 100: 1: 0.3) on the PHA biosynthesis were evaluated. With an OLR of 0.13 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d, the maximum organic matter removal measure as Biochemical Oxygen Demand (BOD<sub>5</sub>) was 98.7% for a BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100: 5: 1. Meanwhile for BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100: 1: 0.3, the maximum efficiency was 87.2% (OLR: 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d). The behaviour of the Chemical Oxygen Demand (COD) and total phenolic compound removal efficiencies were below 65.0% and 41.0%, respectively. PHA biosynthesis was measured as a percentage of cells that accumulate PHA, where the maximum percentage was 85.1% and 78.7% when MBBR was operated under a BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100: 5: 1 and 100: 1: 0.3, respectively. Finally, the PHA yields in this study were estimated to range between 0.11 to 0.72 mg PHA/mg VSS and 0.06 to 0.15 mg PHA/mg COD.

**Keywords:** Paper mill wastewater, MBBR, sludge, polyhydroxyalkanoates, organic matter.

## 1. INTRODUCTION

The Chilean paper industry has rapidly developed with an approximate annual production of 1,335 tons paper. Effluents treatment consists in primary and secondary treatments. Primary treatment removes suspended solids between 80.0–90.0%,<sup>[1]</sup> secondary treatment, performed mainly in activated sludge, removes between 73.5–99.2% Biochemical Oxygen Demand (BOD<sub>5</sub>) and 50.0–92.4% Chemical Oxygen Demand (COD) when the reactor is operated under HRT (Hydraulic Retention Time) from 12 to 42 h with and OLR from 0.07 to 0.21 kg BOD<sub>5</sub>/kg VSS·d.<sup>[1–3]</sup> At present, the attached biomass system MBBR has been successfully used to treat forest industry wastewater, removing high concentrations of organic pollutants and preventing sludge recirculation of sludge at low operating costs.<sup>[4–6]</sup> Removal efficiencies achieved ranged between from 85.0–99.0% for BOD<sub>5</sub> and 24.0–82.0% COD with HRT between 1.7 to 85 h and OLR from 0.07 to 1.19 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d.<sup>[7, 8]</sup>

During its operation, several tons of excess sludge are generated due to the BOD<sub>5</sub> removed (1.8–3.5 ton sludge/ton BOD<sub>5</sub>), and has become a troublesome issue.<sup>[9]</sup> One value-adding process for BOD<sub>5</sub>, under specific treatment conditions is the enrichment of biosolids with polyhydroxyalkanoate (PHA) production. PHA are accumulated as intracellular granules under stress conditions of excess carbon source and nutrient limitation (nitrogen: N and phosphorus: P).<sup>[10]</sup> The main substrate required for PHA biosynthesis is the presence of VFA as carbon source.<sup>[11]</sup>

Some studies in the literature show a maximum content of PHA between 17 to 20% for the sludge dry weight from kraft mill wastewater.<sup>[11]</sup> Pozo *et al.*<sup>[8]</sup> studied the influence of the relationship of BOD<sub>5</sub>: N: P, finding that 100: 1: 0.2 was optimal for PHA production of 25.7% and 30.4% for dry weight of sludge for inoculum from the paper industry and kraft mill industry, respectively. While paper mill wastewater shows that a maximum PHA production of 48% for dry weight of sludge was obtained when operating an activated sludge.<sup>[9]</sup>

The objective of this work is to evaluate the feasibility of polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater by a MBBR.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Raw wastewater**

The carbon source was paper mill wastewater, obtained after primary treatment of *Pinus radiata* with Pressure Groundwood (PGW) pulp. Before nutrient dosing, it was stored in the dark  $4^{\circ}\text{C}\pm 1$ .

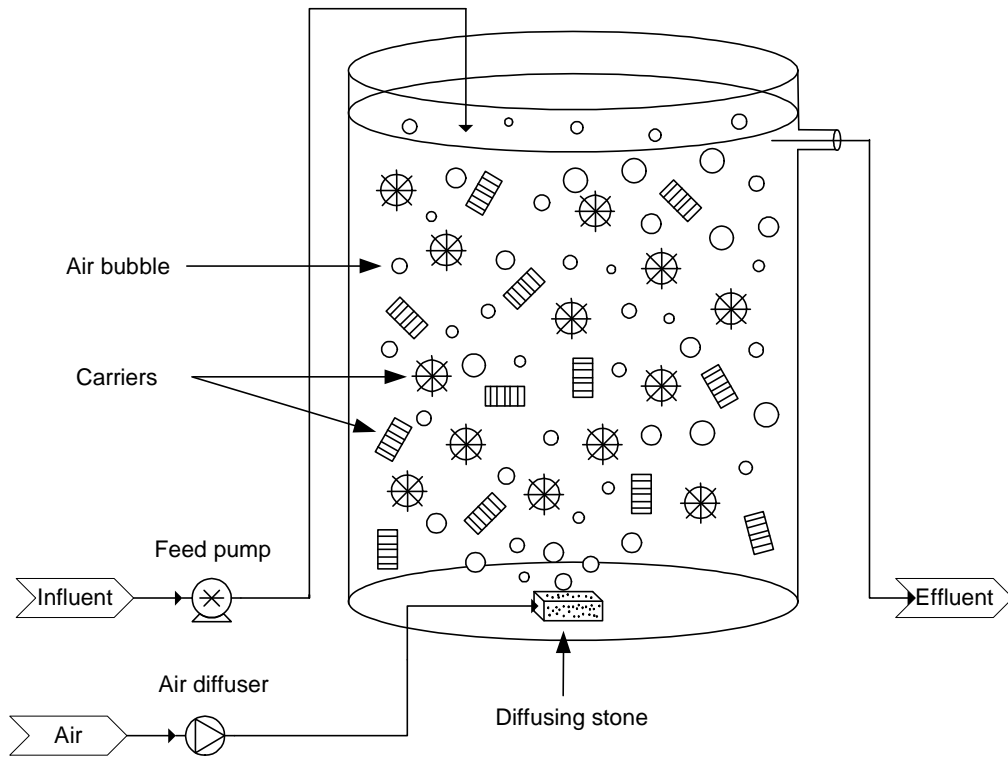
[12]

### **2.2 Inoculum**

MBBR was inoculated in two stages. The sludge concentration for the first (1–74 d) and second stage (75–300 d) was 5.91 g VSS/L and 7.40 g VSS/L, respectively. The biomass was collected from an activated sludge treating municipal wastewater.

### **2.3 MBBR**

Figure 1 shows the MBBR with a useful volume of 0.85 L. The MBBR was filled with 200 polyethylene type carriers with Assisting Moving Bed (AMB) as support. The AMB density, specific surface area and porosity are 98 kg/m<sup>3</sup>, 850 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> and 85%, respectively. AMB support occupied 16.3% of the reactor volume. The MBBR was operated at a temperature of  $19.1\pm 2.1^{\circ}\text{C}$  and the Dissolved Oxygen (DO) concentration ranged between 6.0–7.6 mg/L.



**Figure 1.** Experimental setup for MBBR system.

The operation strategy was to increase the OLR from 0.13 to 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>-d (Table 1) for two different relationships of BOD<sub>5</sub>: N: P. The first BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100: 5: 1 was between 1 to 270 d of operation; the second BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100:1:0.3 was during the operation time from 271 to 300 d. Removal efficiencies of BOD<sub>5</sub>, COD, total phenolic compounds were calculated according to the equation 1:

$$R(\%) = \frac{Q_i \cdot C_i - Q_o \cdot C_o}{Q_i \cdot C_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Where R (%) is the removal percentage; Q the flow rate (L/d); C the parameter concentration (mg/L); subindex “i” and “o” correspond to the inflow and outflow, respectively.

Furthermore, during the operation, the development of biomass concentration and VFAs (Volatile Fatty Acids) concentration was evaluated. VFA concentrations were converted to COD using the conversion factor. [13] PHA biosynthesis and PHA yields were determined on biomass generated and substrate consumed. [8, 14]

## 2.4 Analytical Methods

COD, BOD<sub>5</sub>, Total Suspended Solids (TSS), Volatile Suspended Solids (VSS), Sludge Volume Index (SVI), Total Nitrogen (TN) and Total Phosphorus (TP) were measured according to the Standard Methods. [15] Total phenolic compounds were determined by spectrophotometer (Model Spectronic Unicam UV-visible Series Genesys TM10) at a wavelength of 215nm (UV 215) (quartz cuvettes 1 x 1) and colour was measured with spectrophotometer at 440nm. [16] VFAs were measured by gas chromatography (Hewlett Packard Model 5890 Series II, with Flame Ionization Detector: FID), pH by electrode (Model inoLab ® Level 1/pH). Before determination of physicochemical parameters, the samples were filtered through 0.45 µm pore size filters.

The PHA biosynthesis was determined by flow cytometry (Flow cytometry FACSCalibur system), before microbial sludge deflocculation (tetrasodium pyrophosphate 0.01%, 2-dodecoxyethanol 0.01%). [17] The samples were measured using optical density at 600 nm (UV-Vis Spectrophotometer, TU–1810 Split Beam) for standardization (0.8–1.0). The obtained results were based on the analysis of 20,000 events. Simultaneously, living and dead cells were counted for evaluating PHA biosynthesis. [18, 19]

**Table 1.** MBBR system operational conditions.

Parameter	Unit	BOD <sub>5</sub> : N: P				
		100: 5: 1			100: 1: 0.3	
<i>Phase</i>		<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>
Period	d	ene-99	100-179	180-225	226-270	271-300
HRT	h	47.84±0.77	12.20±0.20	6.06±0.05	3.06±0.05	3.08±0.01
COD/BOD <sub>5</sub> influent		1.54±0.07	1.35±0.14	1.55±0.02	2.53±0.00	2.48±0.00
COD/BOD <sub>5</sub> effluent		2.22±0.03	2.19±0.01	3.24±0.04	2.70±0.04	1.24±0.02
OLR-volumetric influent	kg COD/m <sup>3</sup> ·d	0.20±0.06	0.80±0.04	4.02±0.08	7.67±0.14	7.45±0.04
OLR-volumetric influent	kg BOD <sub>5</sub> /m <sup>3</sup> ·d	0.13±0.02	0.56±0.04	2.36±0.51	2.99±0.01	2.99±0.01

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Paper mill wastewater characteristics

Table 2 shows the characteristic of paper mill wastewater used in this study. The pH variation ranged between 6.33–7.67. The COD and BOD<sub>5</sub> values were 839.00 mg/L and 441.03 mg/L, respectively. Additionally, the evaluated wastewater show slow nutrient concentration, specifically of 0.53 mg NT/L and 1.01 mg PT/L. Additionally, a high concentration of total phenolic compounds (1,758 mg/L) was found in this effluent, when compared with other kraft mill wastewaters (248.70–717.60 mg/L). [7, 8] On the other hand, the BOD<sub>5</sub>/COD ratio for this effluent was low (0.49 to 0.56), indicating a non-biodegradable fraction. [7]

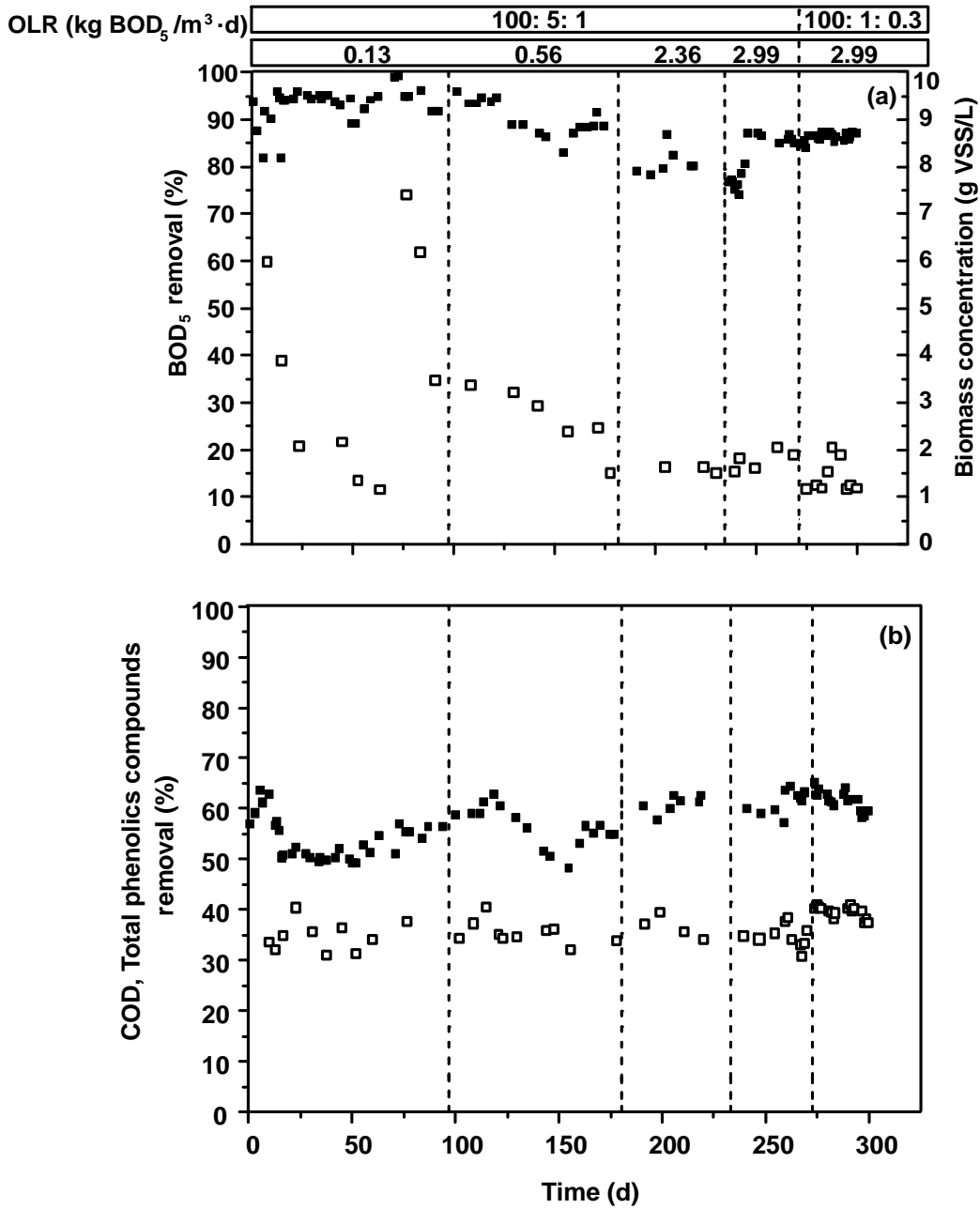
#### 3.2 Organic matter removal efficiency

Figure 2 shows MBBR performance for BOD<sub>5</sub> (Fig. 2a), COD and total phenolic compounds removal (Fig. 2b) at different OLR and BOD<sub>5</sub>: N: P relationship. Maximum BOD<sub>5</sub> removal efficiency (98.7%) was obtained for a BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100: 5: 1 with an OLR 0.13 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d. However, when OLR is increasing, BOD<sub>5</sub> removal efficiency decreases. So, when the MBBR was operated under an OLR between 0.56 to 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d, the maximum BOD<sub>5</sub> removal efficiencies decreased from 86.6% to 95.6%. This effect can be explained as due to loss of biomass concentration from the MBBR, ranged 5.91–1.15 g VSS/L and 7.40–1.51 g VSS/L for operating days 1 to 74 and 75 to 270, respectively. For the BOD<sub>5</sub>: N: P relationship was 100: 1: 0.3, BOD<sub>5</sub> values remained between 83.9–87.2% and biomass concentration was 1.17–1.24 g VSS/L for 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d (Fig. 2a). Similar results were reported for kraft mill wastewater treated by MBBR, 75.0–95.0% for BOD<sub>5</sub>, with OLR from 0.07 to 1.19 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d. [7, 20] On the one hand, COD removal was below 64.9%, obtaining the maximum COD removal efficiencies for an OLR of 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d for the BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100: 1: 0.3. Furthermore, the MBBR performance for total phenolic compounds removal reached 41.0% (Fig. 2b). Villamar et al. [7] achieved above 45.0% removal of total phenolic compounds when operating a MBBR with kraft mill wastewater. Several authors show that the origin of recalcitrant COD is due to the molecular weight fraction of lignin above 1,000 Daltons. [7, 16, 21]

**Table 2.** Physicochemical characterization of the raw wastewater.

Parameter	Unit	Range	Average <sup>a</sup>
pH		6.33–7.67	6.83±0.60
COD	mg/L	825.21–857.40	839.00±12.80
BOD <sub>5</sub>	mg/L	405.02–484.11	441.03±26.55
Total nitrogen	mg/L	0.50–0.60	0.53±0.05
Total phosphate	mg/L	0.80–1.41	1.01±0.21
Acetic acid	mg/L	20.00–45.10	34.83±9.72
Propionic acid	mg/L	30.21–40.40	35.01±5.47
Butyric acid	mg/L	10.02–20.10	16.66±5.16
Total phenolic compounds (UV <sub>215</sub> )	mg/L	803.40–2,362.01	1,758.23±743.12
Color	Abs	0.02–0.06	0.05±0.01

<sup>(a)</sup>Values are the average of 6 determinations



**Figure 2.** MBBR Performance during the operation. Figure 2a removal of BOD<sub>5</sub> (■) and Biomass concentration (□). Figure 2b removal COD (■) Total phenolics compounds removal (□).

### 3.3 PHA biosynthesis

The presence of acetic acid (34.83 mg/L), propionic acid (35.01 mg/L) and butyric acid (16.66 mg/L) were determined for this wastewater. The ratio VFA/Total VFA were 0.29 mg COD/mg COD, 0.48 mg COD/mg COD and 0.23 mg COD/mg COD, for each case (Fig. 3). Yan et al. [11] evaluated VFA between 2–256 mg/L, mentioning among these acetic acid, propionic acid, iso-butyric acid, n-butyric acid. Bengston et al. [9] obtained VFA/Total VFA ratios of 0.35 mg COD/mg COD, 0.38 mg COD/mg COD and 0.18 mg COD/mg COD for acetic acid, propionic acid and butyric acid, respectively. This paper demonstrates presence of VFA in mill wastewater.

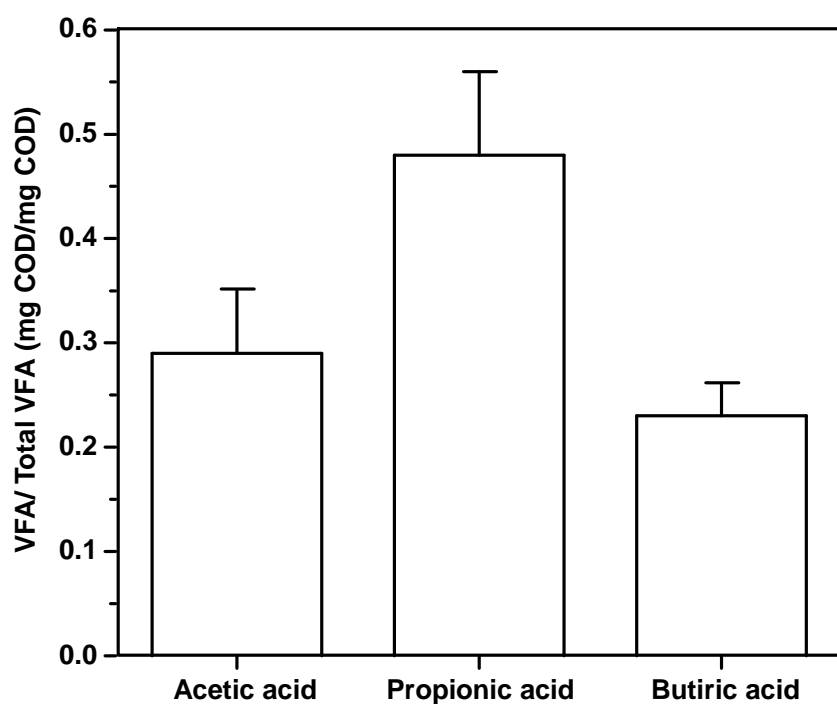
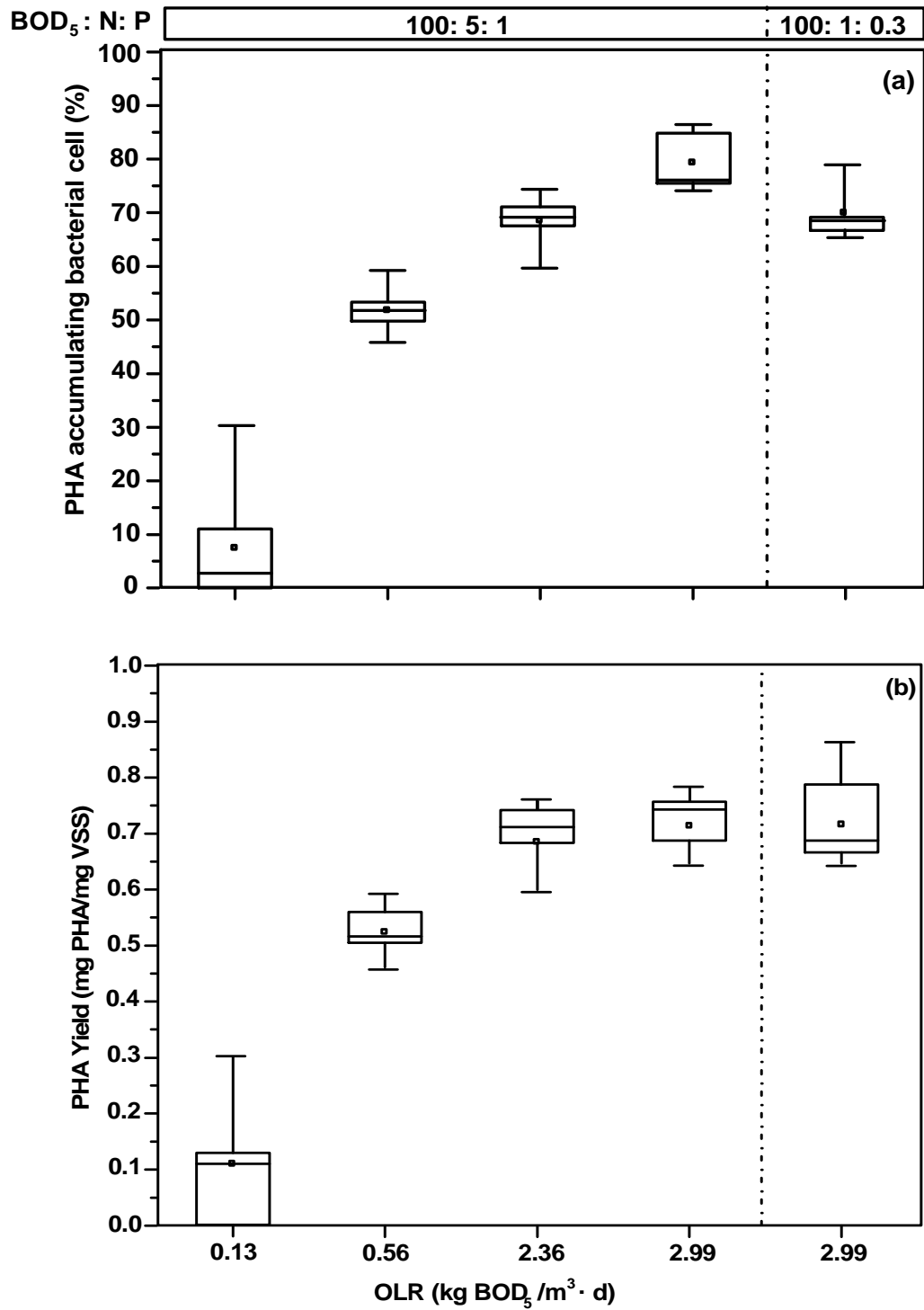


Figure 3. Concentration of total VFAs.

The PHA biosynthesis was determined as the percentage of cells (%) that accumulate PHA under different OLR and BOD<sub>5</sub>: N: P relationship. Figure 4a shows the MBBR performance for PHA accumulation into the cells. The percentage of the cell accumulation ranged between 0.003–85.4% when the BOD<sub>5</sub>: N: P relationship was 100: 5: 1. The maximum value (85.4%) was

obtained for an OLR 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d. In contrast, when the BOD<sub>5</sub>: N: P relationship was 100: 1: 0.3, the percentage of cells that accumulate PHA were ranged between 66.6–78.7%. Bengston et al. [9] found a potential PHA production of 48% of dry weight of sludge, through three different stages (acidogenic fermentation, batch systems and activated sludge) under COD: N: P relationship of the 100: 0.030: 0.001. On the other hand, Yan et al. [11, 22] found that PHA biosynthesis ranged between 17.0–43.1% of dry weight of sludge by batch experiments. Moreover, Pozo et al. [8] found a PHA biosynthesis from kraft mill wastewater of the 25.7% and 30.4% under the relationship of BOD<sub>5</sub>: N: P of 100:5:1 and 100:1:0.2, respectively.

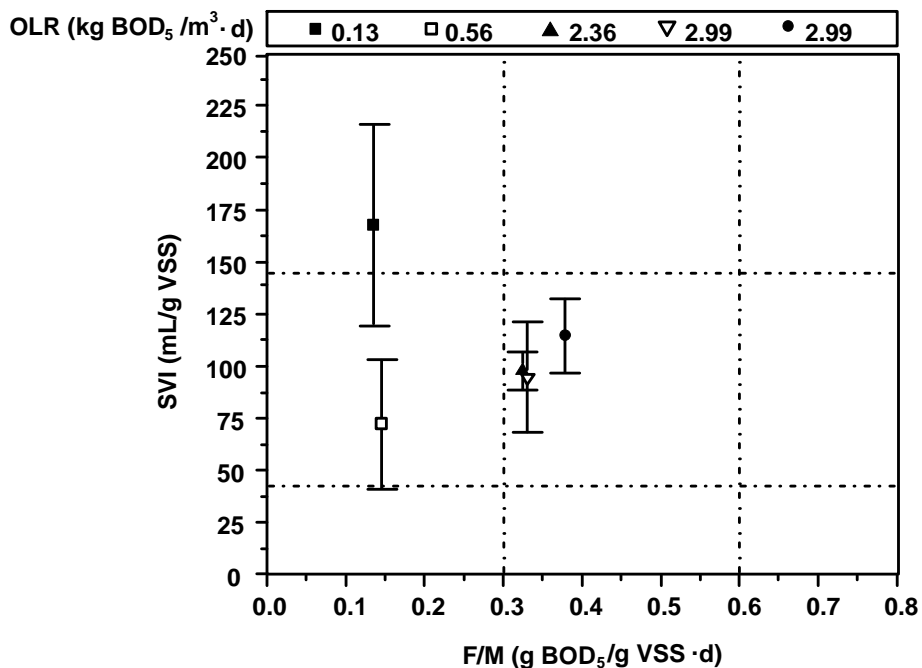
Figure 4b shows estimations of the PHA yield determined for the biomass generated. Average values were between 0.11–0.72 mg PHA/mg VSS, where the highest yield value was when the BOD<sub>5</sub>: N: P relationship was 100: 1: 0.3. Similarly, Wang et al. [23] showed that C: N conditions from 20 to 140 affect the biomass specific growth and new cell synthesis (0.2–0.6 g cells/g COD). In spite of that, PHA biosynthesis was verified, achieving 0.04 to 0.42 g PHA/g cell.



**Figure 4.** PHA production during MBBR operation. Figure 4a PHA accumulating bacterial cell. Figure 4b PHA yield.

### 3.4 Behaviour biomass during PHA biosynthesis

Figure 5 shows the PHA biosynthesis with respect to biomass stability the MBBR during its operation. SVI and F/M (Food/Microorganisms) values obtained by this study indicate low sediment sludge for OLRs of 0.13 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and 0.56 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d, with characteristics of disperse sludge. Corresponding values on average ranged from 71.72–167.54 mL/g VSS and 0.13–0.14 g BOD<sub>5</sub>/g VSS·d, for SVI and F/M, respectively. Therefore, there is biomass loss in the MBBR. Meanwhile for OLR from 2.36–2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d, characteristics of flocculent sludge were obtained, with values on average from 94.59–113.83 mL/g VSS and 0.32–0.37 BOD<sub>5</sub>/g VSS·d, for SVI and F/M, respectively. Previous studies of the MBBR under HRT of 85, 40 and 8 h obtained biomass with characteristics of dispersed sludge, while HRT of 39, 17, 4 h presented characteristics of flocculent sludge when the relationships were of 100: 5: 1 and 100: 1: 1. [7] Additionally PHA production has been obtained with biomass characteristics of flocculent sludge. [9, 24]



**Figure 5.** Behaviour of the SVI and F/M during MBBR operation at OLR of (■) 0.13, (□) 0.56, (▲) 2.36, (●) 2.99 and (○) 2.99.

Table 3 shows MBBR performance during the operation. Biomass concentration decreased from 7.40 to 1.15 g VSS/L when the OLR increased from 0.13 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d to 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d for the BOD<sub>5</sub>: N: P relationship was 100: 5: 1. Similar behaviour was observed when the BOD<sub>5</sub>: N: P relationship was 100: 1: 0.3. Moreover, the cells were compared through bacterial counts under different operation conditions. So, when the BOD<sub>5</sub>: N: P relationship was 100: 5: 1 and 100: 1: 0.3, the total cell count ranged between 2.9x10<sup>7</sup>–3.8x10<sup>7</sup> and 1.1x10<sup>7</sup>–1.4x10<sup>7</sup>, respectively. Finally, the production of PHA yield respect to COD removed in this study ranged between 0.06–0.15 mg PHA/mg COD. These values agree with Bengston et al. [9] and Pozo et al. [8] who found PHA yield values ranged between 0.1–0.14 mg PHA/mg COD.

**Table 3.** Performance of the MBBR reactor.

Parameter	Unit	BOD <sub>5</sub> : N: P				
		100: 5: 1				100: 1: 0.3
		I	II	III	IV	V
Phase						
Period	d	1–99	100–179	180–225	226–270	271–300
HRT	h	47.84±0.77	12.20±0.20	6.06±0.05	3.06±0.05	3.08±0.01
SVI	mL/g VSS	167.54±48.24	71.72±30.81	97.82±8.59	94.59±26.11	113.83±18.32
Biomass concentration	g VSS/L	1.15–7.40	1.51–3.68	1.64–1.80	1.80–2.04	1.17–1.24
Total cells	bact/mL	ND	ND	ND	2.9x10 <sup>7</sup> –3.8x10 <sup>7</sup>	1.1x10 <sup>7</sup> –1.4x10 <sup>7</sup>
Living cells	bact/mL	ND	ND	ND	1.7x10 <sup>7</sup> –2.5x10 <sup>7</sup>	8.4x10 <sup>6</sup> –8.9x10 <sup>6</sup>
BOD <sub>5</sub> removal	%	81.85–98.78	82.83–95.68	78.14–86.62	74.07–86.90	83.96–87.25
COD removal	%	49.07–56.83	48.12–62.75	57.64–62.52	57.09–64.21	58.12–64.99
Total phenolic compounds removal	%	31.04–40.33	32.11–40.41	34.09–39.43	30.76–38.53	38.10–41.01
PHA accumulating bacterial cell	%	0.003–30.13	46.14–59.12	59.95–74.19	74.31–85.41	66.66–78.75
PHA yield	mg PHA/mg COD	0.06	0.06	0.14	0.15	0.15

ND: Not Detected

#### 4. CONCLUSIONS

The MBBR treating paper mill wastewater can achieve BOD<sub>5</sub> removal efficiency above 98.7% under an OLR of 0.13 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and a relationship of BOD<sub>5</sub>: N: P of 100: 5: 1. The PHA biosynthesis from paper mill wastewater was above 85.1% (as percentage of PHA accumulated in cells) when the system was operated at relationship of BOD<sub>5</sub>: N: P of 100: 5: 1 and OLR of 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d. Moreover, in this study, the PHA yields values on average ranged between 0.11–0.72 mg PHA/mg VSS and 0.06–0.15 mg PHA/mg COD, demonstrating that PHA biosynthesis is possible, adding value to paper mill wastewater treatment.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fondecyt Grant No. 1120664, CONICYT AT Grant No. 24100082.

#### REFERENCES

- [1] Thompson, G.; Swain, J.; Forster, M. The Treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresour Technol.* **2001**, *77*: 275–286.
- [2] Kostamo, A.; Holmbom, B.; Kukkonen, J. Fate of wood extractives in wastewater plants at kraft pulp Treatment mills and mechanical pulp mills. *Water Res.* **2004**, *38*, 972–982.
- [3] Belmonte, M.; Xavier, C.; Decap, J.; Martinez, M.; Sierra-Alvarez, R.; Vidal, G. Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation. *J. Hazard. Mater.* **2006**, *135*, 256–263.
- [4] Odegaard, H.; Gisvold, B.; Strickland, J. The Influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process. *Water Sci. Technol.* **2000**, *41*(4), 383–391.
- [5] Pokhrel, D.; Viraraghavan, T. Treatment of pulp and paper mill wastewater-A review. *Sci. Total Environ.* **2004**, *333*, 37–58.
- [6] Rusten, B.; Ulgen, Y.; Lygren, E.; Eikebrokk, B. Design and Operations of the moving bed biofilm reactor Kaldnes. *Aquacult. Eng.* **2006**, *34*, 322–331.

- [7] Villamar, C.; Jarpa, M.; Decap, J.; Vidal, G. Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* as raw material. *Water Sci. Technol.* **2009**, *59*, 507–514.
- [8] Pozo, G.; Villamar, A.; Martinez, M.; Vidal, G. Polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis from kraft mill wastewaters: origin and biomass C: N relationship influence. *Water Sci. Technol.* **2011**, *63*, 449–455.
- [9] Bengtsson, S.; Werker, A.; Christensson, M.; Welander, T. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge wastewater treating a paper mill. *Bioresource Technol.* **2008**, *99*, 509–516.
- [10] Serafim, L.; Lemos, P.; Torres, C.; Reis, M.; Ramos, A. The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates produced by mixed cultures. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 355–366.
- [11] Yan, S.; Tyagi, R.; Surampalli, Y. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms. *Water Sci. Technol.* **2006**, *53*, 175–180.
- [12] Vidal, G.; Navia, R.; Levet, L.; Mora, M.; Diez, M. kraft mill anaerobic effluent Color enhancement by a fixed-bed adsorption system. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*(11), 861–865.
- [13] Barajas, M.; Scales, A.; Womanizer, R. Fermentation of a low VFA wastewater in an activated primary tank. *Water SA.* **2002**, *28*, 89–98.
- [14] Albuquerque, M.; Martino, V.; Pollet, E.; Averous, L.; Reis, M. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA Productivity, composition and properties. *J Biotechnol.* **2011**, *151*, 66–76.
- [15] American Public Health Association (APHA). In *Standard methods for the examination of water and wastewater*; 20<sup>th</sup> Ed.; Washington D.C, 1998; 1325 pp.
- [16] Chamorro, S.; Xavier, C.; Vidal, G. Behavior of aromatics compounds in kraft mill effluents contained treated by aerated lagoon. *Biotechnol. Progr.* **2005**, *21*, 1567–1571.

- [17] Herbert, R. Methods for enumeration and determination microorganism biomass in natural environments. *In Methods in microbiology techniques in microbial ecology*; Grigorova, R.; Norris, J., Eds.; London, 1990; 619 pp.
- [18] Schumann R.; Schiewer U.; Karsten U.; Rieling, T. Viability of bacteria from different aquatic habitats. Cellular fluorescent markers for membrane integrity and metabolic activity. *Aquat. Microb. Ecol.* **2003**, 32(1), 137–150.
- [19] Tobella, M.; Bunster, M.; Pooley, A.; Becerra, J.; Godoy, F.; Martínez, M. Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates by *Sphingopyxischilensis* S37 and *Wautersia* sp. PZK cultured in cellulose pulp mill effluents containing 2,4,6-trichlorophenol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 32, 397–401.
- [20] Chamorro, S.; Pozo, G.; Jarpa, M.; Hernandez, V.; Becerra, J; Vidal, G. Monitoring activity in kraft mill endocrine treated effluent by aerobic moving bed bioreactor system. *Water Sci. Technol.* **2010**, 62(1), 154–161.
- [21] Vidal, G.; Navia, R.; Levet, L.; Mora, M.; Diez, M. kraft mill anaerobic effluent color enhancement by a fixed-bed adsorption system. *Biotechnol. Letters.* **2001**, 23, 861–865.
- [22] Yan, S.; Subramaniam, B.; Tyagi, R.; Surampalli, Y. Waste activated sludge from bioplastics-batch process. *Pract. Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manage.* **2008**, 12(4), 239–247.
- [23] Wang, Y.; Hua, F.; Tsang, Y.; Chan, S.; Sin, S.; Chua, H.; Yu, P.; Ren, N. Synthesis of PHAs from waster under various C: N ratios. *Bioresource Technol.* **2007**, 98, 1690–1693.
- [24] Beccari, M.; Majone, M.; Massanisso, P.; Ramadori, R. A bulking sludge with high storage response selected under intermittent feeding. *Wat. Res.* **1998**, 32, 3403–3413.

## CAPITULO VI

# COMPARISON OF POLYHYDROXYALKANOATES BIOSYNTHESIS FROM DIFFERENT PAPER MILL WASTEWATER BY MOVING BED BIOFILM REACTOR

Baeza, R., **Jarpa, M.** and Vidal, G. (2013). Comparison of polyhydroxyalkanoates biosynthesis from different paper mill wastewater by moving bed biofilm reactor. *Environmental Protection Engineering, (Submitted)*.

## **Comparison of polyhydroxyalkanoates biosynthesis from different paper mill wastewater by moving bed biofilm reactor**

Baeza, R., Jarpa, M. and Vidal, G.\*

Environmental Science Center EULA-Chile, University of Concepción, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile.

Corresponding author: glvidal@udec.cl

### **ABSTRACT**

Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from different paper mill wastewater was evaluated using a MBBR. During Phase I, the MBBR was fed with PGW effluent and the OLR was increased from 0.13 to 2.99 BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and in Phase II, was fed with TMP effluent and OLR was increased from 0.81 to 2.83 BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d. In both phases, the BOD<sub>5</sub>:N:P relationship was 100:5:1 and 100:1:0.3. The maximum percentage of cells accumulating PHA were 85.10% with 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and 88.11% with 0.81 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d for Phase I and Phase II, respectively. These results were obtained with relationship of 100:5:1.

### **INTRODUCTION**

Mechanical pulping processes such as Pressure Groundwood (PGW) and Thermomechanical Pulping (TMP) are used to manufacture paper. Wastewater generated from these processes are characterized by organic matter, measured by Chemical Organic Demand (COD), in concentrations ranging between 1000–5600 mg/L and Biological Oxygen Demand (BOD<sub>5</sub>) between 400–1200 mg/L [1, 2]. The Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) is one of the most used technologies for biological treatment of paper mill wastewater. In the MBBR, biomass grows attached to an inert carrier with high area/volume (350 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>), forming biofilms and decreasing

the probability of bulking [3–5]. Additionally, the MBBR works with Organic Loading Rates (OLR) between 2.5–3.0 kg COD/m<sup>3</sup>·d and Hydraulic Retention Time (HTR) of less than 2 hours. Under these operational conditions, BOD<sub>5</sub> removal efficiencies range between 85–99%, while COD ranges between 24–85% [3, 6, 7]. During operation of MBBR several tons of excess sludge are generated due to the BOD<sub>5</sub> removed with approximately 1.8–3.5 ton sludge/ton BOD<sub>5</sub> [2]. For this reason was given added value to the BOD<sub>5</sub> under specific treatment condition such as the enrichment of biosólidos by biosynthesis polyhydroxyalkanoate (PHA) [2, 8–10] PHAs are polyesters accumulated as intracellular granules from carbon and energy sources under limited nutrient (e.g. nitrogen and phosphorous) [11]. The main substrate for PHA biosynthesis is the presence of volatile fatty acids (VFA) such as acetic acid, propionic acid and butyric acid, among others [2, 8]. PHAs have physical and thermal characteristics that allow their use as bioplastics and are considered as a biodegradable alternative to conventional plastics [12]. Previous studies show that PHAs can feasibly be produced using pure cultures and substrates [13, 14]. PHA biosynthesis from mixed cultures and renewable carbon sources, such as BOD<sub>5</sub> obtained from industrial wastewater, emerge as a very important alternative [8–10]. Bengtsson et al. [8] by using paper mill wastewater and mixed cultures have reported a PHA biosynthesis of 48% for dry weight of sludge in an activated sludge system. In contrast, MBBR systems have reported a range between 85–95% of PHAs accumulating cells from kraft mill and paper mill effluent [2, 10]

The goal of this study is to evaluate the optimal operation strategy and BOD<sub>5</sub>:N:P relationship for PHA biosynthesis from mechanical pulping processes wastewaters such as PGW and TMP.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Raw wastewater**

Wastewaters were obtained after the primary treatment from a paper mill that processes *Pinus radiata* with PGW and TMP process. The wastewaters were stored in dark conditions at 4°C±1. PGW and TMP wastewater were used as influent for MBBR operation.

## Inoculum

The MBBR phase operating with PGW influent was inoculated in two stages: the sludge concentration was 5.91 g VSS/L and 7.40 g VSS/L for the first stage (1–74 d) and second stage (75–300 d), respectively. The MBBR phase operated with TMP influent was inoculated with 5.21 g VSS/L. The biomass used as inoculum was collected from an activated sludge treatment of municipal wastewater.

## MBBR operation

MBBR was operated as treatment for PGW and TMP influents. The MBBR (0.85 L) was filled with 200 inert polyethylene carriers AMB-type (Assisting Moving Bed) with density, specific surface area and porosity of 98 kg/m<sup>3</sup>, 850 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> and 85%, respectively. MBBR was operated in two phases. In Phase I was fed with PGW influent (300 d) and Phase II with TMP influent (167 d) at a temperature of 19.1±2.1°C and the dissolved oxygen concentration between 6.0–7.6 mg/L. Table 1 shows the MBBR system's operational conditions. The operation strategy in Phase I, was to increase OLR from 0.13 to 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d for two BOD<sub>5</sub>:N:P relationships. The first BOD<sub>5</sub>:N:P relationships of 100:5:1 was between 1 to 270 d and second BOD<sub>5</sub>:N:P relationship was 100:1:0.3 (271 to 300 d). During Phase II, the operation strategy was to increase OLR from 0.81 to 2.83 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d with BOD<sub>5</sub>:N:P relationships of 100:5:1 for OLR 0.81 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and 2.67 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and for OLR 2.83 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d the BOD<sub>5</sub>:N:P relationship corresponded to 100:1:0.3. MBBR reactor performance was evaluated for BOD<sub>5</sub>, COD and Total phenolic compound in the influent and effluent for the time period according to equation 1:

$$R(\%) = \frac{Q_i \cdot C_i - Q_o \cdot C_o}{Q_i \cdot C_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Where R (%) is the removal percentage; Q the flow rate (L/d); C the parameter concentration (mg/L); sub-index 'i' and 'o' correspond to the inflow and outflow, respectively. Also, the MBBR biomass was monitored by VSS, SVI and PHA accumulation [2, 10].

### **Analytical methods**

Physicochemical parameters as Chemical Oxygen Demand (COD), Biological Oxygen Demand (BOD<sub>5</sub>), Volatile Suspended Solids (VSS), Total Nitrogen (TN), Total Phosphorus (TP) and Sludge Volume Index (SVI) were measured following Standard Methods [15]. Total phenolic compounds were measured in liquid samples by spectrophotometry at wavelength of 215 nm (UV215) (quartz cuvettes 1 × 1 cm). Volatile Fatty Acids (VFA) were measured by gas chromatography (Hewlett Packard Model 5890 Series II, with Flame Ionization Detector: FID). Samples were membrane filtered through 0.45 µm pore size filters.

**Table 1.** MBBR operational conditions.

Parameter	Phase I					Phase II		
	100: 5: 1			100: 1: 0.3		100: 5: 1		100: 1: 0.3
BOD <sub>5</sub> :N:P								
Period (d)	1 – 99	100 – 179	180 – 225	226 – 270	271 – 300	1 – 73	74 – 109	110 – 170
HRT (h)	47.8 ± 0.77	12.20 ± 0.20	6.06 ± 0.05	3.06 ± 0.05	3.08 ± 0.01	48.16 ± 0.54	14.35 ± 0.79	14.07 ± 0.82
OLR (kg BOD <sub>5</sub> /m <sup>3</sup> d)	0.13	0.56	2.36	2.99	2.99	0.81	2.67	2.83
COD/ BOD <sub>5</sub> influent	1.54 ± 0.07	1.35 ± 0.14	1.55 ± 0.02	2.53 ± 0.00	2.48 ± 0.00	1.51 ± 0.22	1.63 ± 0.05	1.61 ± 0.01
COD/ BOD <sub>5</sub> effluent	2.22 ± 0.03	2.19 ± 0.01	3.24 ± 0.04	2.70 ± 0.04	1.24 ± 0.02	5.00 ± 0.2	4.76 ± 0.02	2.71 ± 0.07

The PHA biosynthesis was determined by flow cytometry (FACS Calibur system) and spectrofluorimetry. Prior to determination, the microbial sludge was deflocculated (tetrasodium pyrophosphate 0.01%, 2-dodecoxyethanol 0.01%) [16]. Samples were measured using optical density at 600 nm (UV-Vis Spectrophotometer, TU-1810 Split Beam) for standardization (0.8-1.0). The sludge samples were washed with distilled water and stained with Nile red (25  $\mu\text{mol/L}$  in DMSO). In the case of flow cytometry, the obtained results were based on the analysis of 30 000 events. Simultaneously, living and dead cells were counted to evaluate PHA biosynthesis [13] for 60 min at 25°C. For spectrofluorimetry, an excitation wavelength at 550 nm and emission wavelength between 530 and 650 nm of fluorescence intensity were used [9].

## RESULTS AND DISCUSSION

### Raw wastewater characteristics

Table 2 shows the physicochemical characterization of raw wastewater from the PGW and TMP pulping processes. PGW wastewater shows average values of organic matter of  $839.00 \pm 12.80$  mg/L and  $441.03 \pm 26.55$  mg/L for COD and  $\text{BOD}_5$ , respectively. Meanwhile, the TMP influent had a COD and  $\text{BOD}_5$  concentration of  $2,97 \pm 0.62$  mg/L and  $1,67 \pm 0.13$  mg/L, respectively. Additionally, total phenolic compounds are higher for TMP wastewater (8,89 mg/L) in comparison with PGW wastewater (1,75 mg/L). kraft mill wastewater reported total phenolic compounds ranging between 240 to 720 mg/L [2, 17, 18]. The  $\text{BOD}_5/\text{COD}$  ratio was 0.52 and 0.56 for PGW and TMP, indicating that both wastewaters are highly biodegradable. Previous studies in kraft mill wastewater have reported  $\text{BOD}_5/\text{COD}$  relationships between 0.20 to 0.33 due to the high concentration of recalcitrant compounds present as aromatic compounds with high molecular weight (>10,000 Daltons) [17, 18]. The concentration of nutrients of TN and TP obtained for PGW wastewater was 0.53 mg/L and 1.01 mg/L, respectively. Meanwhile TMP wastewater presented concentrations of 9.67 mg/L and 5.45 mg/L for TN and TP, respectively. The  $\text{BOD}_5:\text{N}:\text{P}$  relationship was lower than recommended by Diez et al. [19] for optimal organic matter removal corresponded to 100:5:1. Finally, volatile fatty acids were determined for PGW wastewater with concentrations of 34.83 mg/L, 35.01 mg/L and 16.16 mg/L for acetic acid, propionic acid and butyric acid, respectively.

**Table 2.** Physicochemical characterization of the raw wastewater.

Parameter	Unit	PGW Influent		TMP Influent	
		Range	Average <sup>(*)</sup>	Range	Average <sup>(*)</sup>
pH		6.33 – 7.67	6.83 ± 0.60	6.46 – 7.04	6.77 ± 0.22
COD	mg/L	825.21 – 857.40	839.00 ± 12.80	2,190 – 3,380	2,97 ± 620.00
BOD <sub>5</sub>	mg/L	405.02 – 484.11	441.03 ± 26.55	1,60 – 2,16	1,67 ± 395.00
Total nitrogen	mg/L	0.50 – 0.60	0.53 ± 0.05	9.52 – 10.00	9.76 ± 0.34
Total phosphate	mg/L	0.80 – 1.41	1.01 ± 0.21	5.40 – 5.50	5.45 ± 0.07
Total phenolic compounds	mg/L	803.40 – 2,36	1,75 ± 743.12	7,12 – 10,67	8,89 ± 1,16
Color	Abs	0.02 – 0.06	0.05 ± 0.01	0.50 – 0.51	0.51 ± 0.01
Acetic acid	mg/L	20.00 – 45.10	34.83 ± 9.72	ND	ND
Propionic acid	mg/L	30.21 – 40.40	35.01 ± 5.47	ND	ND
Butiric acid	mg/L	10.02 – 20.10	16.66 ± 5.16	ND	ND

\*: Values are the average of 6 determinations; PGW: Pressure Groundwood; TMP: Thermomechanical Pulping; ND: No Detected.

## PHA biosynthesis

PHA biosynthesis measured for different OLR and BOD<sub>5</sub>:N:P relationships shows in Figure 1. Gorenflo et al. [20] and Wu et al. [21] mentioned that there is a correlation between fluorescence intensity and PHA biosynthesis, because the first indicates the presence of PHA into the cells. PHA biosynthesis measured as fluorescence intensity observed for Phase I corresponded to average values of 64.14 Abs with OLR 2.36 Kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationship of 100:5:1. These values decreased to 42.99 Abs when the BOD<sub>5</sub>:N:P relationship decreased to 100:1:0.3. For Phase II, higher PHA biosynthesis corresponded to average values of 113.21 Abs was obtained with an OLR 0.81 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationship of 100:5:1. These values decreased to 30.15 Abs when OLR was increased to 2.83 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and the nutrients ratio decreased to 100:1:0.3 (Figure 1a). In contrast, Pozo et al. [9] with a decreasing C:N ratio in batch systems from 100:5:1 to 100:1:0.2 found an increase of PHAs biosynthesis from 66.90 to 271.00 Abs for the treatment of kraft mill effluents with inoculum of paper mill industries and kraft mill industries, respectively. On the other hand, Dias et al. [22] mentioned that PHA accumulation is related to operational conditions such as OLR, C:N ratio, pH, dissolved oxygen concentration and substrate concentration. The percentage of cells that accumulate PHAs under different OLR and BOD<sub>5</sub>:N:P relationships shows in Figure 1b. During Phase I, a maximum values of cells that accumulated PHAs was achieved under OLR 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient ratio of 100:5:1 corresponded to 85.10%. This percentage decreased to 78.75% when the BOD<sub>5</sub>:N:P relationship was reduced to 100:1:0.3. This behavior is due to flocculent sludge characteristics (35–135 mL/g SSV and 0.3–0.6 g BOD<sub>5</sub>/g SSV·d) [17]. In Phase II, maximum values of cells that accumulated PHAs were obtained under operation conditions of OLR 0.81 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationship of 100:5:1 with 88.11%. Similar values were obtained for OLR 2.67 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and 2.83 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d with maximum values of cells that accumulated PHAs of 85.09% and 89.41% for nutrient ratio of 100:5:1 and 100:1:0.3, respectively. The stability of the percentage of cells that accumulated PHAs in Phase II at different OLR was observed with respect to the SSV concentration (2.63–3.02 g SSV/L). Bengtsson et al. [8] found PHA production of 48% of dry weight of sludge, through three different stages (acidogenic fermentation, batch systems and activated sludge) under COD: N: P relationship of the 100: 0.030: 0.001, whilst Yan et al. [25] found that PHA biosynthesis between 17.0–43.1% of dry weight of sludge by batch experiments,

in both cases with paper mill wastewater. However, Pozo et al. [9] found a PHA biosynthesis of 25.7% and 30.4% under the relationship of BOD<sub>5</sub>: N: P of 100:5:1 and 100:1:0.2, respectively, in kraft mill wastewater.

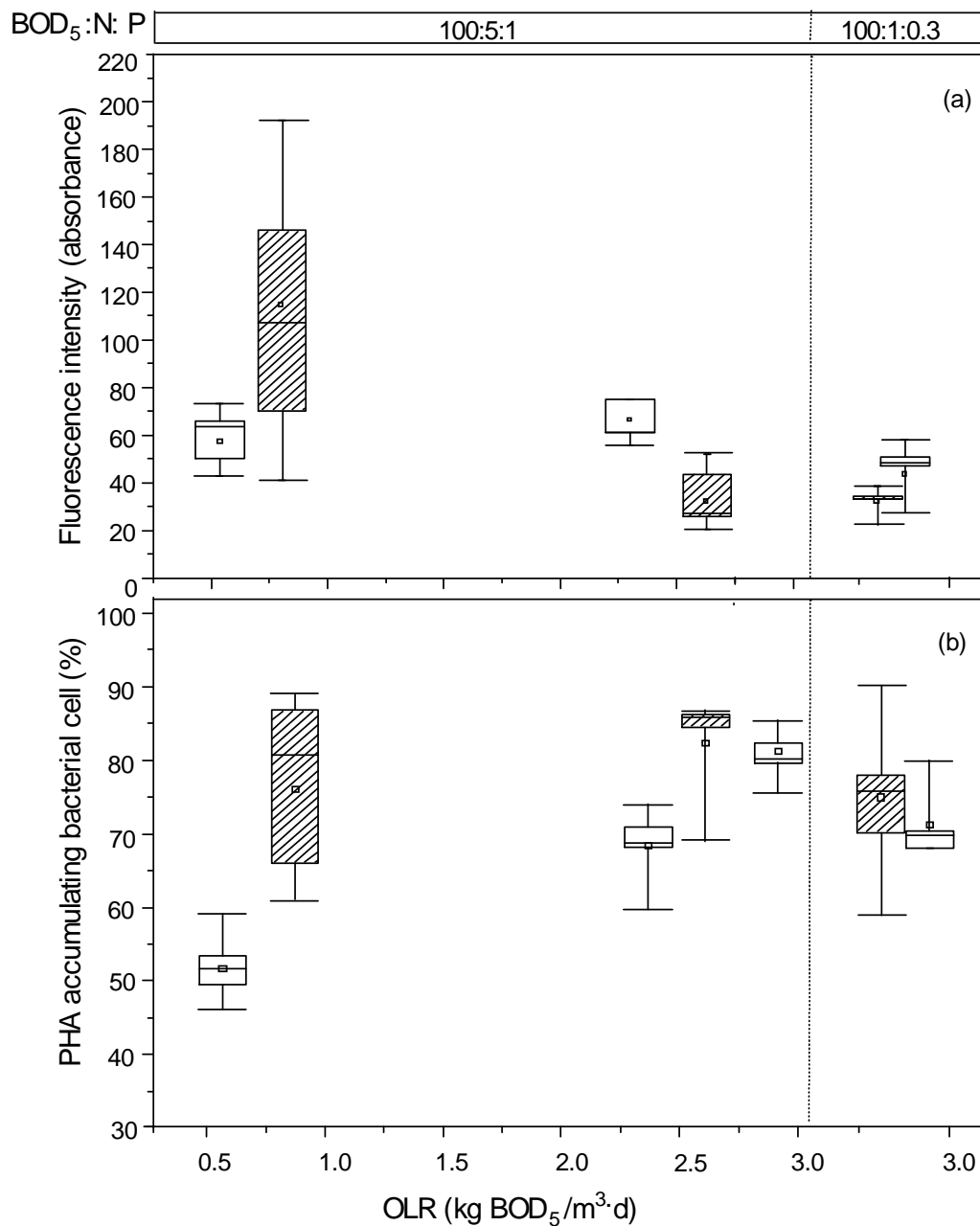
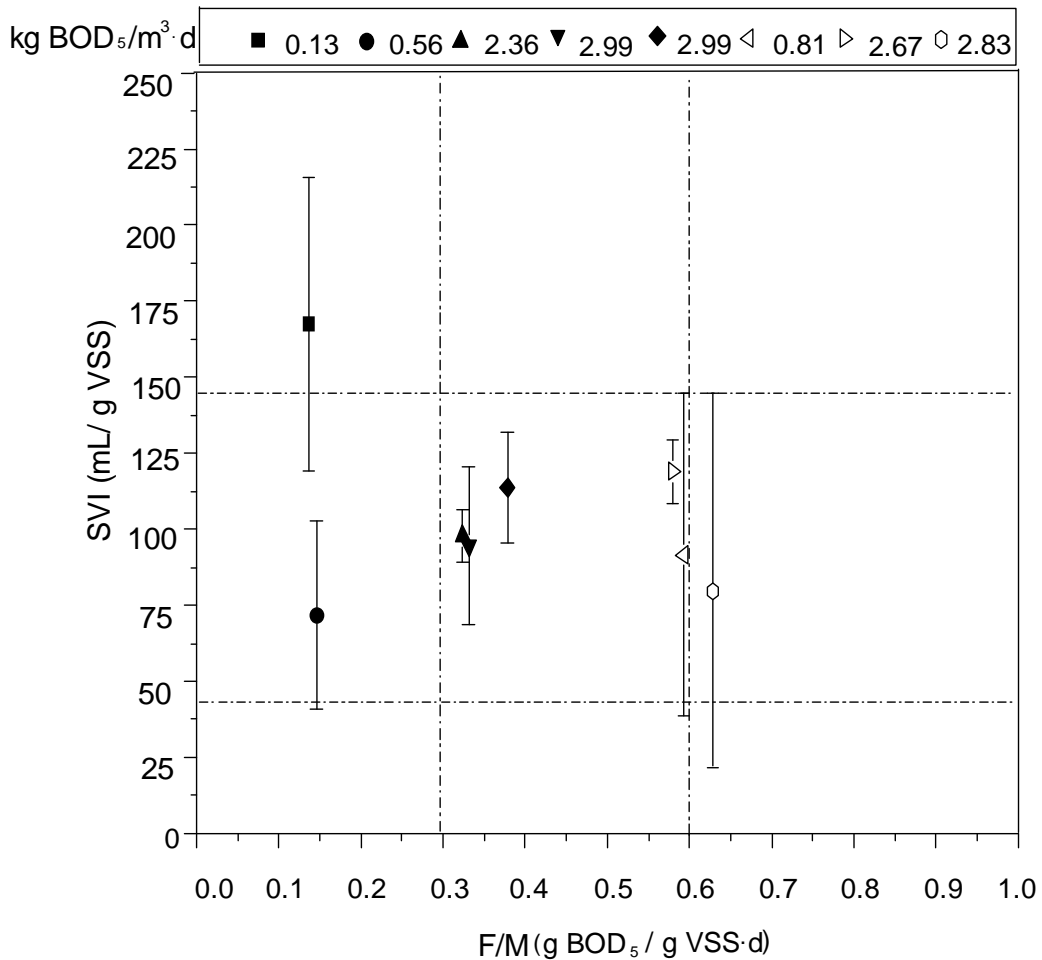


Figure 1. PHA biosynthesis during MBBR operation. Phase I ( ) and Phase II ( ).

## Biomass evolution

The Figure 2 shows biomass evolution for suspended and adhered biomass characterization inside the MBBR. SVI and F/M relationship were evaluated. The optimal sludge settler conditions are in the range of 35-135 mL/g VSS for SVI and F/M ranged between from 0.3 to 0.6 g BOD<sub>5</sub>/g VSS·d [17]. During Phase I, the sludge indicate low sediment with characteristics of sludge dispersed under OLR 0.13 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and 0.56 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d with averages values of 167.54 mL/g VSS and 71.72 mL/g VSS, respectively for SVI, both with 0.13–0.15 g BOD<sub>5</sub>/g VSS·d for F/M, with biomass loss in the MBBR. By increasing OLR from 2.36 to 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d, flocculent sludge characteristics were obtained with average values between 94.59–113.83 mL/g VSS and 0.32-0.37 g BOD<sub>5</sub>/g VSS·d for SVI and F/M, respectively. In Phase II, the sludge characteristics was flocculent under OLR 0.81 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and 2.67 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d. The values averages corresponded to 97.30–122.68 mL/g VSS and 0.57–0.59 g BOD<sub>5</sub>/g VSS·d. However, a proliferation of filamentous bacteria was observed when OLR increased to 2.83 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d with a SVI between 17.85–145.98 mL/g VSS and F/M of 0.69 g BOD<sub>5</sub>/g VSS·d, generating bulking in MBBR. PHA accumulation is associated with flocculent sludge characteristics [2, 8, 23]. Villamar et al. [17] obtained flocculent biomass characteristics with OLR 0.14–1.09 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationships of 100:5:1 and 100:1:1. On the other hand, Pozo et al. [9] obtained these optimal sludge characteristics at OLR 1.24 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationships of 100:5:1 and 100:1:0.2.

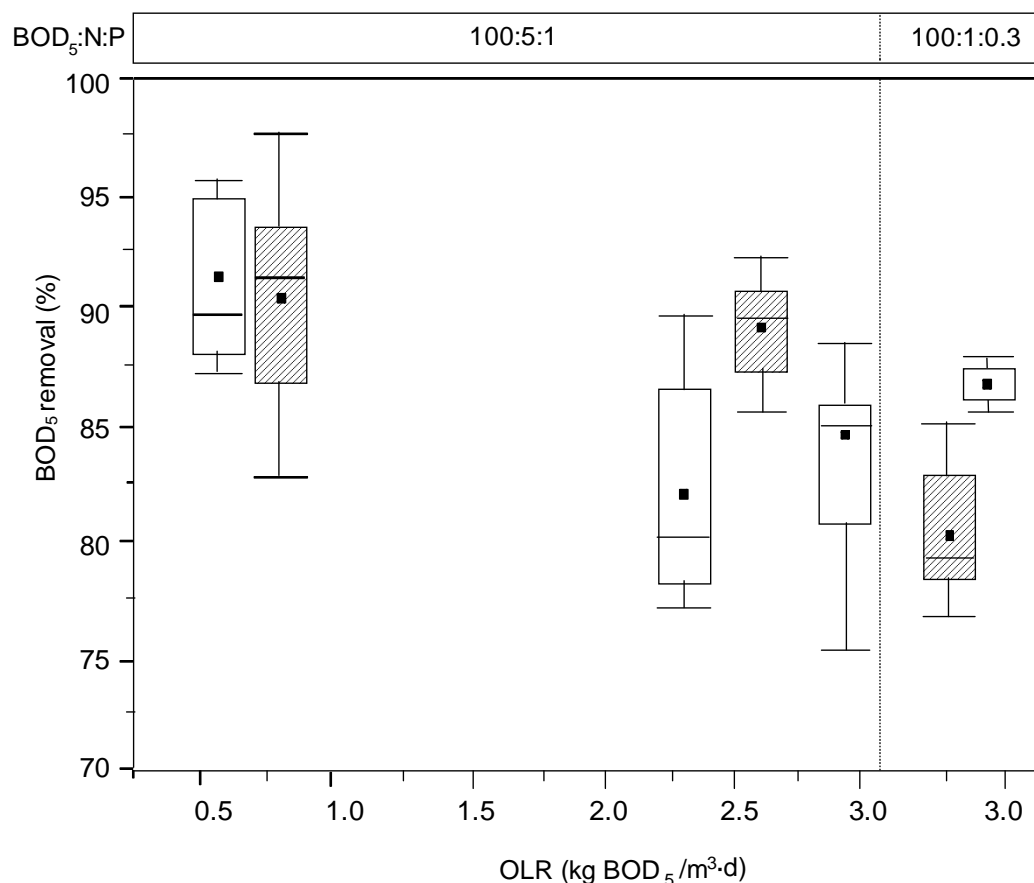


**Figure 2.** Biomass Behavior. SVI and F/M at OLR (BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d) 0.13 (■), 0.56 (●), 2.36(▲), 2.99 (▼), 2.99 (◆), 0.81 (<◁), 2.67 (>▷) and 2.83 (◇).

### Organic Matter Removal efficiency

Organic matter removal efficiencies for MBBR systems operating at different OLR and BOD<sub>5</sub>:N:P were evaluated. The Figure 3 shows BOD<sub>5</sub> removal efficiencies during Phase I and II. Phase I obtained a maximum BOD<sub>5</sub> efficiency of 95.60% under OLR 0.56 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationship of 100:5:1. Furthermore, BOD<sub>5</sub> efficiency decreased to 87.2% when OLR was increased to 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and the nutrient relationship decreased to 100:1:0.3. Meanwhile, during Phase II, maximum efficiencies of BOD<sub>5</sub> removal (97.10%) were obtained from OLR 0.81

kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and BOD<sub>5</sub>:N:P of 100:5:1. However, BOD<sub>5</sub> removal dropped to 84.6% when MBBR was operated at OLR 2.81 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationship of 100:1:0.3. Similar values of BOD<sub>5</sub> removal were obtained by Villamar et al. [17] and Chamorro et al. [18] in kraft mill wastewater treated in MBBR (75.01–95.05%) with 0.07–1.19 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d.



**Figure 3.** MBBR performance. BOD<sub>5</sub> removal. Phase I (□) and Phase II (▨).

Furthermore was evaluated the performance of COD and total phenolic compounds (Figure 4). During Phase I, the maximum COD removal corresponded to 64.92% at OLR 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and BOD<sub>5</sub>:N:P relationship of 100:1:0.3, while for total phenolic compounds was 41.01 (Figure 4a). In Phase II, maximum COD removal of 76.5% at OLR 0.81 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationship of 100:5:1 and total phenolic compounds removal was efficiencies of 52.77% at OLR 0.81 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationship 100:5:1. Pozo et al. [10] indicate that MBBR are

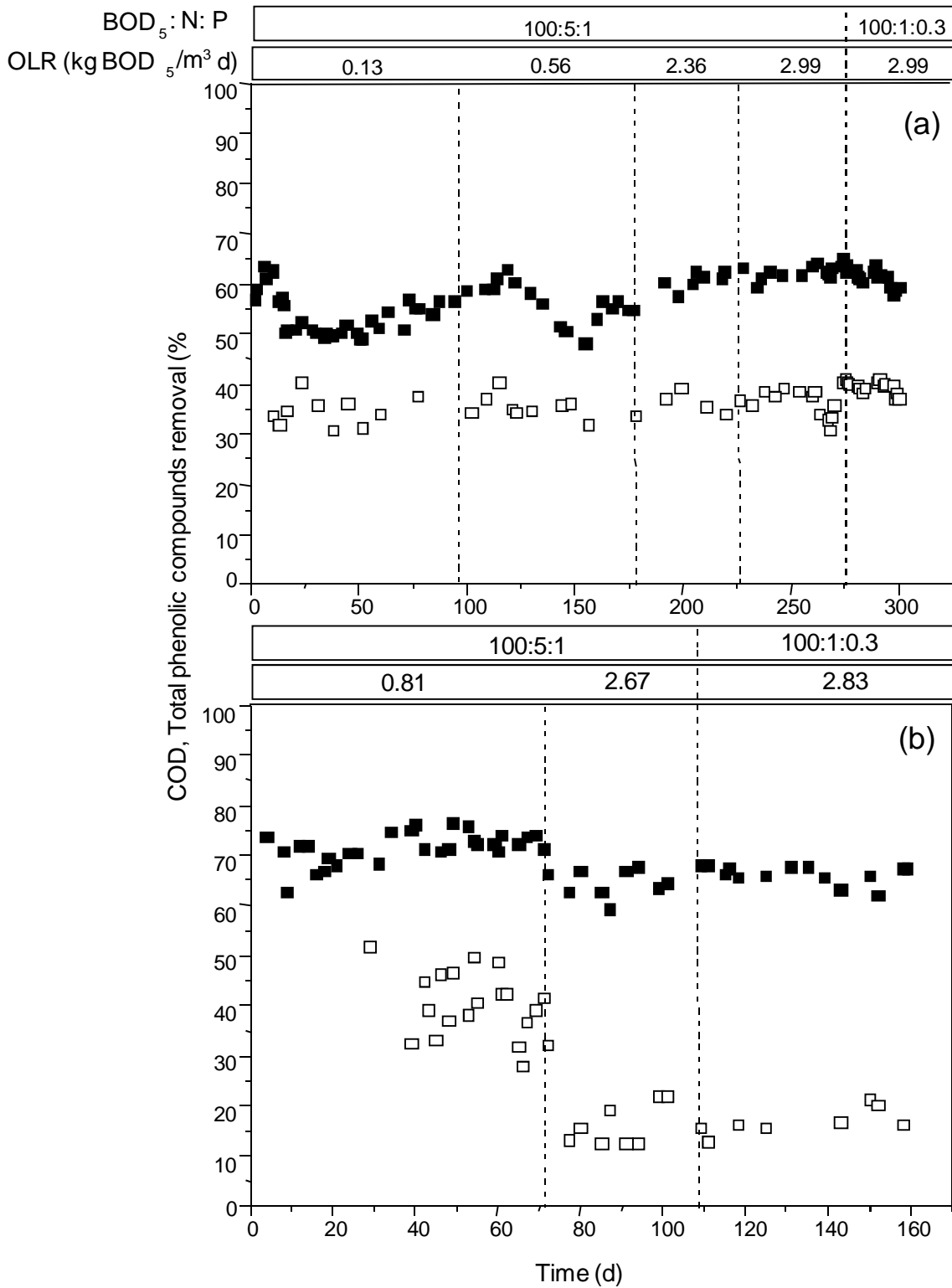
highly efficient for treatment for removing DQO with efficiencies between 24.00–82.00%. For the case of total phenolic compounds removal, Villamar et al. [17] achieved above 45.00%. Results agree with Odegaard [3] who found that COD removal efficiency decreases when HRT decreases. Furthermore, organic removal efficiency reduction is also due to the decrease in the BOD<sub>5</sub>:N:P relationship from 100:5:1 to 100:1:0.3. In this way, Diez et al. [19] found that a low nutrient ratio (100:2.5:0.5) affects the microorganism growth. Moreover, limited nutrient conditions promote bulking generation in the reactor. Several authors show that the origin of recalcitrant COD is due to the molecular weight fraction of lignin above 1000 Daltons [2, 17].

## **CONCLUSIONS**

For PGW influent, the maximum percentage of cells that accumulate PHA was 85.10% under OLR 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and BOD<sub>5</sub>:N:P relationship of 100:5:1. MBBR shows a maximum of BOD<sub>5</sub> removal of 95.60% under OLR 0.56 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and nutrient relationship of 100:5:1. On the other hand, similar results were obtained for TMP influent with 88.11% of cells that accumulate PHA and BOD<sub>5</sub> removal efficiencies of 97.10% under OLR 0.81 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>·d and BOD<sub>5</sub>:N:P relationship 100:5:1 as operation conditions. These results demonstrate that it is possible PHA biosynthesis in both effluents and without major differences between them, obtaining high efficiencies of organic matter removal.

## **Acknowledgements**

This work was supported by FONDECYT Grant No. 1120664.



**Figure 4.** MBBR performance. COD (■) and Total phenolic compounds (UV<sub>215nm</sub>) (□) removal.

## REFERENCES

- [1] Jarhen S.J., Rintala J.A., Odegaard, H., Aerobic moving bed biofilm reactor treating thermomechanical pulping whitewater under thermophilic conditions, *Water Res.*, 2002, 36, 1067–1075.
- [2] Jarpa M., Pozo G., Baeza R., Martínez M., Vidal, G., Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor, *J. Environ. Sci. Heal. A.*, 2012, 47, 1–8.
- [3] Odegaard H., Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm process, *Water Sci. Technol.*, 2006, 53, 17–33.
- [4] Runsten B., Eikebrokk B., Ulgenes Y., Lygren E., Design and operations of the kaldnes moving bed biofilm reactors, *Aquacult. Eng.*, 2006, 34, 322–331.
- [5] Plattes M., Fiorelli D., Guille S., Girard C., Henry E., Minette F., O’Nagy O., Schossler P., Modelling and dynamic simulation of a moving bed bioreactor using respirometry for the estimation of kinetic parameters, *Biochem. Eng. J.*, 2007, 33, 253–259. [6] Magnus E., Hoel H., Carlberg G.E., Treatment of an NSSC effluent in a biological high-efficiency compact reactor, *Tappi J.*, 2000, 83, 149–56. [7] Pokhrel D., Viraraghavan T., Treatment of pulp and paper mill wastewater- a review. *Sci. Total Environ.*, 2004, 333, 37–58.
- [8] Bengtsson S., Werker A., Christensson M., Welander T., Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater, *Bioresour. Technol.*, 2008, 99, 509–516.
- [9] Pozo G., Villamar A., Martínez M., Vidal G., Polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis from kraft mill wastewaters: biomass origin and C:N relationship influence, *Water Sci. Technol.*, 2011, 63, 449–455.
- [10] Pozo G., Villamar A., Martinez M., Vidal G., Effect of organic load and nutrient ratio on the operation stability of the moving bed bioreactor for kraft mil wastewater treatment and the incidence of polyhydroxyalkanoate biosynthesis, *Water Sci. Technol.*, 2012, 66, 370–376.

- [11] Chen G.Q., *Plastics from Bacteria, Natural Functions and Applications*, Springer, Steinbüchel, 2010.
- [12] Keshavarz T., Roy I., Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda, *Ecol. Ind. Microbiol.*, 2010, 13, 321–326.
- [13] Tobella L.M., Bunster M., Pooley A., Becerra J., Godoy F., Martínez M.A., Biosynthesis of poly-beta-hydroxyalkanoates by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Wautersia* sp PZK cultured in cellulose pulp mill effluents containing 2,4,6-trichlorophenol, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 2005, 32, 397–401.
- [14] Pavez P., Castillo J.L., Gonzalez C., Martinez M., Poly- $\beta$ -Hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*, *Curr. Microbiol.*, 2009, 59, 636–640.
- [15] American Public Health Association (APHA), *Standard methods for Examination of Water and Wastewater*, Washington, 1985.
- [16] Herbert R., *Methods for enumeration and determination microorganism biomass in natural environments*, London, 1990.
- [17] Villamar C.A., Jarpa M., Decap J., Vidal G., Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucaliptus globulus* as raw material, *Water Sci. Technol.*, 2009, 59, 507–514.
- [18] Chamorro S., Hernández V., Monsalvez E., Becerra J., Mondaca M. A., Piña B., Vidal G., Detection of estrogenic activity from kraft mill effluents by the yeast estrogen screen, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2010, 84, 165–169.
- [19] Diez M.C., Castillo G., Aguilar L., Vidal G., Mora M.L., Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus radiata* kraft mill wastewater, *Bioresour. Technol.*, 2002, 83, 131–138.
- [20] Gorenflo V., Steinbüchel A., Marose S., Rieseberg M., Scheper T., Quantification of bacteria polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51, 765–772.

- [21] Wu H., Sheu D., Lee C., Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry., *J. Microbiol. Meth.*, 2003, 53, 131–135.
- [22] Dias J., Lemos P., Serafim L., Oliveira C., Eiroa M., Albuquerque M., Ramos A., Oliveira R., Reis M., Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product, *Macromol. Biosci.*, 2006, 6, 885–906.
- [23] Beccari M., Majone M., Massanisso P., Ramador R., A bulking sludge with high storage response selected under intermittent feeding, *Water Res.*, 1998, 32, 3403–3413.
- [24] Wen Q., Chen Z., Tian T., Chen W., Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated6 sludge, *J. Environ. Sci.*, 2010, 22(10), 1602–1607.
- [25] Yan S., Surampalli B., Tyagi R. D., Surampalli R.Y., Waste activated sludge from bioplastics-batch process, *Pract. Period. Hazard Toxic Radioact. Waste Manage.*, 2008, 12, 239–247.

## CAPITULO VII

# CHRONIC TOXICITY CONTAINED IN KRAFT MILL EFFLUENTS TREATED BY COMBINED BIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL TREATMENTS

**Jarpa, M.**, López, D., Rozas, O., Baeza, C., Mansilla, H.D. and Vidal, G. (2014). Chronic Toxicity Contained in kraft Mill Effluents treated by Combined Biological and Physico-Chemical Treatments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, (In redaction).

---

# CHRONIC TOXICITY CONTAINED IN KRAFT MILL EFFLUENTS TREATED BY COMBINED BIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL TREATMENTS

Jarpa, M<sup>1</sup>., López, D<sup>1</sup>., Rozas, O<sup>2</sup>., Baeza, C<sup>1</sup>., Mansilla, H.D<sup>2</sup>. and Vidal, G<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Environmental Science Center EULA-Chile, University of Concepción, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, P. O. Box 160IC, Concepción, Chile

\*Corresponding author: glvidal@udec.cl

## ABSTRACT

kraft mill effluents contain chronic toxicity due to the active compounds such as phytosterols. Biological or physico-chemical treatments maybe reduce effluent's chronic toxicity. The goal of this study was to evaluate the chronic toxicity in influent, effluent obtained by biological, physico-chemical and chemical treatments and physico-chemical sludge through bioassays with *Daphnia magna*. Chronic toxicity determined by Allometric Growth Rate (AGR%) was observed in influent, biological effluent and chemical precipitation sludge with reductions of AGR ranged 2.19–5.88%, 6.13–11.57% and 3.40%, respectively. While, chronic toxicity in physic-chemical and chemical effluent was not observed.

**KEY WORDS** chronic toxicity, kraft mill effluents, biological and physico-chemical treatments

## 1. INTRODUCTION

kraft mill effluents have chronic toxicity after aerobic biological treatment systems (Lopez *et al.* 2011). Biological treatment systems main objective is to remove biodegradable organic matter measured as Biological Oxygen Demand (BOD<sub>5</sub>) with efficiencies ranged 73.5–99.2% (Thompson *et al.* 2001), leaving a remaining recalcitrant organic matter measured as Chemical Oxygen Demand (COD) 30-50% (Villamar *et al.* 2009). Remaining recalcitrant compounds contained in effluents discharge, such as phytosterols (0.01–3.40 mg L<sup>-1</sup>), has been identified such as active

compounds and potential sources of chronic toxicity expressed as type estrogenic activity in exposed organisms (Belmonte *et al.* 2006, Xavier *et al.* 2009). Previous studies have reported removal of estrogenic activity between 80–83% and between 41–99% for phytosterols (Xavier *et al.* 2009, Chamorro *et al.* 2010a). The estrogenic effects of these effluents have been evaluated in invertebrates as *Daphnia magna*, finding effects on growth and reproduction (Olmstead and LeBlanc 2000, Xavier *et al.* 2005, Lopez *et al.* 2011) and by Yeast Estrogen Assay (YES assay) (Chamorro *et al.* 2010b). Through YES assay was observed estrogenic activity values ranged 0.12-0.41 ng L<sup>-1</sup>, expressed as equivalent estrogenic (EEqs) of 17- $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2 EEqs) (Chamorro *et al.* 2010a, b).

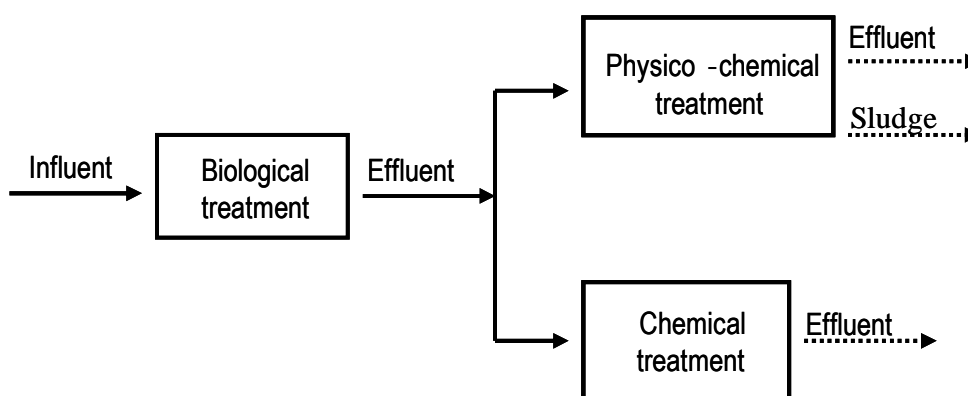
Due to estrogenic activity in kraft mill effluents is necessary to evaluate alternative treatments such as physico-chemical treatment as chemical precipitation and chemical treatment as advanced oxidation processes (AOPs). This technologies used in a tertiary stage can be an alternative for remaining chronic toxicity from derived recalcitrant compounds.

Chemical precipitation is based on the addition of chemical coagulants such as aluminum salts, iron salts or polymers to achieve adherence of particles followed by a settling step, obtaining high COD removal efficiencies (96%) (Simoncic and Vnucec 2012). Meanwhile AOPs are based on the generation of hydroxyl radicals (OH $\cdot$ ) that produce oxidation on the recalcitrant compound obtaining high COD removal efficiencies up 80% (Catalkaya and Kargi, 2008). As mentioned above the purpose of this work is to evaluate chronic toxicity contained in kraft mill effluents treated by combined systems of biological, chemical precipitation and oxidative treatment.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Wastewater samples were obtained before (influent) and after biological treatment (biological effluent) and two effluents obtained from physico-chemical treatment (precipitation by Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) and chemical treatment (oxidative process by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of kraft mill effluents (Figure 1). Biological treatment was performed according to Villamar *et al.* (2009). On the other hand, biological effluent was treated under physico-chemical and chemical treatments. Coagulation-flocculation treatment was performed in test jar (1 L) using of Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (dose: 983.6  $\pm$  0.8 mg L<sup>-1</sup>; pH: 5.2  $\pm$  0.01;

temperature:  $20.2 \pm 1.1$  °C). Chemical treatment was performed with UV (dose of  $500 \mu\text{W cm}^{-2}$ ; four mercury UV-C lamps Philips, 8 Watt) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Concentration:  $51.40 \pm 0.03$  mM; pH:  $5.9 \pm 0.03$ ; temperature:  $25.4 \pm 1.7$  °C). Effluents and sludge from different process were stored in the dark at  $4.0 \pm 1.0$  °C of temperature for chronic toxicity determination.



**Figure 1.** Scheme of the different influent, effluents and sludge evaluated in this study.

Subsequently, chronic toxicity was evaluated in each of the effluents samples through of female *D. magna* (neonates <24 h old) in 21-day exposure period (USEPA, 1994). The pH of samples were adjusted between 7.0–7.6 before the bioassays. The range of kraft mill effluents concentration for chronic toxicity studies was established after acute toxicity testing (data not show) to minimize test organism mortality. For the chronic toxicity assay were considering for concentration of influent (12.5%, 25%, 50% and 75%), biological effluent treatment (25%, 50% and 100%) and physico-chemical and chemical treatment (12.5%, 25%, 50% and 75%). On the other hand, bioassays with physico-chemical sludge obtained from elutriated sludge (according to USEPA 1994) were done. Each bioassay consist of ten replicates of 70 mL (containing one organism) was established for each concentration, including control. Bioassays were maintained at  $20.0 \pm 1.1$ °C with 16 h light: 8 h dark photoperiod. They were fed three times weekly with

unicellular green algae *Selenastrum capricornatum* and supplemented with a suspension baker's yeast, trout chow and alfalfa with an equivalent carbon content of 7.2 mg C L<sup>-1</sup> on Monday and Wednesday, and 10.8 mg C L<sup>-1</sup> on Friday. During the bioassays the growth and reproduction was evaluated (Olmstead and LeBlanc 2002) by determining the variation in the proportion of body length with body width (abdominal cavity) expressed as the percentage of Allometric Growth Rate (% AGR), calculated according to Lopez *et al.* (2011), as show in Equation 1.

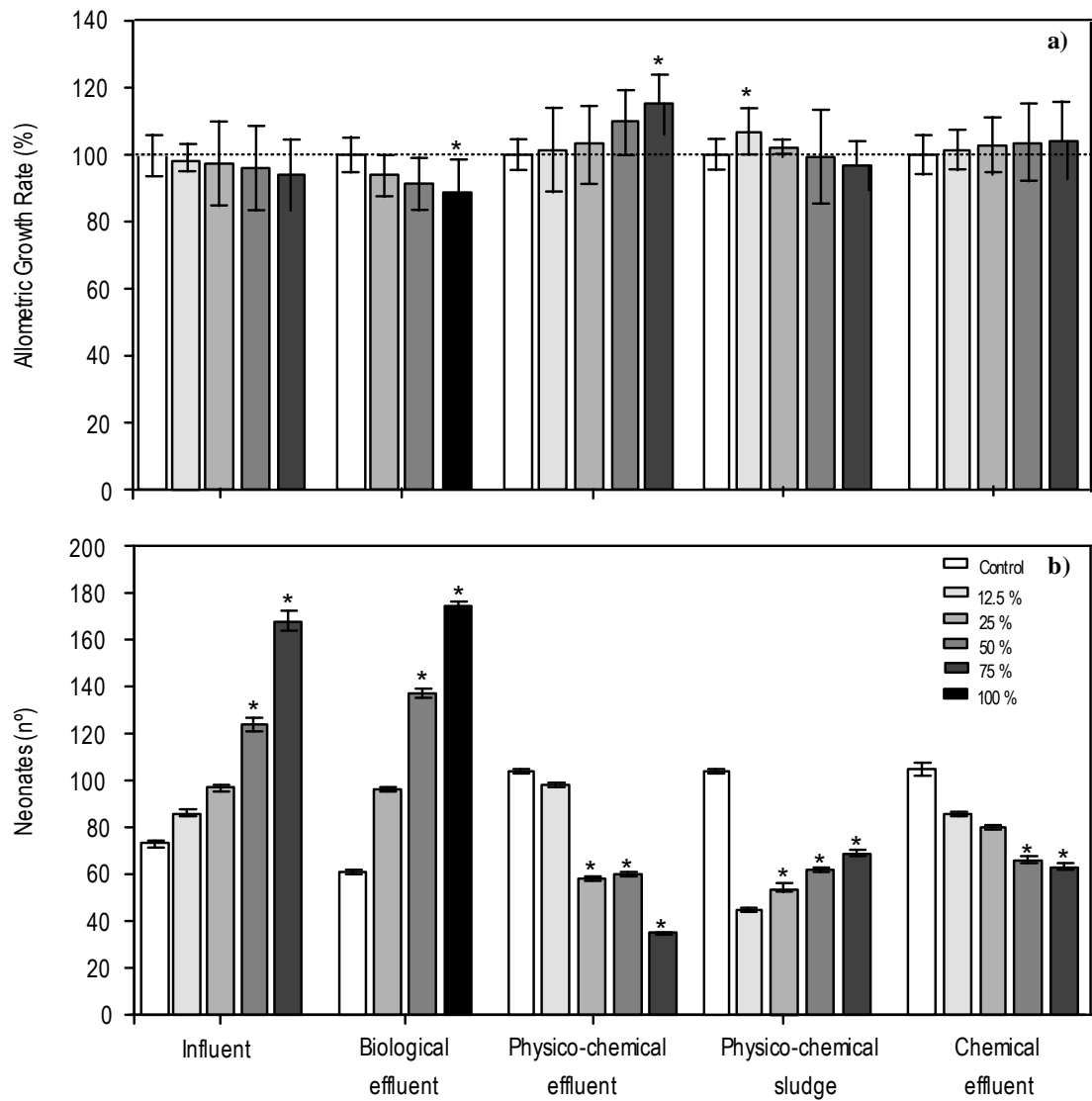
$$\text{AGR (\%)} = \left[ \left( \frac{\text{Body Length}}{\text{Body Width}} \right) - 1 \right] \cdot 100 \quad (1)$$

Data obtained were processed statistically by checking normality ( $\chi^2$  test) and homogeneity of variances (Bartlett's test). The significance of differences in reproductive parameters and allometric growth was determined by ANOVA followed by Tukey's test, all with TOXSTAT statistical package (USEPA 1994).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows the chronic toxicity of different effluents and sludge on *D. magna* by determining % AGR and *D. magna*'s neonates production. Chronic toxicity was observed in influent, biological effluent and chemical precipitation sludge with reductions of AGR ranged 2.19–5.88%, 6.13–11.57% with significant differences with respect to control only for the concentration 100% for biological treatment effluent ( $p < 0.05$ ). On the other hand, physico-chemical sludge, obtained reductions in %AGR of 0.60% and 3.40% for concentrations of 50% and 75%, respectively (Figure 2a). These results show presence of compounds with chronic toxicity contained in sludge and effluent because increased body width with respect to the body length in *D. magna* (Olmstead and Leblanc 2000). López *et al.* (2011) studied different combinations of kraft pulp effluents (*P. radiata*, mixture *P. radiata* 50%: 50% *Eucalyptus globulus*) with added active compounds ( $\beta$ -sitosterol, stigmasterol), obtained reductions of %AGR of 17% and 27% for the day 14 and 21. On

the other hand, Xavier *et al.* (2005) show increments of body length and body width of 20% and 2%, when *D. magna* were exposed to kraft mill effluent concentrations of 10% and 20%, respectively. Figure 2b corroborates chronic toxicity found in this study through the number of production of neonates during the bioassays with *D.magna*. The number of neonates increased for the influent and biological effluent and physic-chemical sludge. The highest number of neonates corresponded to 168, 174 and 69, respectively and all at concentration of 75% ( $p < 0.05$ ). On the contrary, chronic toxicity was reduced in the physic-chemical and chemical effluent, expressed with the lowest neonates numbers 35 and 65, respectively, both at effluent dilution of 75% ( $p < 0.05$ ). These results could be associated with the permanence of active compounds such as phytosterols where chronic toxicity has been demonstrated by Xavier *et al.* (2009), Lopez *et al.* (2011). Chamorro *et al.* (2010a, b) mentioned that the main compounds with chronic toxicity found in kraft mill effluents are  $\beta$ -sitosterol (0.16–0.33 mg L<sup>-1</sup>), stigmasterol (0.02–0.07 mg L<sup>-1</sup>) and campesterol (0.06 mg L<sup>-1</sup>).



**Figure 2.** Evaluation of chronic toxicity in different effluents by *D. magna*. a) Allometric Growth Rate; b) Neonates.

Table 1 shows chronic toxicity based on reproductive behavior on *D. magna* by the number of broods per adult for different effluent and sludge of this study. The highest number of broods (per adult) were for influent (16.80) and biological effluent (17.40) ( $p < 0.05$ ).

**Table 1.** Brooding time of *D. magna* exposed to different influent, effluent and sludge of this study.

Treatment	Concentration (%)	First brood per adult (d)	Broods per adult (n°)
Influent	Control	8.20 ± 1.03	8.11 ± 1.36
	12.5	9.22 ± 0.87	8.6 ± 1.26
	25	9.88 ± 1.31*	9.70 ± 1.35
	50	9.33 ± 1.05	12.40 ± 2.59*
	75	9.11 ± 1.22	16.80 ± 4.48*
Biological Effluent	Control	8.50 ± 0.84	6.10 ± 0.99
	25	8.66 ± 0.67	9.60 ± 0.84*
	50	8.80 ± 0.78	13.70 ± 1.70*
Physico-chemical Effluent	100	8.70 ± 0.67	17.40 ± 1.89*
	Control	9.40 ± 1.17	10.55 ± 0.88
	12.5	9.50 ± 1.08	9.80 ± 1.31
	25	9.42 ± 1.17	5.81 ± 0.63*
Physico-chemical Sludge	50	9.51 ± 1.17	6.01 ± 0.81*
	75	9.50 ± 1.03	3.53 ± 0.52*
	Control	9.40 ± 1.17	10.55 ± 0.88
	12.5	9.10 ± 0.99	4.51 ± 0.84
Chemical Effluent	25	9.22 ± 0.63	5.42 ± 0.69*
	50	9.41 ± 0.96	6.24 ± 0.63*
	75	9.52 ± 1.43	6.91 ± 1.10*
	Control	8.50 ± 0.84	11.66 ± 2.64
Chemical Effluent	12.5	8.20 ± 0.91	8.6 ± 0.84
	25	8.20 ± 0.63	8.01 ± 0.94*
	50	8.11 ± 0.31	6.61 ± 1.17*
	75	8.03 ± 0.66	6.50 ± 1.33*

The days average of the first brood per adult were ranged between 9.11–9.88 d ( $p < 0.05$ ) and 8.66–8.80 d for influent and biological effluent, respectively ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the physico-

chemical sludge increase in the number broods per adult from 4.51 to 6.91, meanwhile chemical effluent shows a significant reduction in the broods production per adult from 9.80 to 3.53 ( $p < 0.05$ ) and 8.60 to 6.50 ( $p < 0.05$ ), respectively. Lopez *et al.* (2011) obtained day average of the first brood per adult in for kraft mill effluents of 7.4 and number of broods per adult of 5.6 and USEPA (1994) recommends as optimum first brood per adult bellow 12 day.

#### **4. CONCLUSIONS**

In conclusion, this study shows that influent, effluent biological treatment and physico-chemical sludge have chronic toxicity measured as % AGR in *D. magna* and also by the increasing production of neonates, with reductions of AGR ranged 2.19–5.88%, 6.13–11.57% and 3.40%, respectively. However, chronic toxicity was absent in the physico-chemical effluent and chemical effluent.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by FONDECYT Grant No. 1120664, Grant No. 24100082 CONICYT AT.

#### **REFERENCES**

- American Public Health Association (APHA) In Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Ed, Washington DC, 1998, pp. 1325
- Belmonte M, Xavier C, Decap J, Martinez M, Sierra-Alvarez R, Vidal G (2006) Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass ptation ada.J Hazard Mater 135: 256 – 263
- Chamorro S, Xavier C, Vidal G (2005) Behaviour of aromatic compounds contained in the kraft mill effluents measurements by UV-VIS. Biotechnol Progr 21: 1567-1571

- Chamorro S, Pozo G, Jarpa M, Hernandez V, Becerra J, Vidal G (2010a) Monitoring endocrine activity in kraft mill effluent Treated by aerobic moving bed bioreactor system. *Water Sci Technol* 62 (1): 154 to 161
- Chamorro S, Hernández V, Monsalvez E, Becerra J, Mondaca MA, Piña B, Vidal G (2010b) Detection of estrogenic activity from kraft mill effluents by yeast estrogen screen. *Bull Environ Contam Toxicol* 84: 165-169
- Fernández M, Ikonomu M, Buchanan I (2007) An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewater. *Sci Total Environ* 373: 250-269
- Catalkaya E, Kargi F (2008) Advanced oxidation treatment of pulp mill effluent for TOC and toxicity removals. *J Environ Manage* 87: 396-404
- López D, Chamorro S, Silva J, Bay-Schmith, Vidal G (2011) Chronic effects of *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* kraft mill effluents on *Daphnia magna* and phytosterols. *Toxicol Environ Contam Bull* 87: 633-637
- Olmstead A, LeBlanc G (2000) Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex Characteristics of *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 19: 2107-2113
- Villamar C, Jarpa M, Decap J, Vidal G (2009) Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* as raw material. *Water Sci Technol* 59: 507-514
- Simonic M, Vnucec D (2012) Coagulation and UF treatment of pulp and paper mill wastewater in comparison. *Cent Eur J Chem* 10 (1): 127 -136
- Thompson G, Swain J, Forster M (2001) The Treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresour Technol* 77: 275 286
- Xavier C, Chamorro S, Vidal, G (2005) Chronic effects of kraft mill effluents and endocrine active chemical on *Daphnia magna*. *Bull Environ Contam Toxicol* 75:670-676
- Xavier C, Mosquera-Corral A, Becerra J, Hernandez V, Vidal G (2009) Activated sludge versus aerated lagoon treatment of kraft mill effluents Containing  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol. *J Environ Sci Health, Part A* 44: 327-335

USEPA (1994) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and Receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-91/002. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC

USEPA (1994). Methods for measuring the toxicity of sediment associated contaminants with estuarine and marine amphipods EPA-600/R-94/025. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

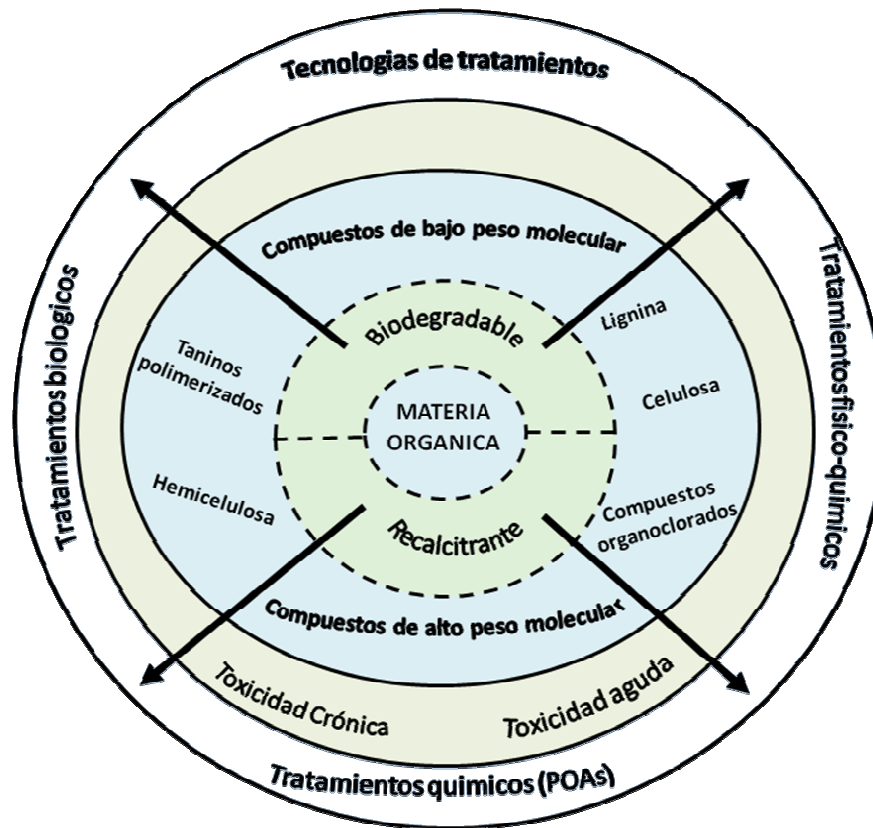
## **CAPITULO VIII**

## **DISCUSION**

El objetivo de esta tesis es evaluar la eliminación de la toxicidad atribuido a la presencia de materia orgánica recalcitrante presente en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel mediante la implementación de tratamientos secundarios como MBBR y tratamientos terciarios físico-químicos como precipitación química y químicos o POAs (UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton).

La Figura 1 muestra una esquematización del tipo de materia orgánica, toxicidad y la potencial aplicación de una tecnología de tratamiento, tanto para la materia orgánica como para la toxicidad presente en este tipo de efluentes. Los efluentes de la industria de celulosa kraft y papel poseen compuestos que provienen de las diferentes materias primas que ingresan a los procesos productivos en cuestión, o bien son compuestos generados por la acción de las operaciones unitarias y/o químicos de dichos procesos productivos (Oller *et al.*, 2011). Estos efluentes, se caracterizan por su alto contenido de materia orgánica del tipo biodegradable medida como DBO<sub>5</sub> en la cual están contenidos compuestos tales como carbohidratos y ácidos orgánicos, entre otros (Vidal *et al.*, 2001) y del tipo recalcitrante medida como DQO, en cuya fracción están contenidos compuestos activos capaces de generar toxicidad aguda o toxicidad crónica, esto a pesar de encontrarse en bajas concentraciones en el orden de µg/ L (Leiviskä *et al.*, 2009; López *et al.*, 2011; Chamorro *et al.*, 2013). Entre los compuestos activos a los cuales se les atribuye toxicidad aguda, se mencionan los compuestos organoclorados y algunos extractivos de la madera como ácidos resinicos (ácido dehidroabietico, ácido pimárico, ácido isopimárico y ácido sandaracopimárico) y ácidos grasos (ácido linoleico), mientras que el toxicidad crónica ha sido atribuido al grupo de los fitoesteroles también pertenecientes a los extractivos de la madera (Xavier *et al.*, 2005; Belmonte *et al.*, 2006; López *et al.*, 2011; Chamorro *et al.*, 2013). Además en la fracción recalcitrante, se encuentran ligninas, taninos y residuos de lignina como fenoles totales, los cuales no poseen toxicidad, pero si contribuyen al color de estos efluentes y a la generación de clorofenoles (Yeber *et al.*, 2000). Por lo antes mencionado y con el propósito de disminuir la carga de contaminantes que poseen estos efluentes y además para el cumplimiento de la normativa vigente, esta industria ha implementado tratamientos físico-químicos, tratamientos biológicos y tratamientos integrados de estos (Ahmad *et al.*, 2007). El objetivo principal del tratamiento físico-químico es la eliminación de sólidos suspendidos (80 – 90 %), además de una mínima eliminación de DBO<sub>5</sub> y DQO. En el caso de los tratamientos biológicos permiten la eliminación de la materia orgánica biodegradable y eliminación de toxicidad aguda

mediante tecnologías convencionales como lagunas aireadas o lodos activados y sistemas de biomasa adherida como MBBR, sin embargo, persisten compuestos recalcitrantes después del tratamiento (Thompson *et al.*, 2001; Leiviskä *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2010; Ciputra *et al.*, 2010). Estudios previos mencionan que los sistemas biológicos permiten la eliminación de la mayoría de los extractivos de la madera, sin embargo, no es realmente claro si sufren procesos de degradación, transformación y/o adsorción en el lodo biológico por sus características físico-químicas como por ejemplo los valores de  $\log K_{ow}$  mayores a 4 y mayores a 6 para ácidos resinicos y fitoesteroles, respectivamente (Hewitt *et al.*, 2000; Gúzman *et al.*, 2007). El resto de los extractivos de la madera son descargados al cuerpo de agua receptor, encontrándolos incluso disponibles en los sedimentos cercanos a estos vertidos (Orrego *et al.*, 2005; Orrego *et al.*, 2006; Leiviskä *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2013). Lo antes mencionado, indicaría que los sistemas biológicos no son eficientes en eliminación de toxicidad crónica, por lo cual se plantean los POAs como una potencial tecnología de tratamiento. Los POAs implican la generación de intermedios altamente reactivos como son los radicales  $OH^\bullet$  con un potencial de reducción de 2,8 V, el cual reacciona con la mayoría de compuestos orgánicos logrando una completa mineralización de un amplio rango de compuestos orgánicos, incluyendo por ejemplo compuestos aromáticos y fenoles, entre otros (Lucas *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Esquemización del tipo de materia orgánica, toxicidad y la potencial aplicación de una tecnología de tratamiento en efluentes de la industria de celulosa kraft y papel.

### 1. La materia orgánica recalcitrante y su influencia en el toxicidad de los efluentes de la industria de celulosa kraft y papel

- **Procedencia de la materia orgánica recalcitrante y sus efectos en los ecosistemas.** La principal materia prima de la industria de celulosa kraft y papel es el *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus* o *nitens* en Chile (González & Zaror, 2000). Los compuestos principales de esta materia prima generados son celulosa como producto principal. Sin embargo, estos efluentes pueden ser caracterizados principalmente por presencia de materia orgánica medida como DBO<sub>5</sub> y DQO, generando por 1 Ton de celulosa como producto del proceso productivo compuestos lignínicos entre 215 – 225 Kg/ ton ADT, ácidos resinicos (0,4– 11 g/ ton ADT), color (100 Kg/ ton ADT), AOX (0,6 – 7,0 Kg/ ton ADT) y toxicidad, entre otros (González & Zaror, 2000; Lacorte *et al.*,

2006; Kostamo *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2005; Kansal *et al.*, 2008). Tanto la lignina, como algunos compuestos extractivos de la madera, son estructuras químicas muy estables y resistentes al ataque biológico (bacteriano) y por este motivo son denominados “compuestos recalcitrantes”. También hay compuestos recalcitrantes que son producidos durante los procesos químicos implementados en la industria de celulosa kraft y papel, es así que aun utilizando la mejor tecnología disponible (MTD), pueden encontrarse los compuestos AOX (Adsorbable Organic Halogen) de baja sustitución de cloro, pero que podrían ser recalcitrantes, generando algún grado toxicidad a los ecosistemas.

Esta industria, con el propósito de minimizar los efectos de estos vertidos, ha implementado tanto en el proceso productivo como en el tratamiento de sus efluentes tecnologías de tratamientos, aumentando de este modo su compromiso con el cuidado del medio ambiente (Ahmad *et al.*, 2007). Esto último, ha permitido eliminar la toxicidad aguda (Annachhatre & Gheewala, 1996; Belmonte *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008). Sin embargo, pese a lo antes mencionado estudios previos evidencian toxicidad crónica atribuida al grupo de los fitoesteroides (Chamorro *et al.*, 2010; López *et al.*, 2011). Estudios previos corroboran la existencia de compuestos con toxicidad en estos efluentes una vez tratados biológicamente, encontrándolos en concentraciones entre 0,16 – 0,33 mg/ L, 0,02 – 0,07 mg/ L y 0,06 mg/ L para  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y campesterol, respectivamente (Xavier *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2010; Chamorro *et al.*, 2013). Es por esto que en organismos expuestos a estos efluentes, se les ha detectado efectos del tipo de disrupción endocrina los cuales han sido estudiados en peces, principalmente. Entre los efectos observados, se mencionan la disminución del tamaño de gónadas, disminución de los niveles de esteroides sexuales en plasma, retraso madurez sexual, alteración de la expresión de las características secundarias y disminución de la producción de huevos, entre otros (Orrego *et al.*, 2005; Orrego *et al.*, 2006; Hewitt *et al.*, 2008; Chiang *et al.*, 2010).

**-Influencia de las tecnologías de tratamiento de efluentes en la materia orgánica y toxicidad.** Una forma de evaluar la modificación de materia orgánica recalcitrante en estos efluentes es mediante la determinación de compuestos específicos tales como compuestos aromáticos (UV<sub>254</sub>), compuestos fenólicos (UV<sub>215</sub>), derivados de lignina (UV<sub>272</sub>, UV<sub>280</sub>), color (VIS<sub>440</sub>) y DQO (Chamorro *et al.*, 2005). La forma de evaluación antes indicada, consideran la

evaluación de las estructuras químicas estables (ligninas, restos lignínicos o aromáticos con grupos cromóforos, entre otros), la comparación de estos indicadores y la evolución de la biodegradación respecto de las distintas tecnologías aplicadas (Çeçen, 2003).

La Tabla 1 muestra las relaciones de color/ DQO, UV<sub>280</sub>/ DQO, UV<sub>272</sub>/ DQO, UV<sub>254</sub>/ DQO, UV<sub>215</sub>/ DQO obtenidos, tanto para el efluente del MBBR como además para los efluentes de precipitación química, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton. El sistema MBBR posee un mínimo efecto sobre la eliminación de compuestos específicos como lignina y color, no evidenciando una reducción importante. Durante la operación del MBBR se ha observado una directa relación entre la eficiencia de eliminación de compuestos fenólicos totales con la eliminación de color, observándose un incremento de color/ DQO (desde 0,19 a 0,36) debido al efecto de polimerización de compuestos fenólicos de bajo peso molecular generados por los residuos de la lignina (Vidal *et al.*, 2001; Milestone *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011), con un incremento de las relaciones UV<sub>280</sub>/ DQO, UV<sub>272</sub>/ DQO, UV<sub>254</sub>/ DQO, UV<sub>215</sub>/ DQO con valores promedios entre 0,40 – 0,53. La complejidad de la lignina se debe a su estructura química no definida que contiene diversos grupos cromóforos, al alto peso molecular y al gran número de enlaces que unen los monómeros que la conforman (múltiples enlaces éter y enlaces C – C), que son relativamente estables al ataque enzimático de microorganismos por lo cual forman parte de la fracción de compuestos recalcitrantes a la degradación biológica (Konduru *et al.* 2001; Leiviskä *et al.*, 2009; Area *et al.*, 2010). Diez *et al.* (2002) señalan que la presencia de lignina es uno de los principales inconvenientes que debe enfrentar esta industria y que además tanto la lignina como los taninos, no son fácilmente biodegradables por sistemas de tratamientos aerobios. Los valores promedios de las relaciones color/ DQO, UV<sub>280</sub>/ DQO, UV<sub>272</sub>/ DQO, UV<sub>254</sub>/ DQO, UV<sub>215</sub>/ DQO obtenidos en este estudio correspondieron a 0,19, 0,25, 0,28, 0,34, 0,27 para el influente y de 0,36, 0,40, 0,44, 0,53 y 0,46 para el efluente, respectivamente (Capítulo III, Tabla 2). Donde además, la presencia de compuestos derivados de la lignina fue verificada mediante la relación UV<sub>254</sub>/ UV<sub>280</sub>, obteniendo en el efluente un valor promedio de 1,31. Estudios previos realizados mediante lagunas aireadas y MBBR, obtuvieron relaciones de color/ DQO, UV<sub>280</sub>/ DQO, UV<sub>272</sub>/ DQO, UV<sub>254</sub>/ DQO con valores entre 0,10 – 0,11, 0,11 – 0,28, 0,27 – 0,31, y 0,13 – 0,35, determinando mediante ultrafiltración que para las fracciones de peso molecular < 1.000 Da y de 1.000 – 10.000 Da la DQO es inferior al 20 %. Sin embargo, para la fracción > 10.000 Da la DQO

correspondió al 60 %, es decir, un alto porcentaje de DQO permanece en el efluente sin ser degradada o transformada en moléculas más pequeñas. El mismo comportamiento fue hallado para el color y los compuestos fenólicos (Chamorro *et al.*, 2005; Villamar *et al.*, 2009). Çeçen (2003) obtuvo relaciones de  $UV_{254}/UV_{272}$  entre 1,10 – 1,13, similar a lo obtenido por Villamar *et al.* (2009) con valores entre 1,16 – 1,27. Además se estudiaron las relaciones  $UV_{440}/DBO_5$ ,  $UV_{280}/DBO_5$ ,  $UV_{272}/DBO_5$ ,  $UV_{254}/DBO_5$  y  $UV_{215}/DBO_5$  obteniéndose el mismo comportamiento, es decir, una baja biodegradación de compuestos aromáticos con valores promedios de 0,59, 0,66, 0,60, 0,81, 0,73 para el influente y 4,90, 5,98, 5,41, 7,16, 6,24 para el efluente, respectivamente. Debido a lo anteriormente indicado, a través de la implementación del MBBR en este estudio, se obtuvieron máximas eficiencias de eliminación de compuestos lignínicos constituidos por compuestos fenólicos del 41,0 % y 45,0 % para efluentes de celulosa kraft y de papel, respectivamente, resultados que concuerdan con estudios previos en sistemas de lodos activados y MBBR con eficiencias entre 3,6 – 55,0 % (Diez *et al.*, 2002; Villamar *et al.*, 2010). Por lo antes mencionado, se sugiere que la implementación de combinaciones de sistemas biológicos con POAs, podrían incrementar la eliminación de materia orgánica recalcitrante (Chaparro *et al.*, 2010; Oller *et al.*, 2011). Es por esto, que dentro de los objetivos de esta tesis se estudió la implementación de tratamientos terciarios como precipitación química y dos POAs (UV/  $H_2O_2$  y Fenton) posterior a un MBBR (Capítulo IV, Capítulo VII). Los tratamientos terciarios implementados, demostraron ser eficientes en eliminación de materia orgánica recalcitrante, con oxidación química de compuestos aromáticos logrando disminuciones de las relaciones de color/ DQO,  $UV_{280}/DQO$ ,  $UV_{272}/DQO$ ,  $UV_{254}/DQO$  y  $UV_{215}/DQO$ . Este hecho se explicaría para el caso de los POAs por el fuerte potencial de oxidación de los radicales  $OH^\bullet$ , verificando la eficiencia de estos tratamientos en la degradación oxidativa de estructuras químicas y de la ruptura de enlaces de compuestos aromáticos presentes en este tipo de efluentes convirtiendo los compuestos recalcitrantes en compuestos más simples y de menor peso molecular (Catalkaya & Kargi, 2008; Lucas *et al.*, 2012). En este estudio las mayores disminuciones en las relaciones color/ DQO,  $UV_{280}/DQO$ ,  $UV_{272}/DQO$ ,  $UV_{254}/DQO$  y  $UV_{215}/DQO$  correspondieron para precipitación química (0,01, 0,04, 0,05, 0,06 y 0,10), seguido de UV/ $H_2O_2$  (0,04, 0,06, 0,07, 0,07 y 0,08) y Fenton (0,25, 0,12, 0,13, 0,14 y 0,11). Amat *et al.* (2005) mencionan que POAs son factibles para el tratamiento de estos efluentes, obteniendo una completa oxidación de productos

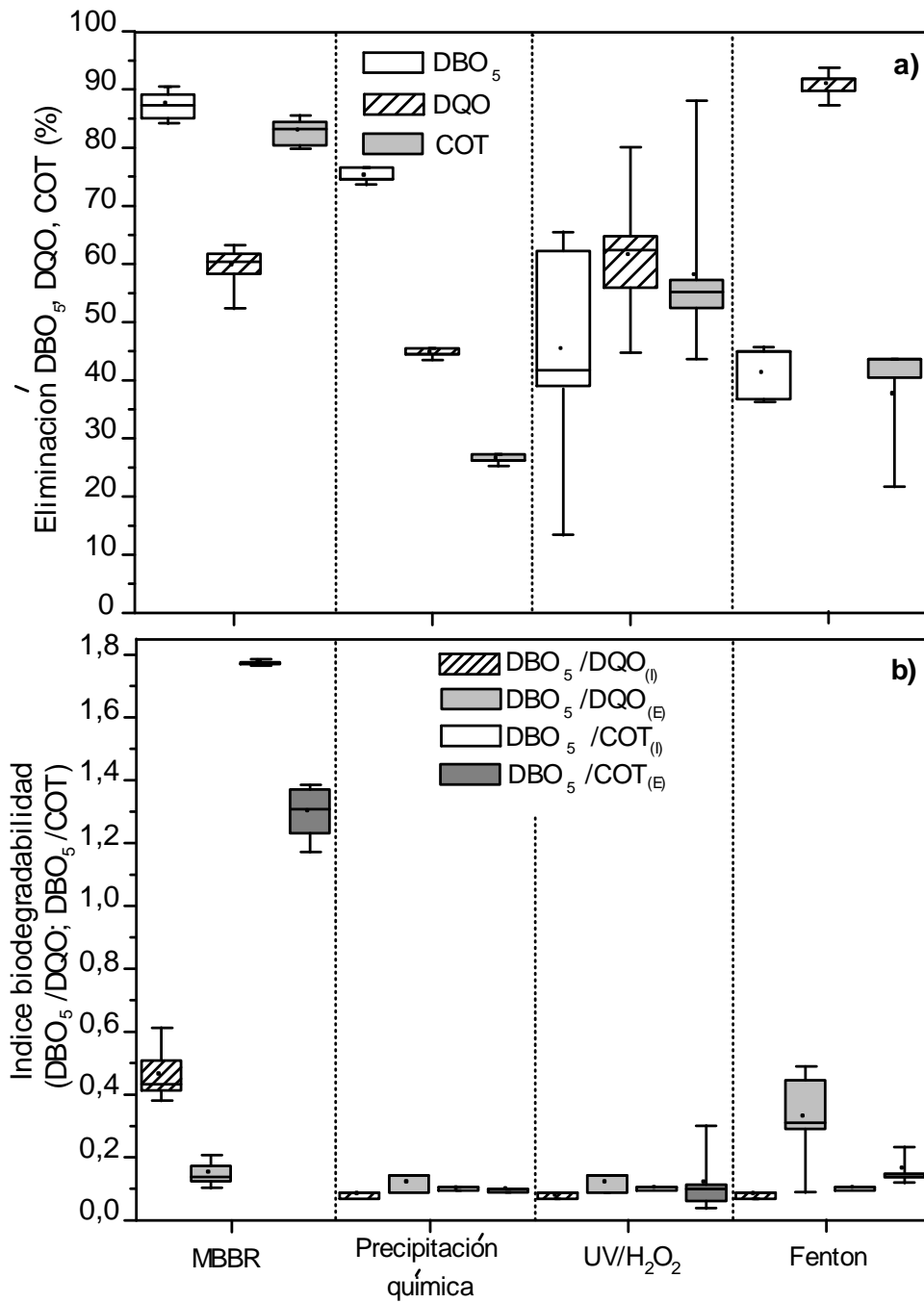
de la lignina y disminución de carga orgánica. Para el caso de las relaciones de UV<sub>440</sub>/ DBO<sub>5</sub>, UV<sub>280</sub>/ DBO<sub>5</sub>, UV<sub>272</sub>/ DBO<sub>5</sub>, UV<sub>254</sub>/ DBO<sub>5</sub> y UV<sub>215</sub>/ DBO<sub>5</sub> el comportamiento fue similar donde las mayores disminuciones en las relaciones correspondieron para UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,60, 0,95, 1,00, 1,03 y 1,12), con eficiencias de eliminación de lignina superiores al 90,0 % utilizando sistemas UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton. El tratamiento de precipitación química, a pesar de obtener considerables disminuciones en las relaciones antes mencionadas, presenta desventajas como la formación de una fase sólida en la cual quedan retenidos los contaminantes, lo cual explicaría las relaciones obtenidas para este tratamiento (Ahmad *et al.*, 2008; Eskelinen *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos con los POAs permitirían la eliminación de compuestos aromáticos o de carácter recalcitrante, influyendo sobre la toxicidad presente en estos efluentes. No obstante, es necesario evaluar posibles efectos perjudiciales debido a la generación de sub-productos durante cada proceso (Chaparro *et al.*, 2010; Oller *et al.*, 2011).

**Tabla 1.** Comportamiento de compuestos aromáticos durante el tratamiento con MBBR, precipitación química, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton.

Parámetro	Biológico		Físico-químico	Efluente	
	Influyente	Efluente		Químico	
			P. química	UV/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fenton
VCO (kg DBO <sub>5</sub> / m <sup>3</sup> · d)	0,09 – 0,91	0,09 – 0,91	n.r.	n.r.	n.r.
VIS <sub>440</sub> / DQO*	0,19 ± 0,00	0,36 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,25 ± 0,01
UV <sub>280</sub> / DQO*	0,25 ± 0,01	0,40 ± 0,03	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,12 ± 0,00
UV <sub>272</sub> / DQO*	0,28 ± 0,01	0,44 ± 0,04	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,13 ± 0,00
UV <sub>254</sub> / DQO*	0,34 ± 0,03	0,53 ± 0,05	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,14 ± 0,00
UV <sub>215</sub> / DQO	0,27 ± 0,00	0,46 ± 0,05	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,11 ± 0,00
VIS <sub>440</sub> / DBO <sub>5</sub> *	0,59 ± 0,02	4,90 ± 0,14	0,74 ± 0,09	0,60 ± 0,02	3,02 ± 0,23
UV <sub>280</sub> / DBO <sub>5</sub> *	0,66 ± 0,06	5,98 ± 0,16	2,22 ± 0,00	0,95 ± 0,07	2,46 ± 0,00
UV <sub>272</sub> / DBO <sub>5</sub> *	0,60 ± 0,06	5,41 ± 0,15	2,56 ± 0,00	1,00 ± 0,02	2,57 ± 0,03
UV <sub>254</sub> / DBO <sub>5</sub> *	0,81 ± 0,05	7,16 ± 0,18	2,96 ± 0,09	1,03 ± 0,00	2,77 ± 0,04
UV <sub>215</sub> / DBO <sub>5</sub>	0,73 ± 0,04	6,24 ± 0,15	4,80 ± 0,03	1,12 ± 0,03	2,22 ± 0,33

\*: valores (x 1000); n.r.: no registrado.

La Figura 2 resume la eficiencia de eliminación de materia orgánica determinada como DQO, DBO<sub>5</sub> y COT, además de los índices de biodegradabilidad para los efluentes obtenidos de los distintos tratamientos implementados (Capítulos III – VII). La Figura 2a muestra las eficiencias de eliminación de materia orgánica registrando para el efluente obtenido durante el tratamiento secundario con MBBR valores promedios de 87,27 % para DBO<sub>5</sub>, 59,35 % para DQO y 82,70 % para COT. En el caso del tratamiento con POAs y precipitación química, los valores promedios de eficiencias correspondieron para Fenton del 90,66 % DQO, 41,93 % DBO<sub>5</sub> y 37,32 % COT, para UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 66,21 % DQO, 45,65 % DBO<sub>5</sub> y 57,75 % COT y para precipitación química del 45,00 % DQO, 75,70 % DBO<sub>5</sub> y 26,23 % COT (Capítulo IV). Las eficiencias de los POAs en eliminación de materia orgánica recalcitrante, para el caso de Fenton se deben a la capacidad oxidativa de los radicales OH• generados por la combinación de Fe (II) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que para UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la presencia de radiación ultravioleta (UV) acelera la generación de OH• (Catalkaya & Kargi., 2007; Catalkaya & Kargi, 2008; Lucas *et al.*, 2012). Estos valores de eliminación de DBO<sub>5</sub> coinciden con estudios previos en sistemas MBBR en los cuales se han obtenido eficiencias de eliminación de DBO<sub>5</sub> entre 85,0 – 99,0 % y de hasta el 60 % para DQO, operando con variaciones de VCO desde 0,07 a 1,19 Kg DBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup> · d y relaciones de nutrientes DBO<sub>5</sub>: N: P = 100: 5:1 (Villamar *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2010; Pozo *et al.*, 2012), mientras que para la precipitación química, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton, se han reportado eliminaciones de DQO mayores al 60 % y entre 8,0 – 90,0 % para COT (Srivastava *et al.*, 2005; Garg *et al.*, 2010; Eskelinen *et al.*, 2010; Hermosilla *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Comportamiento de la materia orgánica en los distintos tratamientos implementados. a) Eficiencia de eliminación de materia orgánica contenida en efluentes de celulosa kraft a través de para MBBR, precipitación química, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton. b) Índices de biodegradabilidad obtenidos para MBBR, precipitación química, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton.

La Figura 2b muestra los índices de biodegradabilidad obtenidos ( $DBO_5/DQO$  y  $DBO_5/COT$ ) en los tratamientos implementados. Las índices de  $DBO_5/DQO$  y  $DBO_5/COT$  para el influente del MBBR fueron entre 0,37 – 0,64 y 1,75 – 1,78, respectivamente. Después del tratamiento con el MBBR, se observó la disminución en ambas relaciones, entre 0,11 – 0,21 y 1,17 – 1,38, para  $DBO_5/DQO$  y  $DBO_5/COT$ , respectivamente, de lo cual se concluye que en estos persiste materia orgánica recalcitrante. Para el caso del influente de precipitación química, UV/  $H_2O_2$  y Fenton, los valores promedios de los índices  $DBO_5/DQO$  fueron 0,07, 0,10 y 0,10, respectivamente, mientras que para  $DBO_5/COT$  correspondieron a 0,12, 0,12 y 0,13, para precipitación química, UV/  $H_2O_2$  y Fenton, respectivamente. En el caso de los efluentes, el tratamiento que presentó un mayor incremento de  $DBO_5/DQO$  fue Fenton con un valor promedio de 0,49, es decir, este tratamiento permitió un incremento de disponibilidad de materia orgánica biodegradable, indicando que compuestos de alto peso molecular podrían haberse oxidado a compuestos de bajo peso molecular, lo cual además se corroboraría por las eficiencias obtenidas para esta tratamiento del 90,66 %  $DQO$ , 41,93 %  $DBO_5$  y 37,32 %  $COT$  (capítulo VII, VI). Estudios previos determinan que índices de  $DBO_5/DQO$  mayores que 0,3 indican presencia de compuestos biodegradables, mientras que índices  $DBO_5/DQO$  menores que 0,3 indican presencia de una fracción de materia orgánica recalcitrante (Rodrigues *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2012).

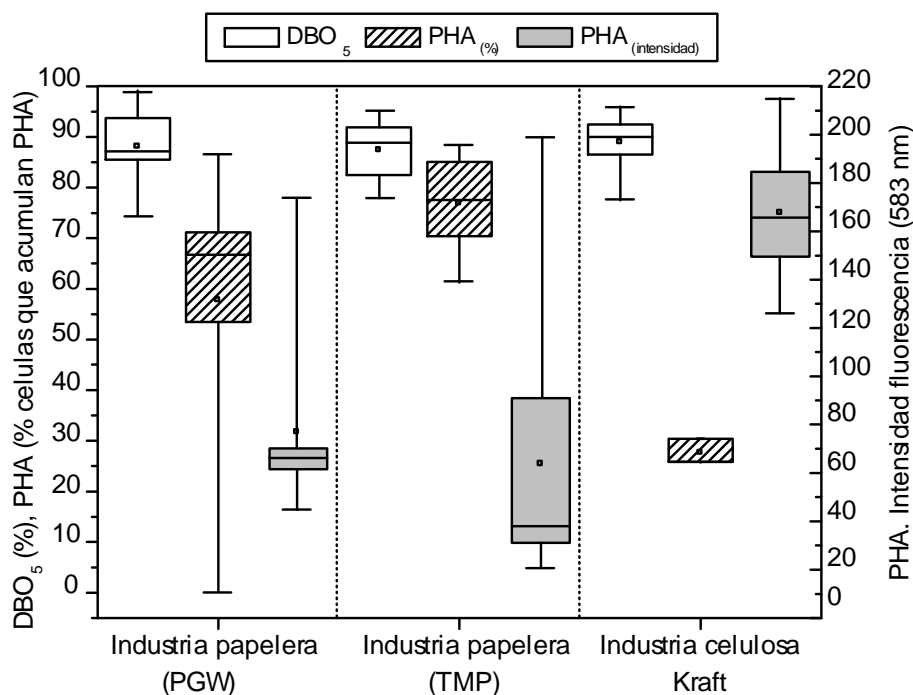
## **2. Materia orgánica biodegradable y su valorización para producción de polihidroxialcanoatos (PHAs)**

El tratamiento de efluentes de celulosa kraft y papel se realiza principalmente por lagunas aireadas, lodos activados y MBBR registrando eficiencias de eliminación de materia orgánica entre 73,0 – 95,0 % DBO<sub>5</sub> y 30,0 – 60,0 % DQO en lagunas aireadas (Stuthridge *et al.*, 1991; Welander *et al.* 1997; Schnell *et al.*, 2000; Belmonte *et al.*, 2005), entre 73,5 – 99,2 % DBO<sub>5</sub> y 30,3 – 67,0 % DQO para lodos activados (Junna & Ruonala, 1991; Raghuvver & Sastry, 1991; Hansen *et al.*, 1999) y entre 85,0 – 99,0 % DBO<sub>5</sub> y 24,0 – 60,0 % DQO para MBBR (Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Villamar *et al.*, 2009). El tratamiento de estos efluentes genera lodos cuya disposición final representa actualmente un creciente desafío debido a factores económicos, ambientales y de regulación, por lo cual es fundamental el estudio de estrategias para disminuir las toneladas de lodos generados durante el tratamiento de estos efluentes, las que corresponden aproximadamente entre 1,8 – 3,5 ton lodo/ ton DBO<sub>5</sub> removida (Malmqvist *et al.*, 2004; Jarpa *et al.*, 2012). Por otra parte, Stoica *et al.* (2009) menciona que los sistemas de aireación de los tratamientos empleados requieren a menudo más del 50 % de la energía utilizada, con gastos de energía entre 674 – 1.390 kW·h/t on DQO removida y 647 – 3.885 kW·h/ ton lodo. En cuanto a la disposición de lodos, estos para ser dispuestos requieren de una etapa de deshidratación mecánica (contenido seco máximo de 18 – 50 %) para finalmente ser utilizados en reparación de suelos o fertilización forestal, requiriendo en el primer caso de una etapa de compostaje y en el segundo caso de incineración con el vertido de las cenizas (Stoica *et al.*, 2009). Mahmood & Elliott, (2006) concluyen que es más atractivo desde el punto de vista económico reducir la formación de lodos a través de cambios en los sistemas de tratamientos y con ello disminuir la cantidad de lodo para post-tratamiento de lodos como también utilizarlos como sustrato para la recuperación de energía. Sin embargo, estos presentan un bajo valor calorífico neto de 6,2 MJ/ kg por su alto contenido de agua, en comparación con el valor calorífico neto de la corteza y el licor negro, que son los biocombustibles predominantes en la industria forestal (aproximadamente 7 y 12 MJ/ kg, respectivamente). Wei *et al.* (2003) mencionan que una de las estrategias para lograr una disminución de producción de lodos es influir en el metabolismo de los microorganismos, mediante la aplicación de largos Tiempos de Retención de Sólidos (TRS) y bajas relaciones de A/M (Alimento/Microorganismos) de tal forma que predomine el

mantenimiento del metabolismo y no la biosíntesis, permitiendo una cadena alimentaria prolongada con adaptación de protozoos y metazoos, lo cual trae asociado un aumento del consumo de oxígeno. Sin embargo, para evitar alteraciones en parámetros operacionales del sistema de tratamiento y por ende en las eficiencias de eliminación de materia orgánica, Bengtsson *et al.* (2008) sugieren la revalorización de estos efluentes mediante la producción de PHAs o Polihidroxialcanoatos (Sistemas batch y lodos activados), siendo éstos una alternativa prometedora en la producción de plásticos biodegradables, lo cual trae asociado una disminución en la producción de lodo que posteriormente deberá contar con un post-tratamiento y disposición (Chen & Li, 2008). Por lo antes mencionado, dentro de los objetivos de esta tesis de doctorado es utilizar la materia orgánica biodegradable ( $DBO_5$ ) presente en los efluentes de celulosa kraft y papel para la producción de PHAs por MBBR, otorgándoles un valor agregado.

La Figura 3 muestra una comparación de la eficiencia en eliminación de  $DBO_5$  y producción de PHAs entre efluentes obtenidos de diferentes procesos de producción de papel (PGW: desfibrador presurizado, TMP: pulpaje termomecánico) y efluentes de la industria de celulosa kraft (Capítulo V, VI). Las máximas eficiencias de eliminación de  $DBO_5$  en los 3 casos fueron mayores a 95 %, valores similares a los obtenidos en estudios previos (Villamar *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2010; Pozo *et al.*, 2012). La producción de PHAs se determinó a través del porcentaje de células que acumulan PHAs (Capítulo III, Capítulo IV) e intensidad de fluorescencia donde esta última permite cuantificar la producción de PHAs (Glorenfo *et al.*, 1999). Los máximos porcentajes de células que acumulan PHAs corresponden para efluentes de la industria papelera del tipo TMP con un 88,10 %, mientras que para efluentes de papelera PGW y celulosa kraft estos corresponden a 85,10 % y 30,40 %, respectivamente. La determinación de intensidad de fluorescencia correspondió a absorbancias de 198,44, 173,47 y 215,01 para efluentes de la industria papelera del tipo TMP, efluentes de papelera PGW y celulosa kraft, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que pese a que los efluentes de la industria de papel presentan el mayor porcentaje de células que acumulan PHAs, la cantidad de PHAs en el interior de las células es inferior que en las células que utilizan como sustrato los efluentes de la industria de celulosa kraft. Estudios previos en estos efluentes han demostrado acumulaciones de PHAs mediante cultivos microbianos puros mayores al 60 % del peso seco del lodo (Chen, 2010; Tobella *et al.*, 2005), mientras que en cultivos microbianos mixtos (principalmente en sistemas

batch, lodos activados y MBBR), han registrado acumulaciones de PHAs superiores al 30 % del peso seco del lodo (Yan *et al.*, 2006; Bengtsson *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2012; Pozo *et al.*, 2011; Pozo *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Comparación de la eficiencia en eliminación de DBO<sub>5</sub> y producción de PHAs entre efluentes de la industria de celulosa kraft y papel. PGW: desfibrador presurizado, TMP: pulpaje termomecánico.

### 3. Efectos de la tecnología en la toxicidad contenida en efluentes de celulosa kraft y papel.

Los efectos de efluentes de la industria celulosa kraft y papel, específicamente los descargados por plantas de celulosa kraft, han sido estudiados por más de 40 años (Orrego *et al.*, 2006; Hewitt *et al.*, 2008). En la actualidad, estudios previos atribuyen a este tipo de efluentes principalmente del tipo toxicidad crónica debido a la presencia de compuestos recalcitrantes, específicamente al grupo de fitoesteroles (Xavier *et al.*, 2005; Chamorro *et al.*, 2010; López *et al.*, 2011). En cuanto

al toxicidad aguda ya ha sido considerablemente disminuido debido al tratamiento biológico de estos efluentes (Belmonte *et al.*, 2006).

La Tabla 2 resume estudios realizados tanto en sistemas de tratamientos de tipo físico-químicos como la precipitación química y tratamientos químicos como POAs, estos últimos basados principalmente en eliminación de DQO, COT y AOX, registrando para precipitación química eliminaciones entre 63 – 77 % para DQO y 30 – 70 % para COT, con muy pocos estudios en eliminación de compuestos como fitoesteroles, con eliminación mayor al 90 % para  $\beta$ -sitoesterol y estigmastanol (Stephenson & Duff, 1996a; Stephenson & Duff, 1996b; Eskelinen *et al.*, 2010). En el caso de los POAs, se han registrado eliminaciones entre 20 – 94 %, 8 – 96 % para DQO y COT (Pérez *et al.*, 2002; Torrades *et al.*, 2003; Catalkaya & Kargi, 2007; Chaparro *et al.*, 2010), registrando con UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Fe<sup>+2</sup> y O<sub>3</sub> eliminaciones entre 36 – 93 %, del 84 % para ácidos resínicos y ácido linoleico, respectivamente y del 87 % para  $\beta$ -sitosterol (Torrades *et al.*, 2003; Catalkaya & Kargi, 2007; Eskelinen *et al.*, 2010). En vista a estos resultados, los tratamientos terciarios implementados permitirían una disminución en la vía de ingreso de compuestos con toxicidad en ecosistemas acuáticos que presentan estos efluentes, ya que estos compuestos debido a sus valores de log K<sub>ow</sub> mayores a 4 y a 6, para ácidos resínicos y fitoesteroles, respectivamente, se asocian con partículas o materia orgánica disuelta y se almacenan en los sedimentos (Orrego *et al.*, 2005; Orrego *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Chamorro *et al.*, 2013).

**Tabla 2.** Eficiencias de eliminación en diferentes sistemas de tratamientos físico-químicos y químicos utilizados en la industria de celulosa kraft.

Tecnología	Eliminación efluentes (%)					Referencia
	DQO	TOC	Color	Fenoles totales	Compuestos activos	
Tratamiento físico-químico						
Precipitación química	63 – 77	30 – 70	96	n.r.	> 90 <sup>b,d</sup>	1 – 3
Tratamiento químico						
UV/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	74	8 – 45	41	24 – 91	n.r.	4 – 5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Fe <sup>+2</sup>	> 60	20 – 90	85	32 – 100	n.r.	4 – 7
UV/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Fe <sup>+2</sup>	n.r.	60 – 96	82	n.r.	93 <sup>a</sup> , 87 <sup>b</sup> , 84 <sup>c</sup>	3, 4, 7
O <sub>3</sub>	29 – 76	19 – 51	81 – 97	85 – 100	36 – 90 <sup>a</sup>	3, 8, 9
O <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	31	n.r.	81	58 – 93	n.r.	4 – 6
O <sub>3</sub> / UV	20	n.r.	30	81 – 93	n.r.	5, 10
LA/ O <sub>3</sub>	75	59	59	52	n.r.	11
UV/ ZnO	69 – 94	80	n.r.	n.r.	n.r.	12
UV/ TiO <sub>2</sub>	75 – 88	n.r.	n.r.	42 – 78	n.r.	5, 13
O <sub>3</sub> / UV/ ZnO; O <sub>2</sub> / UV/ Zn	50	n.r.	40	n.r.	n.r.	10

n.r.: no registrado; a: ácidos resínicos; b: β-sitosterol; c: ácido linoleico; d: estigmasterol; (1): Stephenson & Duff, 1996a; (2): Stephenson & Duff, 1996b; (3): Eskelinen *et al.*, 2010; (4): Cokay & Kargi, 2007; (5): Espuglas *et al.*, 2002; (6): Pérez *et al.*, 2002; (7): Torrades *et al.*, 2003; (8): Fontanier *et al.*, 2006; (9) Ledakowics *et al.*, 2006; (10) Mansilla *et al.*, 1997; (11): Assalin *et al.*, 2009; (12): Kansal *et al.*, 2008; (13): Cokay & Kargi, 2008.

La Tabla 3 resume los valores de toxicidad registrados en esta tesis en comparación con estudios previos específicamente para efluentes de la industria de celulosa kraft utilizando el bioindicador *D. magna*. En este estudio se determinó toxicidad aguda de los efluentes mediante la determinación de LC<sub>50</sub> 48h (Concentración Letal para el 50 % de los organismos), registrando para el efluente primario y efluente de precipitación química, valores de LC<sub>50</sub> 48h de 84,1 % y 91,3 %, respectivamente (Capítulo IV, Capítulo VII). Estudios anteriores han determinado para efluentes del tratamiento primario valores de LC<sub>50</sub> 48h desde 8 al 100 % (Diez *et al.*, 2002; Xavier *et al.*, 2005), mientras que para precipitación química no existen reportes científicos de LC<sub>50</sub> 48h con *Daphnideos*. En el caso de los efluentes obtenidos posterior a tratamientos con sistemas MBBR, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton, no registran valores de LC<sub>50</sub> 48h. Estudios previos mencionan la eficiencia de los sistemas de tratamientos biológicos en la eliminación de toxicidad aguda presente en este tipo de efluentes (Diez *et al.*, 2002; Xavier *et al.*, 2005; Chamorro *et al.*, 2009). Chaparro *et al.* (2010) evaluaron la eliminación de la toxicidad aguda con *Daphnia similis*, resultados que fueron expresados como Uta (Unidades Toxicológicas Agudas: 100/ LC<sub>50</sub>) obteniendo reducciones del 90 %, desde 15,8 a aproximadamente 2 UTa para el tratamiento de los efluentes con sistemas anaeróbicos y del 91 % con POAs (O<sub>3</sub>) desde 15,8 a aproximadamente 1,5 UTa. La determinación de toxicidad aguda en estos efluentes otorga información sobre los efectos a corto plazo, pues la ausencia de efectos agudos no implica que no se produzcan efectos crónicos, por lo cual desde el punto de vista ecológico y debido a la amplia variedad de compuestos químicos que poseen estos efluentes, es necesario bioensayos crónicos para así determinar la toxicidad crónica simulando la exposición prolongada a estos compuestos, determinando por ende efectos en el mediano y largo plazo (Borton *et al.*, 1997).

Por lo antes mencionado, se determinaron en estos efluentes toxicidad crónica mediante las determinaciones de NOEC (concentración a la cual no se observan efectos), LOEC (mínima concentración a la cual se observan efectos), producción del número de neonatos y TCA (Tasa crecimiento alométrica) en *D. magna*. Los resultados muestran que el efluente del MBBR presenta los valores más bajos de NOEC, en comparación a los efluentes de precipitación química y UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, correspondiendo a 25 %, 50 % y 50 %, respectivamente. El mismo comportamiento se obtuvo para la determinación de LOEC, con valores de 50 %, 75 % y 75 % para los efluentes de MBBR, precipitación química y UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, lo cual indicaría

que los efluentes del MBBR presentan mayor disponibilidad de compuestos que generan toxicidad crónica a una menor concentración del efluente. En el caso de Fenton, no registró valores de NOEC y LOEC. López *et al.* (2011) estudiaron distintas combinaciones de efluentes secundarios de celulosa kraft (*P. radiata*, mezcla *P. radiata* 50%: *E. globulus* 50%) con compuestos activos como  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, encontrando valores de 12,5 % y 25 %, para NOEC y LOEC, respectivamente. En cuanto a la producción de neonatos esta incrementó para el efluente del MBBR desde 9,6 a 17,4, desde 4,5 a 6,9 para el efluente de precipitación química (fase sólida) y desde 8,4 a 13,1 para Fenton con diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0,05$ ) para las concentraciones del efluente del MBBR (100 %) del 25 %, 50 % y 75 % para efluente de precipitación química (fase sólida) y del 75 % para Fenton. Para UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la producción de neonatos disminuyó desde 8,6 a 6,5. López *et al.* (2011) registraron incrementos en producción de neonatos desde 5,6 a 11,9 en efluentes tratados biológicamente. Finalmente se evaluó la disminución de la TCA, obteniendo para el efluente del MBBR disminuciones entre 6,1 – 11,5 % con respecto al control y con diferencias significativas sólo para la concentración de 100% ( $p < 0,05$ ). Mientras que para los otros tratamientos implementados, sólo se registraron disminuciones para precipitación química (fase sólida), con valores máximos del 3,4 %. López *et al.* (2011) registraron reducciones de la TCA del 17 % y 27 % en el día 14 y 21 del bioensayo con *D. magna*. Los resultados de reducción de TCA obtenidos en esta tesis sugieren presencia de compuestos con toxicidad crónica debido al incremento del ancho abdominal con respecto a la longitud del cuerpo en *D. magna*, lo cual está relacionado a una mayor producción de neonatos (Olmstead & Leblanc, 2000). Xavier *et al.* (2009) y Chamorro *et al.* (2010), atribuyen dicha toxicidad crónica en estos efluentes a la persistencia de compuestos recalcitrantes como  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y campesterol posterior a sistemas biológicos. Adicionalmente, existen estudios con otro tipo de bioindicadores como *Ceriodaphnia dubia*, resultados expresados como UTc (Concentración que podría inhibir el 25% de la reproducción: 100/ Cl<sub>p25</sub>), obteniendo reducciones del 38 %, desde 19,2 a aproximadamente 12 UTc para el tratamiento de los efluentes con sistemas anaeróbicos y del 70 % con POAs (O<sub>3</sub>) desde 19,2 a aproximadamente 6 UTc.

Además otros autores, han realizado estudios de toxicidad en estos efluentes mediante el biosensor *Saccharomyces cerevisiae recombinante*, cuya cepa esta modificada genéticamente

con el receptor de estrógenos humano (hER), para el caso del ensayo Yeast Estrogen Assay (YES) y Recombinant Yeast Assay (ER-RYA) y modificada genéticamente con el receptor de hidrocarburo de arilo humano (AhR), determinando mediante estos, compuestos con estructuras similares a dioxinas y furanos (YCM-RYA) (Routledge & Sumpter, 1996; García-Reyero *et al.*, 2001). Hamm *et al.* (2006) evaluó 16 efluentes de celulosa kraft mediante YES, detectando toxicidad crónica con actividad estrogénica en 10 de las industrias estudiadas. Chamorro *et al.* (2010b) estudiaron 3 efluentes de celulosa kraft con diferente materia prima (*P. radiata*, *E. glóbulos* y mezcla de estos: mixto), detectando actividad estrogénica expresada como Equivalente de 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2 eq.) de 0,383 ng EE2 Eq/ L, 1,475 ng EE2 Eq/ L y 0,849 ng EE2 Eq/ L, para efluentes de *P. radiata*, *E. glóbulos* y *mixto*, respectivamente, mientras que Fernández *et al.* (2007) obtuvieron valores entre 42 – 83 ng EE2 Eq/ L. En el caso de ER-RYA (actividad estrogénica) y YCM-RYA (actividad “dioxin-like”), estudios realizados por Monsálvez *et al.* (2007), registraron valores de actividad estrogénica expresada como 17- $\beta$ -estradiol (E2 eq.) entre 0,19 – 0,68 ng E2 Eq/ L y 0,28 – 0,67 ng E2 Eq/ L para efluentes de *P. radiata* y *E. globulus*, respectivamente, y para actividad del tipo “dioxin-like” valores de 21,35 ng E2 Eq/ L y 753,80 ng E2/ L para efluentes de *P. radiata* y *E. globulus*, respectivamente, mientras que Chamorro *et al.* (2013), en muestras de sedimentos cercanos a descargas de celulosa kraft, detectaron bajos niveles de respuestas para YES y RYA.

**Tabla 3.** Toxicidad aguda y crónica en efluentes de diferentes sistemas de tratamientos a través de *D. magna*.

Tecnología	Toxicidad aguda		Toxicidad crónica			
	LC <sub>50</sub> 48h (%) <sup>1-3</sup>	Concentración (%)	NOEC (%)	LOEC (%)	Producción neonatos (número)	TCA (%)
Tratamiento primario	43,7 – 84,1*	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Tratamiento biológico <sup>4</sup>	n.r.	25 – 75	12,5	25	5,6 – 11,9	17 – 27
MBBR*	n.r.	25 – 100	25	50	9,6 – 17,4 <sup>a</sup>	6,1 <sup>c</sup> – 11,5 <sup>a</sup>
Tratamiento físico-químico						
Precipitación química*	91,3	12,5 – 75	50	75	4,5 – 6,9 <sup>b,e</sup>	3,4 <sup>b</sup>
Tratamiento químico						
UV/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>*</sup>	n.r.	12,5 – 75	50	75	8,6 – 6,5 <sup>d</sup>	n.r.
Fenton	n.r.	12,5 – 75	n.r.	n.r.	8,4 – 13,1 <sup>d</sup>	n.r.

n.r.: no registrada; \*: este estudio; NOEC: concentración a la cual no se observan efectos; LOEC: mínima concentración a la cual se observan efectos; TCA: Tasa de crecimiento alométrico; a: concentración al 100%; b: concentración al 75%; c: concentración al 25%; e: muestra lodo; (1): Xavier *et al.*, 2005; (2): Díez *et al.*, 2002; (3): Chamorro *et al.*, 2009; (4): López *et al.*, 2011.

#### **4. Conexión entre calidad de efluentes generados en la industria de celulosa kraft y papel y los requerimientos ecosistémicos**

La política económica del país respalda al crecimiento productivo de esta industria, crecimiento que ha traído asociado presiones sobre los recursos naturales que son utilizados en dichas producciones como por ejemplo el recurso hídrico, debido a las cargas puntuales de los efluentes previamente tratados (Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Calvo *et al.*, 2007). Por lo antes mencionado, existen algunos efectos sobre la calidad de los sistemas acuáticos receptores aún después de que estos efluentes han sido tratados, tales como: problemas de color, temperatura como también toxicidad crónica sobre los organismos expuestos, los cuales pueden agudizarse en períodos de bajo caudal de los ríos (Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Asghar *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008).

Es por esto que a partir del año 1994, con la promulgación de la Ley N° 19.300 (Bases Generales del Medio Ambiente) esta industria inició cambios en sus procesos productivos con el propósito de mejorar la eficiencia y minimizar los impactos ambientales, aplicando el concepto de sustentabilidad ambiental y para el año 1999, por el acceso y exigencias de mercados internacionales, firma el primer Acuerdo Nacional de Producción Limpia, incorporando a su gestión ambiental materias tales como: residuos industriales sólidos y líquidos, uso eficiente del recurso agua y de energía, entre otras (Corma, 2010). Es importante mencionar que cada industria forestal que desea iniciar algún proyecto deberá realizar un Estudio de Impacto Ambiental el cual es evaluado por el Servicio de Evaluación Ambiental (SEA). El SEA una vez que finaliza su evaluación, establecerá una Resolución de Calificación Ambiental (RCA), la cual es propia para cada proyecto o actividad, en la cual se establecen las características y formas de operar del proyecto en cuestión. Cada proyecto durante su operación se le realizarán fiscalizaciones del cumplimiento de las normas y condiciones por las cuales se aprobó el Estudio de Impacto Ambiental.

Dentro de las normas a las cuales esta industria debe cumplir para la descarga de efluentes en sistemas acuáticos es la “Norma de Emisión para la Regulación de Contaminantes asociados a las Descargas de Residuos Líquidos a Aguas Marinas y Continentales Superficiales”, la cual tiene por objetivo la protección ambiental y prevenir la contaminación de las aguas marinas y

continentales superficiales (D.S. 90/ 2000), donde algunos de los parámetros que esta industria debe cumplir, corresponden a DBO<sub>5</sub>, Color, AOX, Sulfatos, Sólidos Sedimentables, Aluminio, Índice de fenol, entre otros, cuyos límites máximos de concentración para descargas a cuerpos de aguas receptores dependerá si corresponden a sistemas lénticos o lóticos.

Thompson *et al.* (2001) mencionan que esta industria pese a que cumple con la normativa vigente de cada país, con el tiempo deberá enfrentar reglamentos más estrictos en cuanto a calidad de sus efluentes, debido a que en la actualidad enfrentan problemas que están relacionados con la DQO residual, color y toxicidad de sus efluentes (Ali & Sreekrishnan, 2001). Por lo antes mencionado, a medida que aumenten las exigencias medioambientales, como por ejemplo la degradación de compuestos recalcitrantes y límites de DQO inferiores a 200 mg/L, esta industria deberá complementar los sistemas biológicos con POAs (Chaparro *et al.*, 2010; Oller *et al.*, 2011).

En el caso particular de Chile, el año 2003 ingresa el anteproyecto de la Norma Secundaria para el río Biobío y una Norma Secundaria de Calidad Ambiental establece los valores de las concentraciones y períodos, máximos o mínimos permisibles de sustancias, elementos, energía o combinación de ellos, cuya presencia o carencia en el ambiente pueda constituir un riesgo para la protección o conservación del medioambiente o la preservación de la naturaleza (D.S. 93/ 1995). La importancia de esta norma, en este caso en particular, se debe a que la cuenca hidrográfica del río Biobío incluye parte de la VIII y IX Regiones de Chile, regiones en las cuales se encuentran los mayores porcentajes de plantaciones forestales (40 % y 20 %, respectivamente) y que además posee gran diversidad biológica de peces (17 especies nativas y 4 introducidas), encontrando gran presencia de la industria forestal (3 plantas de celulosa kraft y 3 fábricas de papel), descargando por ende a estas aguas considerables volúmenes del vertido de sus efluentes (entre 20 – 200 m<sup>3</sup>/ ton papel (Thompson *et al.*, 2001; Hewitt *et al.*, 2006; Ahmad *et al.* 2007; Kansal *et al.*, 2008). La aprobación de esta norma traerá asociado en el cuerpo de agua (estaciones de muestreo) el monitoreo de concentraciones de parámetros y que tienen relación con esta industria, tales como: DBO<sub>5</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cloruros, Sulfatos, Aluminio, AOX, Color verdadero, PT, NT, Fe y DQO, entre otros, además del uso de bioensayos de toxicidad como una herramienta complementaria para evaluar el impacto de la calidad de las aguas sobre las

comunidades acuáticas. Es importante resaltar que la determinación de DQO en la cual se encuentra los compuestos con toxicidad crónica, no es un parámetro normado en el D.S. 90/2000 (Xavier *et al.*, 2005; Chamorro *et al.*, 2010; López *et al.*, 2011). Finalmente deberán realizarse monitoreos con organismos bioindicadores como por ejemplo *D. magna*, de tal forma que sea posible evaluar el toxicidadde estos efluentes a través de pruebas de toxicidad aguda y toxicidad crónica.

## **CAPITULO IX**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES**

## 1. CONCLUSIONES

1. Los efluentes de la industria de celulosa kraft y papel son caracterizados por su contenido de materia orgánica biodegradable y recalcitrante, obteniendo mediante la implementación de un sistema MBBR eficiencias en eliminación de materia orgánica biodegradable superiores al 90 % DBO<sub>5</sub>. Sin embargo, la eliminación de materia orgánica recalcitrante en promedio correspondieron al 59 % DQO. Estos resultados indicarían la permanencia de compuestos recalcitrantes, lo cual además fue corroborado por determinación de estructuras químicas estables tales como ligninas, restos lignínicos o compuestos aromáticos, evidenciando un mínimo efecto sobre la eliminación de éstos. A través de la determinación de estructuras químicas, se demostró una directa relación entre la eficiencia de eliminación de compuestos aromáticos con la eliminación de color y por ende incrementos de las relaciones color/ DQO, UV<sub>280</sub>/ DQO, UV<sub>272</sub>/ DQO, UV<sub>254</sub>/ DQO, UV<sub>215</sub>/ DQO.

2. Con el propósito de disminuir la materia orgánica recalcitrante remanente en el efluente de celulosa kraft de vertido, se implementaron tratamientos terciarios de precipitación química, UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fenton. El tratamiento de Fenton fue el que registró las máximas eliminaciones de DQO (90,66 %), seguido de UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (66,21 %) y precipitación química (45,00 %), demostrando para el caso de los POAs ser eficientes en eliminación de materia orgánica recalcitrante debido a la oxidación química generada por radicales OH• de compuestos aromáticos obteniendo disminuciones de las relaciones de color/ DQO, UV<sub>280</sub>/ DQO, UV<sub>272</sub>/ DQO, UV<sub>254</sub>/ DQO y UV<sub>215</sub>/ DQO.

3. En cuanto a la eliminación de toxicidad aguda y crónica, este fue determinado en los efluentes obtenidos para cada tratamiento implementado. El MBBR permite eliminación de toxicidad aguda en los efluentes de vertido. Para el caso de los efluentes de los tratamientos terciarios, sólo la fase sólida de precipitación química evidenció valores de LC<sub>50</sub> 48 h de 91,3 %. En cuanto a la eliminación del toxicidad crónica, este fue registrado en el efluente del MBBR a través de las reducciones de la TCA, con máximos del 11,57 % y con diferencias significativas sólo para la concentración de 100% (p<0,05). Mientras que en los tratamientos terciarios, las máximas reducciones de la TCA correspondieron a la fase sólida del tratamiento de precipitación química (3,40 %). Estos resultados fueron corroborados por el aumento en la producción de neonatos en

cada caso y por ende se concluye que los tratamientos terciarios implementados son eficientes en eliminación de toxicidad crónica.

4. Este trabajo evidenció que el efluente de la industria papelera utilizado como sustrato, además del consorcio bacteriano mixto, puede ser utilizado para la producción de PHA. Mencionar también que frente al aumento de velocidad de carga orgánica (VCO) y dosificación de nutrientes, el MBBR registro máximas eliminaciones de materia orgánica de DBO<sub>5</sub> del 98,7 % para DBO<sub>5</sub>: N: P de 100: 5: 1 y del 87,2 % para 100: 1: 0,3, ambas a VCO de 2,99 kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup>-d. Los máximos porcentajes de células que acumulan PHA fueron del 85,1 % y 78,7 % para relaciones DBO<sub>5</sub>: N: P de 100: 5: 1 y 100: 1: 0,3, respectivamente a la VCO aplicada de 2,99 kg DBO<sub>5</sub>/ m<sup>3</sup>-d. Sin embargo, se evidenció una baja producción de PHA debido a los valores obtenidos para intensidad de fluorescencia en comparación a efluentes de la industria de celulosa kraft con máximos valores de absorvancias de 173,4.

Dadas las conclusiones anteriores, puede indicarse que se acepta la hipótesis de trabajo propuesta, debido a que la combinación de tratamientos secundarios y terciarios permite la eliminación de toxicidad contenida en estos efluentes.

## **2. RECOMENDACIONES FINALES**

1. A pesar de que se acepta la hipótesis de trabajo, se plantea la sustitución del tratamiento terciario de precipitación química, tratamiento utilizado en la actualidad por POAs, ya que mediante estos, se demostró la eliminación de toxicidad crónica. Esto es debido a que en la precipitación química existe un cambio de fase de los compuestos con toxicidad crónica, desde una fase líquida a una sólida, por las características hidrofóbicas de estos compuestos, transformándose en un pasivo ambiental por su posterior disposición.

2. En cuanto al incremento para la producción de PHA, a través de la revalorización del efluente utilizando la DBO<sub>5</sub> como también para la obtención de una menor producción de lodos, se recomienda la implementación de otro sistema de tratamiento secundario como por ejemplo un SBR (Reactor Biológico Secuencial), pudiendo en este realizar la alternancia de etapas,

incorporando etapas de reacción (anaeróbica y aeróbica). Esto debido que los resultados obtenidos a través de este estudio, sugieren que estos consorcios microbianos mixtos no pueden directamente metabolizar toda la materia orgánica del efluente en PHA. Por lo antes mencionado, es necesario una etapa previa anaeróbica, con el fin de transformar compuestos más complejos a intermediarios de ácidos grasos volátiles (AGV), tales como, el ácido acético, propiónico y butírico, siendo estos el sustrato principal para la producción de PHA.

## **CAPITULO X**

## **REFERENCIAS**

- American Public Health Association (APHA). In Standard methods for the examination of water and wastewater; 20th Ed.; Washington D.C, 1998; 1325 pp.
- Albuquerque, M., Martino, V., Pollet, E., Averous, L. & Reis, M. 2001. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA Productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151: 66 – 76.
- Ali, M. & Sreekrishnan, T. 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in Environmental Research*, 5: 175 – 196.
- Amat, A., Arques, A., Miranda, M. & López, F. 2005. Use of ozone and/or UV in the treatment of effluents from board paper industry. *Chemosphere*, 60: 1111 – 1117.
- Ahmad, A., Wong, S., Teng, T. & Zuhairi, A. 2007. Optimization of coagulation-flocculation process for pulp and paper mill effluent by response surface methodological analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 145: 162 – 168.
- Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A. & Marotta, R. 1999. Advanced oxidation (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53: 51 – 59.
- Annachhatre, A. & Gheewala, S. 1996. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnology Advanced*, 14: 35 – 56.
- Area, M., Carvalho, M., Ferreira, P., Felissia, F., Barboza, O. & Bengoechea. 2010. The influence of pulping and washing conditions on the properties of *Eucalyptus grandis* unbleached kraft pulps treated with chelants. *Bioresources Technology*, 101(6): 1877 – 1084.
- Asghar, M., Khan, S. & Mushtaq, S. 2008. Management of treated pulp and paper mill effluent to achieve zero discharge. *Journal of Environmental Management*, 88 (4): 1285 – 1299.
- Assalin, M., Santos, E. & Durán, N. 2009. Combined system of activated sludge and ozonation for the treatment of kraft E1 effluent. *Journal of Environmental Research and Public Health*, 6: 1145 – 1154.
- Barata, C., Porte, C. & Donald, J.B. 2004. Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates: A Review. *Ecotoxicology*, 13: 511 – 517.

- Barajas, M., Scales, A. & Womanizer, R. 2002. Fermentation of a low VFA wastewater in an activated primary tank. *Water SA*, 28: 89 – 98.
- Beccari, M., Majone, M., Massanisso, P. & Ramadori, R. 1998. A bulking sludge with high storage response selected under intermittent feeding. *Water Research*, 32: 3403 – 3413.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M. & Welander, T. 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge wastewater treating a paper mill. *Bioresource Technology*, 99: 509 – 516.
- Belmonte, M., Xavier, C., Decap, J., Martínez, M., Sierra-Álvarez, R. & Vidal, G. 2006. Improved aerobic biodegradation of abiético acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation. *Journal of Hazardous Materials*, 135: 256 – 263.
- Bijan, L. & Mohseni, M. 2005. Integrated ozone and biotreatment of pulp mill effluent and changes in biodegradability and molecular weight distribution of organic compounds. *Water Research*, 39: 3763 – 3772.
- Bolong, N., Ismail, A., Salim, M. & Matsuura, T. 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239: 229 – 246.
- Borch-Due, A., Anderson, R. & Opheim, B. 1997. Treatment of integrated newsprint mill wastewater in moving bed biofilm reactors. *Water Science and Technology*, 35: 173 – 80.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. & Genser, K.F. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources-. Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65: 127 – 161.
- Calvo, L., Gilarranz, M., Casas, J., Mohedano, A. & Rodríguez, J. 2007. Detoxification of kraft pulp ECF bleaching effluents by catalytic hydrotreatment. *Water Research*, 41 (4): 915 – 923.
- Carrasco, L. 2004. Contaminantes ambientales derivados del pulpaje y blanqueo de la pulpa de madera. *AMBIOS Cultura Ambiental*: 13.
- Catalkaya, E. & Kargi, F. 2007. Color, TOC and AOX removals from pulp mill effluent by advanced oxidation processes: A comparative study. *Journal of Hazardous B*, 139: 244 – 253.

- Catalkaya, E. & Kargi, F. 2008. Advanced oxidation treatment of pulp mill effluent for TOC and toxicity removals. *Journal of Environmental Management*, 87: 396 – 404.
- 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.
- Ciputra, S., Antony, A., Phillips, R., Richardson, D. & Leslie, G. 2010. Comparison of treatment options for removal of recalcitrant dissolved organic matter from paper mill effluent. *Chemosphere*, 81: 86 – 91.
- CMPC Celulosa. Proceso Productivo de la Celulosa. <http://www.papelnet.cl>.
- Cody, R.P. & Bortone, S.A. 1997. Masculinization of mosquitofish as an Indicator of exposure to kraft mill effluent. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 429 – 436.
- Consejo Nacional de Producción Limpia. (2005) Diagnóstico sectorial sector industria del papel.
- Cook, D.L., LaFleur, L., Parrish, A., Jones, J. & Hoy, D. 1997. Characterization of plant sterols from 22 US pulp and paper mills. *Water Science and Technology*, 35: 297 – 303.
- Corma, Corporación Chilena de la Madera. <http://www.corma.cl>
- Chamorro, S., Xavier, C. & Vidal, G. 2005. Behavior of aromatic compounds contained in kraft mill effluents treated by aerated lagoon. *Biotechnology Progress*, 21: 1567 – 1571.
- Chamorro, S., Xavier, C., Hernández, V., Becerra, J. & G. Vidal. 2009. Aerobic removal of stigmaterol contained in kraft mill effluents. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12 (2): 1 – 7.
- Chamorro, S., Pozo, G., Jarpa, M., Hernandez, V., Becerra, J. & Vidal, G. 2010a. Monitoring endocrine activity in kraft mill effluent Treated by aerobic moving bed bioreactor system. *Water Science and Technology*, 62 (1): 154 – 161.
- Chamorro, S., Hernández, V., Monsalvez, E., Becerra, J., Mondaca, M.A., Piña, B. & Vidal, G. 2010b. Detection of estrogenic activity from kraft mill effluents by yeast estrogen screen. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84: 165 – 169.

- Chamorro, S., Hernández, V., Matamoros, V., Domínguez, C., Becerra, J., Vidal, G., Piña, B. & Bayona, J. 2013. Chemical characterization of organic microcontaminant sources and biological effects in riverine sediments impacted by urban sewage and pulp mill discharges. *Chemosphere*, 90: 611 – 619.
- Chaparro, T.R. Botta, C.M. & Pires, E. C. 2010. Toxicity and recalcitrant compound removal from bleaching pulp plant effluents by an integrated system: anaerobic packed-bed bioreactor and ozone. *Water Science and Technology*, 61 (1): 199 – 205.
- Chen, G.Q. 2010. *Plastics from Bacteria, Natural Functions and Applications* (Steinbüchel, A.), Springer, 446 pp.
- Chen, H. & Li, X. 2008. Effect of static magnetic field on synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by activated sludge. *Bioresource Technology*, 99 (13): 5538 – 5544.
- Chiang, G., Munkittrick, K.R., Orrego, R. & Barra, R. 2010. Monitoring of the Environmental Effects of Pulp Mill Discharges in Chilean Rivers: Lessons Learned and Challenges. *Water Quality Research Journal of Canada*, 45 (2): 111 – 122.
- Chua, A. S., Takabatake, H., Satoh, H. & Mino, T. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research*, 37: 3602 – 3611.
- De los Santos Ramos, W., Poznyak, T., Chairez, I. & Cordova, R. 2009. Remediation of lignin and its derivatives from pulp and paper industry wastewater by the combination of chemical precipitation and ozonation. *Journal of Hazardous Materials*, 169: 428 – 434.
- Del Río, J., Romero, J. & Gutiérrez, A. 2000. Analysis of pitch deposits produced in kraft pulp mills using a totally chlorine free bleaching sequence. *Journal of Chromatography A*, 874: 235 – 245.
- Dias, J., Lemos, P., Serafim, L., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M., Ramos, A., Oliveira, R. & Reis, M. 2006. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromolecular Bioscience*, 6: 885 – 906.

- Diez, M., Castillo, G., Aguilar, L., Vidal, G. & Mora, M. 2002. Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus radiata* kraft mill wastewater. *Bioresource Technology*, 83: 131 – 138.
- D.S. N° 95 de 2001 (MINSEGPRES). Reglamento del sistema de evaluación de impacto ambiental
- D.S. N° 90 de 2000 (MINSEGPRES). Establece norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales
- Eskelinen, K., Särkkä, H., Agustiono, T. & Sillanpää, M. 2010. Removal of recalcitrant contaminants from bleaching effluents in pulp and paper mills using ultrasonic irradiation and Fenton-like oxidation, electrochemical treatment, and/or chemical precipitation: A comparative study. *Desalination*, 255: 179 – 187.
- Espuglas, S., Bila, D., Krause, L. & Dezzoti, M. 2007. Ozonization and advanced oxidation technologies disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 149: 631 – 642.
- Fernández, M., Ikonomu, M. & Buchanan, I. 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewater. *Science of the Total Environment*, 373: 250 – 269.
- Fontanier, V., Farines, V., Albert, J., Baig, S. & Molinier, J. 2006. Study of catalyzed ozonation for advanced treatment of pulp and paper mill effluents. *Water Research*, 40: 303 – 310.
- Forero, J., Ortiz, O. & Ríos, F. 2005. Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería. *Ciencia, Tecnología y Futuro*, 3: 97 – 109.
- Frigon, J., Stephenson, R., Larabéé, S. & Guiot, S. 1999. Biotreatment of resina acid by coupled anaerobic/aerobic integrated system. *Pulp and Paper Canada*, 100: 131 – 134.
- Gaete, H., Larrain, A., Bay-Schmith, E., Cifuentes, A., Rodriguez, J. & Baeza, J. 1999. Toxicidad crónica y características físico-química de aguas receptoras de efluentes de

industrias de celulosa, localizadas en la cuenca del rio Biobio (Chile Central). *Ecotoxicology and Environmental Protection*, 2: 15 – 18.

- García-Reyero, G., Grau, E., Castillo, M., Lopez de Alda, M., Barcelo, D. & Piña, B. 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (6): 1152 – 1158.
- Garcia-Segura, S. & Brillas, E. 2011. Mineralization of the recalcitrant oxalic and oxamic acids by electrochemical advanced oxidation processes using a boron-doped diamond anode. *Water Research*, 45: 2975 – 2984.
- Gogate, P. & Pandit, A. 2004. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, 8: 501 – 511.
- González, P. & Zaror, Cl. 2000. Effect of process modifications on AOX emissions from kraft pulp bleaching, using Chilean pine and eucaliptus. *Journal of Cleaner Production*, 8: 233 – 241.
- Gorenflo, V., Steinbuchel, A., Marose, S., Rieseberg, M. & Scheper, T. 1999. Quantification of bacteria polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 765 – 772.
- Guang-Guo, Y., Kookana, R. & Ru, Y. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environmental International*, 28: 545 – 551.
- Güçlü-Üstündag, Ö. & Temelli, F. 2004. Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 31: 235 – 253.
- Gutiérrez, A., Del Río, J., González-Vila, F. & Martín, F. 1998. Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 823: 449 – 455.
- Guzmán, C. & Zambrano, H. 2007. Compuestos disruptores endocrinos y su participación en la programación del eje reproductivo. *Revista de Investigación Clínica*, 59: 73 – 81.
- Hamm, U., Schabel, S. & Oeller, H. 2006. Comparison of the endocrine effects of treated

waste waters from different paper mills by use of an in-vitro test with modified yeast cells. Fate and effects of pulp and paper mill effluents Vitoria-Espirito Santo (Brasil), 9 - 12 de abril.

- Hansen, E., Zadura, L., Frankowski, S. & Wachowicz, M. 1999. Upgrading of an activated sludge plant with floating biofilm carriers at Frantschach Swiecie S.A. to meet the new demands of year 2000. *Water Science and Technology*, 40: 207 – 14.
- Herbert, R. Methods for enumeration and determination microorganism biomass in natural environments. In *Methods in microbiology techniques in microbial ecology*; Grigorova, R.; Norris, J., Eds.; London, 1990; 619 pp.
- Hewitt, L. M., Parrott, J., Wells, K., Calp, M., Biddiscombe, S., McMaster, M., Munkittrick, K. & Van Der Kraak, G. 2000. Characteristics of ligands for the Ah receptor and sex steroid receptors in fish exposed to bleached kraft mill effluent. *Environmental Science and Technology*, 34: 4327 – 4334.
- Hewitt, L., Parrot, J. & McMaster, M. 2006. A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluents in Canada: sources and characteristics of bioactive substances. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B*, 9: 341 – 356.
- Hewitt, L.M., Kovacs, T.G., Dubé, M.G., Maclatchy, D.L., Martel, P.H., McMaster, M.E., Paice, M.G., Parrot, J.L., Van Den Heuvel, M.R. & Van Der Kraak, G.J. 2008. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: roles of individual compounds and mill operating conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (3): 682 – 697.
- Hostachy, J. C., Lenon, G., Pisicchio, J.L, Coste, C. & Legay, C. 1997. Reduction of pulp and paper mill pollution by ozone treatment. *Water Science and Technology*, 35: 261 – 268.
- Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lujjohann, D., Mensink, R. & Trautwein. 2008. Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research*, 47: 37 – 49.
- INFOR. 2007. Análisis de la cadena productiva de la celulosa y el papel en países de ALC a la luz de los objetivos de desarrollo sostenible, su relación con los compromisos comerciales (OMC y TLCs) y ambientales (AMUMAs). Estudio de Caso Chile.

- Jahren, J., Rintala, J. & Odegaard, H. 2002. Aerobic moving bed biofilm reactor treating thermomechanical pulping whitewater under thermophilic conditions. *Water Research*, 36: 1067 – 75.
- Jamil, T., Ghaly, M., El-Seesy, I., Souaya, E. & Rabab, N. 2011. A comparative study among different photochemical oxidation processes to enhance the biodegradability of paper mill wastewater, *Journal of Hazardous Materials*, 185: 353 – 358.
- Jarpa, M., Pozo, G., Baeza, R., Martínez, M. & Vidal, G. 2012. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47: 1 – 8.
- Javid, A., Hassani, A., Ghanbari, B. & Yaghmaeian, K. 2013. Feasibility of utilizing Moving Bed Biofilm Reactor and Retrofit municipal wastewater treatment plants. *International Journal of Environmental Research*, 7 (4): 963 – 972.
- Jenkins, R., Wilson, E., Angus, R., Howell, W. & Kirk, M. 2003. Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent. *Toxicological Sciences*, 73: 53 – 59.
- Jiang, J.Q., Yin, Q., Zhou, J.L., & Pearce, P. 2005. Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters. *Chemosphere*, 61, 544 – 550.
- Jing, Y., Fong, M. & Lim, Ch. 2011. Optimization on thermophilic aerobic treatment of anaerobically digested palm oil mill effluent (POME). *Biochemical Engineering Journal*, 55: 193 – 198.
- Junna, J. & Ruonala, S. 1991. Trends and guidelines in water pollution control in the Finnish pulp and paper industry. *Tappi Journal*, 74 (7): 105 – 11.
- Kamaya, Y., Tokita, N. & Suzuki, K. 2005. Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 83 – 88.
- Kansal, S., Singh, M. & Sud, D. 2008. Effluent quality at kraft/soda agro-based paper mills and its treatment using a heterogeneous photocatalytic system, *Desalination*, 228: 183 – 190.

- Khan, Z. & Hall, E. 2003. Occurrence and removal of plant sterols in pulp and paper mill effluents. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 2: 17 – 26.
- Keshavarz, T. & Roy, I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Ecology and industrial microbiology*, 13: 321 – 326.
- Konduru, R., Liss, S. & Allen, D. 2001. Recalcitrant organics emerging from biological treatment of kraft mill effluents. *Water Quality Research Journal of Canada*, 36: 737 – 757.
- Kostamo, A. & Kukkonen, J. 2003. Removal of resin acids and sterols from pulp mill effluents by activated sludge treatment. *Water Research*, 37: 2813 – 2820.
- Kostamo, A. Holmbom, B. & Kukkonen, J. 2004. Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mills and mechanical pulp mills. *Water Research*, 38: 972 – 982.
- LaFleur L. 1996. Sources of pulping and bleaching derived chemical in effluents. Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents, M. Servos, K. Munkittrick, J. Carey, G. van der Kraak, (Eds), St Lucie Press, Delray Press, FL, 21 – 31.
- Lacorte, S., Latorre, A., Barceló, D., Rigor, A., Malmqvist, A. & Welander, T. 2006. Organic compounds in paper mill process water and effluents. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (10): 725 – 736.
- Lahdelma, I. & Oikari, A. 2005: Resin acids and retene in sediments adjacent to pulp and paper industry. *Journal of Soils and Sediments*, 5: 74 – 81.
- Larsson, P. & Dodson, S. 1993. Chemical communication in plankton animals. *Archives Hydrobiologia*, 129: 129 – 155.
- Larsson, D. Kinnberg, K., Sturve, J., Stephensen, E., Skön, M. & Förlin, L. 2002. Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 52: 13 – 20.
- Latorre, A., Malmqvist, A., Lacorte, S., Welander, T. & Barceló, D. 2007. Evaluation of the treatment efficiencies of paper mill whitewaters in terms of organic composition and toxicity. *Environmental Pollution*, 147: 648 – 655.
- Ledakowics, S., Michniewicz, M., Jagiella, A., Stufka-Olczyk, J. & Martynelis, M. 2006.

Elimination of resin acids by advanced oxidation processes and their impact on subsequent biodegradation. *Water Research*, 40: 3439 – 3446.

- Lee, S. Y. & Chang H. N. 1994. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures. *Journal of environmental polymer degradation*, 2 (3): 169 – 176.
- Lehtinen, K. & Tana, J. 1996. Assessing the aquatic environmental impact of ECF and TCF pulping operations using multispecies mesocosms and fish biomarker test. In: Turosky, W. (ed), Chlorine and Chlorine compounds in the paper industry. Ann Arbor Press, Chelsea, Michigan, pp. 151 – 168.
- Lee, S.Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoate. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 1 – 14.
- Leiviskä, T., Råmo, J., Nurmesniemi, H., Poykio, R. & Kuokkanen. 2009. Size fractionation of wood extractives, lignin and trace elements in pulp and paper mill wastewater before and after biological treatment. *Water Research*, 43: 3199 – 3206.
- Lewis, R., Van-Leeuwen, J., Smernik, R., Chow, C., Everson, A., Nothrop, S. & Beecham. 2011. Changes in the organic character of post-coagulated *Pinus radiata* sulfite pulp mill wastewater under aerated stabilization basin treatment—A laboratory scale study. *Chemical Engineering Journal*, 175: 160 – 168.
- Ley N° 19.300 de 1994 (MINSEGPRES). Ley de bases generales del medio ambiente.
- Linton, E., Scuton, D. & McKinley, R. 2005 Physiological effects of thermomechanical newsprint mill effluent on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 317 – 330.
- Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. & Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6 (3): 251 – 260.
- López, D., Chamorro, S., Silva, J., Bay-Schmith, E. & Vidal, G. 2011. Chronic effects of *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* kraft mill effluents on *Daphnia magna* and phytosterols. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87: 633 – 637.
- Lucas, M., Peres, J., Amor, C., Prieto-Rodríguez, L., Maldonado, M. & Malato, S. 2012.

Tertiary treatment of pulp mill wastewater by solar photo-Fenton. *Journal of Hazardous Materials*, 225 – 226: 173 – 181.

- MacLatchy, D., Peters, L., Nickle, J., Van der Kraak, G. 1997. Exposure to  $\beta$ -sitosterol alters the endocrine status of goldfish differently than  $17\beta$ -estradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1895 – 1904.
- Magnus, E., Hoel, H. & Carlberg, G. 2000. Treatment of an NSSC effluent in a biological high-efficiency compact reactor. *Tappi Journal*, 83: 149 – 56.
- Mahmood, T. & Elliott, A. 2006. A review of secondary sludge reduction technologies for the pulp and paper industry. *Water Research*, 40: 2093 – 2112.
- Malmqvist, A., Berggren, B., Sjolín, C., Welander, T., Heuts, L., Fransen, A. & Ling, D. 2004. Full scale implementation of the nutrient limited BAS process at Sodra Cell Varo. *Water Science and Technology*, 50 (3): 123 – 130.
- Mansilla, H., Yeber, M., Freer, J., Rodríguez, J. & Baeza, J. 1997. Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of a bleaching effluent from the pulp and paper industry. *Water Science and Technology*, 35 (4): 273 – 278.
- Marco, A., Splugas, S. & Saum. 1997. How and why combine chemical and biological process for wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 35: 321 – 327.
- Masten, S. & Davies, S. 1994. The use of ozonization to degrade organic contaminants in wastewaters. *Environmental Science and Technology*, 28: 180 – 185.
- Merayo, N., Hermosilla, D., Blanco, L., Cortijo, L., Blanco, A. 2013. Assessing the application of advanced oxidation processes, and their combination with biological treatment, to effluents from pulp and paper industry, *Journal of Hazardous Materials*, 262: 420 – 427.
- Monsálvez, E. 2007. Evidencia de compuestos con actividad estrogénica presentes en efluentes de celulosa kraft, mediante el uso de una cepa de levadura modificada. Tesis de pregrado, Universidad de Concepción, Centro-EULA. CHILE, 57 pp.
- Munkittrick, K., Van der Kraak, G., McMaster, M., Portt, C., Van den Heuvel, M. & Servos, M. R. 1994. Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from

pulp mill. II. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. *Environmental Toxicology Chemistry*, 13: 1089 – 1101.

- Muñoz, I., Rieradevall, J., Torrades, F., Peral, J. & Domènech, X. 2006. Environmental assessment of different advanced oxidation processes applied to a bleaching kraft mill effluent. *Chemosphere*, 62: 9 – 16.
- Navia, R., Levet, L., Mora, M., Vidal, G. & Diez, M. 2003. Allophanic soil adsorption system as a bleached kraft mill aerobic effluent post-treatment. *Water air and Soil Pollution*, 148: 323 – 333.
- NCh 2083 /1999. Bioensayos de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Instituto Nacional de Normalización, 1ª ed, Santiago, Chile.
- Nishida, H. & Tokiwa, Y. 1992. Distribution of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and poly( $\alpha$ -caprolactone) degrading microorganisms and microbial degradation behavior on plastic surfaces. *Polymeric Materials: Science and Engineering*, 67: 137 – 138.
- Oakes, R., Gido, K., Falke, J., Olden, J. & Brock, B. 2005. Modelling of stream fishes in the Great Plains, USA. *Ecology of Freshwater Fish* 14:1 – 14.
- Odegaard, H. 2000. Advanced compact wastewater treatment based on coagulation and moving bed biofilm processes. *Water Science and Technology*, 42 (12) 33 – 48.
- Odegaard, H., Gisvold, B. & Strickland, J. 2000. The Influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process. *Water Science and Technology*, 41(4): 383 – 391.
- Odegaard, H 2006 Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm process. *Water Science and Technology*, 53: 17 – 33.
- Oller, I., Malato, S. & Sanchez, J. 2011. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination-A review. *Science of the Total Environment*, 409: 4141 – 4166.
- Olmstead, A. & LeBlanc, G. 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex Characteristics of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2107

– 2113.

- Orrego, R., Moraga, G., Gonzáles, M., Gavilán, J., Valenzuela, A., Burgos, A. & Barra, R. 2005. Reproductive, physiological and biochemical response in juvenile female rainbow trout exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 1935 – 1943.
- Orrego, R., Burgos, A., Moraga, G., Inzunza, B., Gonzales, M., Valenzuela, A., Barra, R. & Gavilán J. 2006. Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): biomarker responses along a pollution gradient in the Biobío river, Chile. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (9): 2280 – 2287.
- Pavez, P., Castillo, J., Gonzalez, C. & Martinez, M. 2009 Poly- $\beta$ -Hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbón starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Current Microbiology*, 59: 636 – 640.
- Peng, G. & Roberts, J. 2000. Solubility and toxicity of resin acid. *Water Research*, 34: 2779 – 2785.
- Pérez, M., Torrades, F., Garcia-Hortal, J., Doménech, X. & Peral, J. 2002. Removal of organic contaminants in paper pulp treatment effluents under Fenton and photo-Fenton conditions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 36: 63 – 74.
- Pérez, M., Graells, M., Del Valle, L., Centelles, E., Mansilla, H., 2007. Fenton and Photo-Fenton degradation of 2-chlorophenol: Multivariate analysis and toxicity monitoring. *Catalysis Today*, 124: 163 – 171.
- Pettinari M.A., De Almeida, A., Ruiz, J. & López, N. 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. Publicación online: *Revista Química Viva*.
- Plattes, M., Fiorelli, D., Guille, S., Girard, C., Henry, E., Minette, F., O’Nagy, O. & Schossler, P. 2007. Modelling and dynamic simulation of a moving bed bioreactor using respirometry for the estimation of kinetic parameters. *Biochemical Engineering Journal*, 33: 253 – 259.
- Poirier, Y., Nawrath, C. & Somerville, C. 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology*, 13: 142 –

150.

- Pokhrel, D. & Viraraghavan, T. 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater-A review. *Science of the Total Environment*, 333: 37 – 58.
- Pozo, G., Villamar, A., Martínez, M. & Vidal, G. Polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis from kraft mill wastewaters: origin and biomass C: N relationship influence. *Water Science and Technology*, 63: 449 – 455.
- Pozo, G., Villamar, A., Martínez, M. & Vidal, G. 2012. Effect of organic load and nutrient ratio on the operation stability of the moving bed bioreactor for kraft mill wastewater treatment and the incidence of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Water Science and Technology*, 66 (2): 370 – 376.
- Punrattanasin, W., Randall, A. & Randall, C. 2006. Aerobic production of activated sludge polyhydroxyalkanoates from nutrient deficient wastewaters. *Water Science and Technology*. 54: 1 – 8.
- Quinn, B., Booth, M., Delfino, J., Holm, S. & Gross, T. 2003. Selected resin acids in effluent and receiving waters derived from a bleached and unbleached kraft pulp and paper mill. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (1), 214 – 218.
- Raghuvver, S. & Sastry, C. 1991. Biological treatment of pulp mill wastewater and study of biokinetic constants. *Indian Journal of Environmental Protection*, 11 (8):614 – 21.
- Rodrigues, A., Boroski, M., Shimada, N., Garcia, J., Nozaki, J. & Hioka, N. 2008. Treatment of paper pulp and paper mill wastewater by coagulation-flocculation followed by heterogeneous photocatalysis, *Jornal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 194: 1 – 10.
- Rintala, J. & Puhakka, J. 1994. Anaerobic treatment in pulp and paper mill-waste management: a review. *Bioresearch Technology*, 47: 1 – 18.
- Rosa, R., Moreira-Santos, M., Lopes, I., Silva, L., Rebola, J., Mendonça, E., Picado, A. & Ribeiro, R. 2010. Comparison of a test battery for assessing the toxicity of a bleached-kraft pulp mill effluent before and after secondary treatment implementation. *Environmental Monitoring and Assessment*, 161 (1-4): 439 – 451.

- Routledge, J. & Sumpter, J. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 241 – 248.
- Rusten, B., Mattsson, E., Due, B. & Westren, T. 1994. Treatment of pulp and paper industry wastewaters in novel moving bed biofilm reactors. *Water Science and Technology*, 30 (3):161 – 71.
- Rusten, B., Ulgen, Y., Lygren, E. & Eikebrokk, B. 2006. Design and Operations of the moving bed biofilm reactor Kaldnes. *Aquacultural Engineering*, 34: 322 – 331.
- Sandström, O. 1994. Incomplete recovery in a coastal fish community exposed to effluent from a modernized Swedish bleached kraft mill. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51: 2195 – 2205.
- Sandström, O., Forlin, L., Grahn, O., Larsson, A. & Lindesjö, E. 2003. Assessments of the environmental impact of Swedish pulp and paper mill effluents at beginning of the next century. In Stuthridge, T., Van del Heuvel, M., Marvin, N., Slade, A. & Gifford, J., Environmental Impacts of Pulp and Paper Waste Streams. SETAC, Pensacola, FL, USA, pp 499 – 504.
- Satoh, H., Mino, T & Matsuo, T. 1999. PHA production by activated sludge. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25: 105 – 109
- Schumann R., Schiewer U., Karsten U. & Rieling, T. 2003. Viability of bacteria from different aquatic habitats. Cellular fluorescent markers for membrane integrity and metabolic activity. *Aquatic Microbial Ecology*, 32 (1): 137 – 150.
- Serafim, L., Lemos, P., Torres, C., Reis, M. & Ramos, A. 2008. The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates produced by mixed cultures. *Macromolecular Bioscience*, 8: 355 – 366.
- Schnell, A., Steel, P., Melcer, H., Hodson, P. & Carey, J. 2000. Enhanced biological treatment of bleached kraft mill effluents: I. Removal of chlorinated organic compounds and toxicity. *Water Research*, 34 (2): 493 – 500.

- Simonic, M., Vnucec D. 2012. Coagulation and UF treatment of pulp and paper mill wastewater in comparison. *Central European Journal of Chemistry*, 10 (1): 127 – 136.
- Srivastava, V., Mall, I. & Mishra, I. 2005. Treatment of pulp and paper mill wastewaters with poly aluminium chloride and bagasse fly ash. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 260: 17 – 28.
- Stoica, A., Sandberg, M. & Holby, O. 2009. Energy use and recovery strategies within wastewater treatment and sludge handling at pulp and paper mills. *Bioresource Technology*, 100: 3497 – 3505.
- Strömberg, L., Mörck, R., de Souza, F. & 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.
- Stephenson, R. & Duff, S. 1996a. Coagulation and precipitation of a mechanical pulping effluent- I. Removal of carbon, colour and turbidity. *Water Research*, 30 (4): 781 – 792.
- Stephenson, R. & Duff, S. 1996b. Coagulation and precipitation of a mechanical pulping effluent—II. Toxicity removal and metal salt recovery. *Water Research*, 30 (4):793 – 798.
- Stuthridge, T., Campin, D., Langdon, A., Mackie, K., Mcfarlane, P. & Wilkins, A. 1991. Treatability of bleached kraft pulp and paper mill wastewaters in a New Zealand aerated lagoon treatment system. *Water Science and Technology*, 24: 309 – 17.
- Sumpter, J. 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 33: 9 – 16.
- Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T. & Matsuo, T. 2002. PHA (polyhydroxyalkanoate) production potential of activated sludge treating wastewater. *Water Science and Technology*, 45: 119 – 126.
- Tavendale, M.H., McFarlane, P.N., Mackie, K.L., Wilkins, A.L. & Langdon, A.G. 1997. The fate of resin acids—1. The biotransformation and degradation of deuterium labelled dehydroabietic acid in anaerobic sediments. *Chemosphere*, 35: 2137 – 2151.

- Tobella, M., Bunster, M., Pooley, A., Becerra, J., Godoy, F. & Martínez, M. 2005. Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Wautersia* sp. PZK cultured in cellulose pulp mill effluents containing 2,4,6-trichlorophenol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*: 32, 397 – 401.
- Thompson, G., Swain, J. & Forster, M. 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Technology*, 77: 275 – 286.
- Torrades, F., Montserrat, P., Mansilla, H. & Peral, J. 2003. Experimental design of Fenton and Photo-Fenton reactions for the treatment of cellulose bleaching effluents. *Chemosphere*, 53: 1211 – 1220.
- USEPA. 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and Receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-91/002. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- USEPA (1994). Methods for measuring the toxicity of sediment associated contaminants with estuarine and marine amphipods EPA-600/R-94/025. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Van Der Kraak, G., Munkittrick, K., McMaster, M., Portt, C. & Chang, J. 1992. Exposure to bleached kraft pulp and paper mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115: 224 – 233.
- Verta, M., Ahtiainen, J., Nakari, T., Langi, A. & Talka, E. 1996. The effect of waste constituents on toxicity of TCF and ECF pulp bleaching effluents. In: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, M. R. Servos, K. R. Munkittrick, J. H. Carey, G. J. Van der Kraak, (Eds.), St Lucie Press, Delray Press, FL., pp. 41-51.
- Vidal, G., Navia, R., Levet, L., Mora, M. L. & Diez, M. 2001. kraft mill anaerobic effluent color enhancement by a fixed-bed adsorption system. *Biotechnology Letters*, 23: 861 – 865.
- Vidal, G., Belmonte, M., Calderón, M. & Chamorro, S. 2007. Significativos avances ambientales registra en Chile la industria de celulosa kraft blanqueada. *Induambiente*, 15 (87): 6 – 30.

- Villamar, C., Jarpa, M., Decap, J. & Vidal, G. 2009. Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* as raw material. *Water Science and technology*, 59: 507 – 514.
- Wang, F. & Lee, S. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4765 - 4769.
- Wang, Y., Hua, F., Tsang, Y., Chan, S., Sin, S., Chua, H., Yu, P. & Ren, N. 2007. Synthesis of PHAs from waster under various C: N ratios. *Bioresource Technology*, 98: 1690 – 1693.
- Wei, Y., VanHouten, R.T., Borger, A.R., Eikelboom, D.H. & Fan, Y. 2003. Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment. *Water Research*, 37: 4453 – 4467.
- Welander, T., Lofqvist, A. & Selmer, A. 1997. Upgrading aerated lagoons at pulp and paper mills. *Water Science and Technology*, 35: 117 – 22.
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S. & Wert, E. 2005. Fate of endocrine-disrupter, pharmaceuticals and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment process. *Environmental Science and Technology*, 39: 6649 – 6663.
- Wu, H., Sheu, D. & Lee, C. 2003. Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods*, 53: 131 – 135.
- Xavier, C., Chamorro, S. & Vidal, G. 2005 Chronic effects of kraft mill effluents and endocrine active chemical on *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75: 670 – 676.
- Xavier C., Belmonte M., Chamorro S., Oñate E., Mondaca M. & Vidal G. 2006a. kraft pulp mill effluent treated by activated sludge and aerated lagoon. Evaluation by ultrafiltration, toxicity and genotoxicity assays. 8º Simposio da IWA em Efluentes da Indústria Florestal, Vittoria (Brasil), 9 -12 de Abril.

- Xavier, C. 2006b. Influencia de la tecnología de tratamiento en la eliminación de fitoesteroles contenidos en efluentes de celulosa kraft y en la toxicidad de estos compuestos en organismos acuáticos, y de genotoxicidad en organismos bacterianos. Tesis doctoral, Universidad de Concepción, Centro-EULA. CHILE, 165 pp.
- Xavier, C., Mosquera-Corral, A., Becerra, J., Hernández, V. & Vidal, G. 2009. Activated sludge versus aerated lagoon treatment of kraft mill effluents containing  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 44: 327 – 335.
- Yan, S., Tyagi, R. & Surampalli, Y. 2006. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms. *Water Science and Technology*, 53, 175 – 180.
- Yeber, M. C., Freer, J., Martinez, M. & Mansilla, H. D. 2000. Bacterial response to photocatalytic degradation of 6-chlorovanillin. *Chemosphere*, 41: 1257 – 1261.
- Ying, G., Kookana, R. & Waite, T. 2004. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in reclaimed water in Australia, Australian Water Conservation Reuse Research Program, 2004.
- Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. & Wert, E. 2006. Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. *Journal of Membrane Science*. 270: 88 – 100.

**ANEXO II**

## **CURRICULUM VITAE**

## **1. DATOS PERSONALES**

Nombre: Mayra Andrea Jarpa López

Fecha de nacimiento: 16 de diciembre de 1981

Lugar de nacimiento: Concepción

Nacionalidad: Chilena

E-mail: mayjarpa@udec.cl

## **2. ANTECEDENTES DE FORMACION**

2006. Biólogo Marino

2009. Doctor (Candidato) en Ciencias Ambientales con mención en Sistemas Acuáticos Continentales – Concepción, Chile.

## **3. ESTADIAS DE INVESTIGACION**

**2007.** Estadaía como joven investigador - Departamento de Ingeniería Química, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España. Financiada por el Proyecto Europeo Alfa AML/B7-311/97/0666/II-0311-FA-FCD-FI-FC “Ciencia e Ingeniería para la Protección Ambiental” – red INGAM. Objetivos: Aprendizaje de técnicas analíticas y empleo de técnicas moleculares para la identificación de poblaciones bacterianas en sistemas biológicos”. Inicio: 10 de Abril del 2007 – Término: 10 de Octubre del 2007.

## **4. EXPERIENCIA EN DOCENCIA**

### **4.1. Co-guía de tesis**

**2011.** “Determinación de disrupción endocrina en efluentes de la industria de papel a través del biosensor *Saccharomyces cerevisiae* recombinante”, realizado por Srta. Roció Baeza, alumna de

la carrera de Bioingeniería de la Universidad de Concepción (Julio 2010 – Diciembre 2011).  
Profesor Guía: Dra. Gladys Vidal.

**2012.** “Evaluación de estigmasterol contenido en efluentes de celulosa kraft a través de sistema combinado biológico aeróbico y físico químico” realizado por Sr. Juan Pablo Vergara de la carrera de Ingeniería Ambiental, Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile, Universidad de Concepción (Inicio: Julio de 2012). Profesor Guía: Dra. Gladys Vidal.

**2012.** “Determinación de efectos subletales y crónicos en *Daphnia magna* expuestas a efluente de celulosa kraft” realizado por Srta. Paulina Brito, alumna de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Marina y Acuicultura, de la Universidad de Concepción (Julio de 2012 – Diciembre 2012). Profesor Guía: Dra. Gladys Vidal.

**2012.** “Eliminación de amonio por sistemas biológicos en aguas de cultivo de salmones” realizado por Sr. Patricio Sanhueza alumno de la carrera de Bioingeniería de la Universidad de Concepción (Inicio: Marzo 2012). Profesor Guía: Dra. Gladys Vidal.

#### **4.2. Otras actividades de docencia**

**2011.** Colaboración en la dirección del proyecto de Acuerdo de Producción Limpia: “Valorización de efluentes de la Industria Papelera mediante la producción de polihidroxicanoatos (PHA) a través de un reactor de biopelícula de Lecho Móvil (MBBR)”, realizado por Roció Baeza, alumna de la carrera de Bioingeniería de la Universidad de Concepción. (Julio 2011 - Diciembre 2011)

### **5. PUBLICACIONES**

#### **5.1 Publicaciones indexadas**

**Jarpa, M.**, Aguilar, A., Belmonte, M., Decap, J., Abarzúa, M. & Vidal, G. 2007. Determinación de la capacidad nitrificante de un sedimento marino proveniente de un centro de cultivo de salmones. *Interciencia*. 32(10): 679 – 685.

Vázquez-Padín, J., Pozo, M., **Jarpa, M.**, Figueroa, M., Franco, A., Mosquera-Corral, A., Campos, J. & Méndez, R. 2009. Treatment of anaerobic sludge digester effluents by the CANON process in an air pulsing SBR. *Journal of Hazardous Materials*, 166: 336 – 341.

Villamar, C., **Jarpa, M.**, Decap, J. & Vidal, G. 2009. Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* as raw material. *Water Science and technology*, 59 (3): 507 – 514.

Chamorro, S., Pozo, G., **Jarpa, M.**, Hernandez, V., Becerra, J. & Vidal, G. 2010. Monitoring endocrine activity in kraft mill effluent treated by aerobic moving bed bioreactor system. *Water Science and technology*, 62 (1): 154 – 161.

**Jarpa, M.**, Pozo, G. Baeza, R., Martínez, M y Vidal, G. 2012. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47: 2052 – 2059.

## **5.2 Publicaciones No indexadas con comité editorial**

Monsálvez, E., **Jarpa, M.**, Xavier, C. & Vidal, G. 2009. Evaluación de tecnologías de tratamiento biológicas convencionales para eliminar potencial estrogénico de efluentes de celulosa kraft. *Tecnología del agua*, 29: 54 – 62.

## **5.3 Capítulos de libros**

Vidal, G., **Jarpa, M.**, Plaza de los Reyes, C., Belmonte, M. & Mariangel, L. 2009. Sistemas de Tratamiento convencional v/s sistemas naturales. En: Manual de tecnologías sostenibles en tratamiento de aguas. Editores: J. Morató, G., Peñuelas. Divergraficas Ltda. PBX: 5117616 (Medellín, Colombia), ISBN 978-958-44-5307-5, p. 31 – 42.

## **6. CONTRIBUCIONES A CONGRESOS**

### **6.1 Congresos internacionales**

Belmonte M., **Jarpa M.**, Arami J.L. & Vidal, G. 2007. Swine wastewater treatment by a combined system: preliminary results. 21st Century Watershed Technology: Improving water quality and environment: 29-3 April. Concepcion (Chile).

Vázquez-Padín J.R., Pozo M., **Jarpa M.**, Figueroa M., Franco A., Mosquera-Corral A., Campos J.L. & Méndez R. 2007. "Treatment of anaerobic sludge digester effluents by the CANON process

in an air pulsating SBR". 2nd International Conference on Engineering for Waste Valorisation. 3 – 5 Junio. 2008. Patras, Grecia.

**Jarpa, M.**, Pozo, G., Decap, J. & Vidal, G. 2008. Influencia de la razón inóculo – sustrato sobre la biodegradación de un inóculo de piscicultura. IX Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia, IWA. Isla de Pascua, Chile, 19 al 23 de Octubre.

**Jarpa, M.**, Baeza, R., Pozo, G., Martínez, M. & Vidal, G. 2012. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by moving bed biofilm reactor (MBBR) treating a paper mill wastewater. 10th IWA Symposium on Forest Industry Wastewaters. Concepción, Chile, 8 – 11 de Enero de 2012.

**Jarpa, M.**, Baeza, C. & Vidal, G. Removal of recalcitrant organic compounds in pulp and paper effluents under advanced oxidation processes (AOPs): a Review. 10th IWA Symposium on Forest Industry Wastewaters. Concepción, Chile. 8 al 11 de Enero de 2012.

Baeza, R., **Jarpa, M.** & Vidal, G. 2012. Obtención de poliésteres biodegradables como subproducto del tratamiento de efluentes de la industria papelera. III Congreso Latinoamericano Biorrefinerías. Pucón, Chile. 19 – 21 de Diciembre de 2012.

Vergara, J., Chamorro, S., **Jarpa, M.** & Vidal, G. 2012. Obtención de estigmasterol como subproducto de efluente de celulosa kraft. III Congreso Latinoamericano Biorrefinerías. Pucón, Chile. 19 – 21 de Diciembre de 2012.

## **6.2 Congresos nacionales**

**Jarpa, M.**, López, D., Chamorro, S., Monsálvez, E. & Vidal, G. 2008. Efecto de la concentración de nutrientes en la biodegradación de materia orgánica y compuestos disruptores con actividad estrogénica. XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Santiago 12 – 15 de Octubre.

Monsálvez, E., **Jarpa, M.**, Olivares, A., Piña, B. & Vidal, G. 2009. Uso de Biosensores para la Evaluación de Actividad Estrogénica, antiestrogénica y Dioxin-Like: una herramienta para la

Gestión de Recursos Hídricos. XVIII Congreso Chileno de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Pucón, 23 – 25 de Noviembre.

Chamorro, S., Pozo, G., **Jarpa, M.**, Hernández, V., Becerra, J. & Vidal, G. 2009. Monitoreo de la Actividad Estrogénica en un Efluente de celulosa kraft tratado a través de un Sistema MBBR. XVIII Congreso Chileno de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Pucón, 23 – 25 de Noviembre.

**Jarpa, M.**, Fernández, G., Martínez, M. & Vidal, G. 2010. Polihidroxialcanoato en bacterias aeróbicas usado como indicador de estabilidad en sistemas de tratamiento de efluentes de industria papelera. LIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile, Santa Cruz, 21 – 24 de Noviembre.

**Jarpa, M.**, Pozo, G., Baeza, R., Martínez, M., Vidal, G. 2011. Revalorización de lodos de la industria forestal mediante producción de polihidroxialcanoatos como subproducto del tratamiento. XIV Jornadas Técnicas de la Celulosa y el Papel, Concepción, 16 – 17 Noviembre.

**Jarpa, M.**, Vergara, J., Chamorro, S., Vidal, G. 2012. Evaluación de toxicidad en efluentes secundarios y terciarios de celulosa kraft mediante el bioindicador *Daphnia magna*. LV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Puerto Varas, 19 – 22 de Noviembre.

**Jarpa, M.** & Vidal, G. 2013. Selección de cepas nitrificantes en lodos provenientes de engorda de salmones, Puerto Montt, 16 – 18 de Enero.

Sanhueza, P., **Jarpa, M.**, Pozo, G., Baeza, C. & Vidal, G. 2013. Operación de un sistema de lodos activados para eliminación de amonio presente en aguas de cultivo de salmones, Puerto Montt, 16 – 18 de Enero.

## **7. MANEJO DE SOFTWARE**

Paquete Office (Word, Excel, Power Point), Programas Estadísticos (Origin, Provit, Toxstat, Modde).

## **8. BECAS, PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS**

**2007.** Premio mejor tesis de la carrera de Biología Marina durante segundo semestre del año 2006, Universidad de Concepción.

**2008.** Beca para estudios de doctorado en Chile – Año 2008. Descripción: Beca de pago de matrícula y mantenimiento para realizar estudios de doctorado en Universidad de Concepción, por 4 años. Financiada por: Conicyt, Gobierno de Chile, Santiago, Chile.

**2010.** Beca de Apoyo de la Realización de Tesis Doctoral – Año 2010. Descripción: Fondos para realizar proyecto de tesis de doctorado en universidades chiles por periodo de 2 años. Financiada por: Conicyt, Gobierno de Chile, Santiago, Chile.

## **ANEXO II**

### **PORTADA DE ARTÍCULOS PUBLICADOS**

## Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor

MAYRA JARPA<sup>1</sup>, GUILLERMO POZO<sup>1</sup>, ROCÍO BAEZA<sup>1</sup>, MIGUEL MARTÍNEZ<sup>2</sup> and GLADYS VIDAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Environmental Sciences Center EULA-Chile, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

<sup>2</sup>Microbiology Department, University of Concepción, Concepción, Chile

Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in paper mill wastewater treated by a Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) was evaluated. A MBBR was operated during 300 d. The increasing effect of the Organic Load Rate (OLR) from 0.13 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>-d to 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>-d and the influence of two relationship of BOD<sub>5</sub>: N: P (100: 5: 1 and 100: 1: 0.3) on the PHA biosynthesis were evaluated. With an OLR of 0.13 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>-d, the maximum organic matter removal measure as Biochemical Oxygen Demand (BOD<sub>5</sub>) was 98.7% for a BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100: 5: 1. Meanwhile for BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100: 1: 0.3, the maximum efficiency was 87.2% (OLR: 2.99 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>-d). The behaviour of the Chemical Oxygen Demand (COD) and total phenolic compound removal efficiencies were below 65.0% and 41.0%, respectively. PHA biosynthesis was measured as a percentage of cells that accumulate PHA, where the maximum percentage was 85.1% and 78.7% when MBBR was operated under a BOD<sub>5</sub>: N: P relationship of 100: 5: 1 and 100: 1: 0.3, respectively. Finally, the PHA yields in this study were estimated to range between 0.11 to 0.72 mg PHA/mg VSS and 0.06 to 0.15 mg PHA/mg COD.

**Keywords:** Paper mill wastewater, MBBR, sludge, polyhydroxyalkanoates, organic matter.

### Introduction

The Chilean paper industry has rapidly developed with an approximate annual production of 1,335 tons paper. Effluents treatment consists in primary and secondary treatments. Primary treatment removes suspended solids between 80.0–90.0%,<sup>[1]</sup> secondary treatment, performed mainly in activated sludge, removes between 73.5–99.2% Biochemical Oxygen Demand (BOD<sub>5</sub>) and 50.0–92.4% Chemical Oxygen Demand (COD) when the reactor is operated under HRT (Hydraulic Retention Time) from 12 to 42 h with and OLR from 0.07 to 0.21 kg BOD<sub>5</sub>/kg VSS-d.<sup>[1–3]</sup> At present, the attached biomass system MBBR has been successfully used to treat forest industry wastewater, removing high concentrations of organic pollutants and preventing sludge recirculation of sludge at low operating costs.<sup>[4–6]</sup> Removal efficiencies achieved ranged between from 85.0–99.0% for BOD<sub>5</sub> and 24.0–82.0% COD with HRT between 1.7 to 85 h and OLR from 0.07 to 1.19 kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>-d.<sup>[7,8]</sup>

During its operation, several tons of excess sludge are generated due to the BOD<sub>5</sub> removed (1.8–3.5 ton

sludge/ton BOD<sub>5</sub>), and has become a troublesome issue.<sup>[9]</sup> One value-adding process for BOD<sub>5</sub>, under specific treatment conditions is the enrichment of biosolids with polyhydroxyalkanoate (PHA) production. PHA are accumulated as intracellular granules under stress conditions of excess carbon source and nutrient limitation (nitrogen: N and phosphorus: P).<sup>[10]</sup> The main substrate required for PHA biosynthesis is the presence of VFA as carbon source.<sup>[11]</sup>

Some studies in the literature show a maximum content of PHA between 17 to 20% for the sludge dry weight from kraft mill wastewater.<sup>[11]</sup> Pozo et al.<sup>[8]</sup> studied the influence of the relationship of BOD<sub>5</sub>: N: P, finding that 100: 1: 0.2 was optimal for PHA production of 25.7% and 30.4% for dry weight of sludge for inoculum from the paper industry and kraft mill industry, respectively. Although paper mill wastewater shows that a maximum PHA production of 48% for dry weight of sludge was obtained when operating an activated sludge.<sup>[9]</sup> The objective of this work is to evaluate the feasibility of polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater by a MBBR.

### Materials and methods

#### Raw wastewater

The carbon source was paper mill wastewater, obtained after primary treatment of *Pinus radiata* with Pressure

Address correspondence to Gladys Vidal, Environmental Sciences Center EULA-Chile, Universidad de Concepción, P. O. Box 160–C, Concepción, Chile; E-mail: glvidal@udec.cl  
Received January 30, 2012.