



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION  
CENTRO EULA-CHILE**



**INFORME FINAL PROYECTO:**

**PROGRAMA DE MONITOREO ECOTOXICOLÓGICO  
DE LOS EFLUENTES INDUSTRIALES EN EL RIO  
CRUCES, PROVINCIA DE VALDIVIA CHILE**

**CAPITULO 2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD  
AGUDA Y CRÓNICA**

Julio, 2007

## INDICE

### CAPITULO 2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA

1	<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
2	<b>METODOLOGÍA</b>	4
2.1	<b>BIOENSAYOS EFLUENTES</b>	4
2.1.1	<i>Bioensayo de toxicidad aguda con juveniles de <i>Hyaella gracilicornis</i> Gonz.</i>	4
2.1.2	<i>Bioensayo agudo con el microcrustáceo <i>Daphnia obtusa</i> Kurz y <i>Daphnia magna</i>.</i>	5
2.1.3	<i>Bioensayo agudo con trucha arcoiris, <i>Oncorhynchus mykiss</i> Walbaum</i>	6
2.1.4	<i>Bioensayo crónico con la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> Printz.</i>	7
2.1.5	<i>Bioensayo crónico con <i>Lemna valdiviana</i> Phil.</i>	8
2.1.6	<i>Bioensayo crónico con <i>Daphnia obtusa</i> Kurz.</i>	9
2.1.7	<i>Verificación de la Calidad de los Organismos de Ensayo</i>	10
2.1.8	<i>Tratamiento estadístico de los datos generados con los bioensayos</i>	10
2.1.9	<i>Estimación de las Unidades Tóxicas</i>	10
2.2	<b>ESTUDIOS DE FASE SÓLIDA</b>	
2.2.1	<i>Bioensayo de sobrevivencia y crecimiento en el anfípodo <i>Hyaella gracilicornis</i> Gonz.</i>	11
2.2.2	<i>Bioensayo de inhibición de la germinación y del crecimiento de plántulas en sedimento con semillas de vegetales herbáceos (lechuga, rábano y trigo).</i>	11
3.	<b>RESULTADOS</b>	13
3.1	<b>BIOENSAYOS DE EFLUENTES</b>	13
3.1.1	<i>Bioensayo de toxicidad aguda con juveniles de <i>Hyaella gracilicornis</i> Gonz.</i>	13
3.1.2	<i>Bioensayo agudo con el microcrustáceo <i>Daphnia obtusa</i> Kurz.</i>	14
3.1.3	<i>Bioensayo agudo con trucha arcoiris, <i>Oncorhynchus mykiss</i> Walb. Y <i>Gambussi affinis</i>.</i>	14
3.1.4	<i>Bioensayo crónico con la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> Printz.</i>	16
3.1.5	<i>Bioensayo crónico con <i>Lemna valdiviana</i> Phil.</i>	18
3.1.6	<i>Bioensayo crónico con <i>Daphnia obtusa</i> Kurz.</i>	21
3.2.	<b>ESTUDIOS DE FASE SÓLIDA.</b>	23
3.2.1	<i>Bioensayo de sobrevivencia y crecimiento en el anfípodo <i>Hyaella gracilicornis</i> Gonz.</i>	23
3.2.2	<i>Bioensayo de inhibición de la germinación y del crecimiento (en función del peso) de plántulas en el sedimento</i>	26
3.3	<b>EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL AGUA DEL SANTUARIO CARLOS ANDWANTER (VALDIVIA).</b>	30
3.4	<b>VERIFICACIÓN DE TOXICIDAD SOBRE GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN SEDIMENTOS.</b>	31
4.	<b>CONCLUSIONES</b>	34
5.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	40

## CAPITULO 2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA

### 1. INTRODUCCIÓN

Los bioensayos de toxicidad son una herramienta de uso regular en los países desarrollados para evaluar la calidad de los residuos líquidos respecto al riesgo que implican para la biota que reside en los cuerpos receptores de los efluentes. Esta técnica, avalada por las instituciones que velan por la protección del ambiente como la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos (US EPA) o aquellas que estipulan métodos de estudio de la contaminación ambiental en la Comunidad o Unión Europea (UE), tiene la ventaja de evaluar en forma integrada la ecotoxicidad del conjunto de constituyentes con propiedades tóxicas de una muestra y las interacciones entre ellos.

En la evaluación de la contaminación acuática los bioensayos de toxicidad son necesarias, debido a que las pruebas fisicoquímicas no resultan suficientes para la valoración de los potenciales efectos sobre los organismos en diversos ecosistemas, no siendo posible determinar, por ejemplo, la interacción de los factores químicos y los efectos tóxicos de los contaminantes. Por lo tanto, un ensayo de toxicidad es una herramienta complementaria que permite detectar y evaluar la capacidad inherente de un agente de producir efectos tóxicos sobre organismos vivos utilizando especies de prueba.

El bioensayo de toxicidad consiste en exponer a un grupo de organismos de una determinada especie a un gradiente de diluciones de una muestra durante un tiempo predeterminado y bajo condiciones estandarizadas en un laboratorio. El objetivo es cuantificar el grado de daño que la muestra puede ocasionar en los organismos expuestos a ella. En evaluaciones de toxicidad aguda el efecto medible es la mortalidad y en evaluaciones de toxicidad crónica los efectos son subletales que comúnmente se determinan mediante la reducción del crecimiento o la variación en el número de descendientes. En una muestra sin toxicidad los organismos expuestos a la muestra al 100 %, no manifestarán daño o no habrá diferencias significativas en el parámetro medido respecto al grupo control.

La diversidad de organismos que se encuentran en la naturaleza se refleja en la variedad de procesos metabólicos y compuestos químicos de los cuales depende la vida en sus diferentes niveles de expresión, desde bacterias a plantas y animales superiores. Una sustancia con propiedades tóxicas puede serlo para un tipo de organismo pero no para otro, dependiendo con que compuestos de la célula interactúa. Por ello, se considera que tres (3) es el mínimo de especies con las cuales se debe evaluar la toxicidad de una muestra, incluyendo representantes de organismos fotosintéticos (microalgas) y animales de dos niveles de complejidad, un invertebrado como el crustáceo (pulga de agua) *Daphnia* y un vertebrado como alguna especie de pez.

- a) En términos de toxicidad deberá evaluarse la toxicidad aguda y la toxicidad crónica. La primera se entiende como, aquellos efectos tóxicos que se manifiestan en un período breve de tiempo, generalmente medido en días. Existen en la actualidad protocolos internacionales para cuantificar esta toxicidad, los cuales plantean la necesidad de trabajar con una batería de especies que representen a los distintos niveles tróficos del

sistema bajo estudio. Estos protocolos pueden adaptarse para trabajar con especies nativas o presentes en el sistema bajo estudio o monitoreo.

- b) De la misma manera, se puede evaluar la toxicidad de muestras de efluentes líquidos antes de su descarga, en términos de toxicidad crónica. Estos bioensayos intentan obtener información, a partir de la determinación de variables que se vean afectadas por una exposición prolongada a concentraciones o diluciones (volumen/volumen) relativamente bajas, de manera que produzcan efectos sub-letales.
- c) En ambos casos se definirán índices de toxicidad obtenidos mediante el análisis estadístico de los resultados de los bioensayos. Estos incluirán los siguientes:
- **CL50-t**: concentración de agente tóxico que causa letalidad del 50 % de la población expuesta, en relación a un tiempo de exposición (t).
  - **CE50-t**: concentración de agente tóxico que causa inhibición del 50 % en un determinado parámetro, en relación a un tiempo de exposición (t).
  - **NOEC**: concentración más alta de agente tóxico usada en el ensayo donde no se observan efectos adversos en la población expuesta.
  - **LOEC**: concentración más baja del agente tóxico a la cuál se registran efectos adversos en un determinado parámetro.
  - **ChV**: punto estimado de la concentración de agente tóxico presumiblemente segura que se encuentra entre el NOEC y LOEC, obtenido de calcular la media geométrica entre estos dos índices.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 BIOENSAYOS EFLUENTES:

#### 2.1.1 Bioensayo de toxicidad aguda con juveniles de *Hyalella gracilicornis* Gonz.

Este bioensayo corresponde a un test agudo de 48 horas en el cual se utilizaron individuos juveniles menores a 2,5 mm de longitud (aprox. de 1-7 días de edad), separados con un tamiz de 500 um. Cada tratamiento (control y diluciones de la muestra a evaluar) consideró 10 réplicas con 2 individuos en cada uno. Las unidades experimentales fueron viales de vidrio de 25 ml con 15 ml de solución. El bioensayo se realizó a 20°C. El agua utilizada en los controles y en la dilución fue agua de la laguna Price de Concepción. Al término del período de exposición se registró el número de ejemplares muertos por unidad experimental. En la Tabla 1 se presenta un resumen con las condiciones bajo las cuales se realizaron los bioensayos.

Los datos de mortalidad fueron analizados estadísticamente mediante el programa computacional Probit (para datos paramétricos) o Spearman-Kärber (para datos no paramétricos), obteniéndose el CL50-48 h (concentración en la cual muere el 50% de los individuos expuestos). El criterio de aceptabilidad de la prueba fue de un máximo de 10% de mortalidad en los controles.

**Tabla 1.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos realizados con *Hyalella gracilicornis*.

Tipo de bioensayo	Estático, sin recambio de agua
Tiempo de exposición	48 horas
Volumen solución / envase	15 mL
Numero replicas	4
Nº Organismos / envase	5
Edad organismos de ensayo	Juveniles (hasta 2,5 mm de largo)
Numero de tratamientos y su concentración según toxicidad de la muestra	6 (control; 6,25; 12,5; 25; 50 y 100% de muestra concentración de la muestra). *6 (control; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5 y 25 % de concentración de la muestra).
Temperatura de exposición	20° C
Agua de dilución	Agua laguna (Price)
pH agua dilución	7
Régimen de alimentación	No se requiere alimentación
Aireación	El agua debe ser aireada antes del bioensayo.
Toxico de referencia	Dicromato de potasio (CL50-48 h = 2,67 mg/L (1,73 – 4,12 mg/L)

\*: Dilución utilizada en bioensayo con efluente de Lácteos Valdivia.

### 2.1.2 Bioensayo agudo con el microcrustáceo *Daphnia obtusa* Kurz.

El bioensayo agudo con *Daphnia* evaluó como efecto de toxicidad la mortalidad de los organismos expuestos a 5 diluciones seriadas de la muestra. El criterio para discernir entre vivos y muertos fue la inmovilidad de estos últimos ante un estímulo físico. El factor de dilución inicial fue 0,5, pero fue modificado cuando era necesario para adecuar la respuesta experimental a un grado de precisión más fino y acorde con el tratamiento estadístico aplicado al análisis de los datos. Cada una de las diluciones consideró cuatro réplicas, lo mismo que el tratamiento control, que utilizó agua de dilución (agua destilada con dureza media reconstituida por adición de sales). Cada envase del bioensayo (25 mL) contuvo 5 ejemplares neonatos (no superiores a 24 horas de edad), lo que hace un total de 20 individuos por tratamiento. El experimento se realizó a  $20 \pm 1$  °C y con un régimen de iluminación de 12 h L: 8 h O. La muestra, así como también el agua de dilución, fue oxigenada por burbujeo hasta obtener sobre 80% de saturación antes de efectuar el bioensayo. La duración del bioensayo fue de 48 horas, al término del cual se contabilizan los sobrevivientes de cada réplica. Las especificaciones y requerimientos del bioensayo con *Daphnia* se basaron en la metodología descrita por US EPA (1995). En la Tabla 2 y 3 se presenta un resumen con las condiciones bajo las cuales se realizaron los bioensayos.

**Tabla 2.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia obtusa*.

Tipo de ensayo	Estático sin renovación
Duración de la prueba	24 o 48 horas
Temperatura	20° C $\pm$ 0.2°C
Fotoperiodo	16 h luz; 8 h oscuridad
Tamaño de la cámara de prueba	25 ml
Volumen de la solución de prueba	20 ml
Edad de los organismos	Neonatos de 24 h
Número de organismos por cámara	5
Número de réplicas por concentración	4
Número de organismos por concentración	20
Agua de dilución	Agua reconstituida Dureza: 125 mg/l $\pm$ 25 mg/l expresada como CaCO <sub>3</sub> . pH: 7.8 $\pm$ 0.2 OD: sobre un 80% de saturación.
Criterio de toxicidad (punto final)	Mortalidad (LC <sub>50</sub> )
Criterio de aceptabilidad	Sobrevivencia de controles >90%

### 2.1.3 Bioensayo agudo con trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum

El bioensayo agudo con trucha evaluó como efecto de toxicidad la mortalidad de los organismos expuestos a 5 diluciones seriadas de la muestra, o sin dilución, según la respuesta preliminar de los organismos a la muestra. El factor de dilución inicial fue de 0,5, pero se modificó cuando fue necesario para adecuar la respuesta experimental a un grado de precisión más fino y acorde con el tratamiento estadístico aplicado al análisis de los datos. Cada una de las diluciones contempló 3 réplicas, lo mismo que el tratamiento control con sólo agua de dilución (agua potable de clorada). Por cada envase de 5 L se utilizaron 10 alevines de 0,4 a 1 gr de peso, lo que hace un total de 30 individuos por tratamiento. Al término del cuarto día de exposición se registró el número de sobrevivientes, el pH y la concentración de oxígeno. Las especificaciones del bioensayo con trucha se basaron en los documentos publicados por la US EPA (1993). En la Tabla 3 se presenta un resumen con las condiciones bajo las cuales se realizaron los bioensayos.

**Tabla 3.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad aguda con *O. mykiss*.

Tipo de bioensayo	Estático, con recambio de agua
Volumen solución/ unidad	2 litros
Tiempo de recambio	Cada 48 horas
Numero replicas	3
Organismos / unidad experimental	7
Edad organismos de ensayo	Alevines entre 0,5 y 0,9 grs
Numero de tratamientos (según toxicidad de la muestra)	6 (control; 41; 51; 64; 80 y 100 % de concentración de la muestra)
	6 (control; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 % de concentración de la muestra)
Alimentación	Sin alimentación
Fotoperiodo	16 horas luz/8 horas oscuridad
Temperatura de bioensayo	15°C
Agua de dilucion	Agua potable de clorada
pH	6,5 a 7,5
Oxígeno disuelto	8,0 mg/L
Tóxico de referencia	Dicromato de potasio $CL_{50-96 h} = 172,7$ mg/L

### 2.1.4 Bioensayo crónico con la microalga *Selenastrum capricornutum* Printz.

El bioensayo con la microalga unicelular evalúa la inhibición que la exposición a una muestra contaminada ejerce en la capacidad de dividirse cada célula en dos. La duplicación del número de células de un inóculo inicial en condiciones normales ocurre aproximadamente cada 48 horas. Este estudio por lo tanto se extiende por 96 horas en cámara de condiciones de iluminación y temperatura constante de acuerdo con la norma chilena oficial NCh 2706. Of 2002. La exposición se realiza en una serie de 5 diluciones, con tres réplicas cada una, partiendo de la muestra al 100% y con un factor de dilución de 0,5. La muestra fue enriquecida con una mezcla de nutrientes (medio de cultivo) para sostener el crecimiento de las microalgas (1 parte de medio en 10 partes de muestra). Las diluciones se efectuaron con agua destilada enriquecida con medio de cultivo y el control lo constituye solo agua de dilución. Todas las réplicas recibieron un inóculo de  $10^4$  células por mililitro en un volumen total de 50 mL. Cada 24 horas se registró la densidad celular de cada réplica y se determinó la diferencia con el control. En la Tabla 4 se presenta un resumen con las condiciones bajo las cuales se realizaron los bioensayos.

**Tabla 4.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum* Printz

Tipo de muestra	Efluente
Tratamiento previo de la muestra	Filtrada y enriquecida
Volumen / unidad experimental	50 ml
Densidad celular inicial	$10.000 \text{ céls.ml}^{-1}$
Tipo de cultivo	Estático
Densidad de flujo fotónico	$110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
Fotoperíodo	Iluminación continua
Aireación	No, agitación manual 2 veces al día
Temperatura	$20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
Número replicas	3
Parámetro medido	Densidad celular ( $\text{céls.ml}^{-1}$ )
Número de tratamientos	5 (control; 12,5; 25; 50 y 100% de concentración de la muestra)
Agua de dilución	Medio EPA x 5

### 2.1.5 Bioensayo crónico con *Lemna valdiviana Phil.*

La toxicidad de contaminantes en el agua se mide en esta especie por la inhibición del crecimiento de la planta (colonia), el cual se manifiesta en la generación de nuevas frondas a partir de colonias formadas por dos de ellas. En un periodo de cuatro días el número de frondas en un medio control será más del doble inicial. El diseño consistió en exponer por 96 horas grupos de 12 colonias por envase, en cuadruplicado, a una serie de cinco diluciones del efluente. Se usan placas Petri de 60 x 15 mm con 15 ml de solución la cual ha sido enriquecida con medio nutriente que se maneja en soluciones stock. El set de placas control se prepara solo con agua de dilución y su respectivo nutriente y un control positivo con una solución de dicromato de potasio en agua de dilución. El protocolo de este bioensayo es el descrito en el Standard Methods for the examination of water and wastewater (APHA 1992). En la Tabla 5 se presenta un resumen con las condiciones bajo las cuales se realizaron los bioensayos.

**Tabla 5.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad. crónico con *Lemna valdiviana Phil.*

Tipo de bioensayo	Estático, sin recambio de agua
Tiempo de exposición	96 horas
Volumen solución/ placa	20 mL
Numero réplicas	3
Nº Plantas / placa petri	10
Nº Frondas inicial/planta	2
Número de tratamientos	3 (control; 50 y 100% de concentración de la muestra).
Temperatura de exposición	20° C
Agua de dilución	Agua potable declorada + nutrientes
pH agua dilución	7,5
Tóxico de referencia	Dicromato de potasio (CL50-48 h : 3,5 mg/L)

### 2.1.6 Bioensayo crónico con *Daphnia obtusa* Kurz.

Este test está diseñado para evaluar si una muestra ambiental ejerce efectos negativos sobre la capacidad reproductiva normal de *Daphnia*. La muestra se dosifica en una serie logarítmica de diluciones, tal como se hace en el bioensayo agudo, partiendo con la mayor concentración de muestra que en el bioensayo agudo no generó efecto apreciable. Cada tratamiento consideró 10 envases (réplicas) con 50 mL de medio y con un individuo por cada uno. Como estos crustáceos son todos hembras y se reproducen partenogenéticamente mientras el cultivo stock se mantenga en buenas condiciones, todos los individuos son potenciales productores de descendientes en camadas sucesivas. La exposición a la muestra se inició con ejemplares neonatos de 24 hrs, los que completaron su crecimiento hasta adulto y se reprodujeron en el medio. Cada 48 hrs se efectuó un recambio del medio por dilución fresca, aireada y se les proporcionó alimento, de acuerdo con las recomendaciones de alimentación de cultivo de Daphnias en la norma NCh 2083.Of 1999. Las crías vivas y muertas se contabilizan en cada cambio del medio y se retiran del envase. Las condiciones de temperatura e iluminación fueron las mismas que en los bioensayos agudos. El bioensayo se extendió por 21 días, plazo en el cual se ha completado la generación de al menos 60 crías en los controles. En la Tabla 6 se presenta un resumen con las condiciones bajo las cuales se realizaron los bioensayos. Especificaciones metodológicas de este ensayo se basaron en la guía estándar de la ASTM (1988).

**Tabla 6.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad crónica con *D. obtusa*.

Tipo de ensayo	Estático con renovación
Duración de la prueba	21 días
Temperatura	20°C ± 0.2°C
Fotoperiodo	16 h luz; 8 h oscuridad
Régimen de alimentación.	Día por medio
Volumen de la solución de prueba	30 ml
Edad de los organismos	Neonatos de 24 h
Número de organismos por cámara	1 neonato
Número de réplicas por concentración	10
Tratamiento	Según 24hLC <sub>50</sub>
Agua de dilución	Agua reconstituida Dureza : 125 mg/l ± 25 mg/l expresada como CaCO <sub>3</sub> .
pH Agua dilución	7.8 ± 0.2
Oxígeno disuelto	sobre un 80% de saturación.
Efecto	Reproducción
Criterio de aceptabilidad	Sobrevivencia de controles >90%

### **2.1.7 Verificación de la calidad de los organismos de ensayo**

Simultáneamente a la ejecución de los bioensayos con muestra de efluente, se evaluó la sensibilidad de los organismos de prueba mediante un bioensayo agudo con un tóxico de referencia (dicromato de potasio). El valor de CL50 obtenido se contrastó con los valores que históricamente registrados en el laboratorio en su carta de vigilancia de sensibilidad de cada especie. Respuestas fuera del rango de variación estadísticamente aceptable implica rechazar la partida y buscar otra en su reemplazo.

### **2.1.8 Tratamiento estadístico de los datos generados con los bioensayos**

El análisis de la información generada con los bioensayos fue procesada siguiendo el diagrama de flujo recomendada por la USEPA según el tipo de bioensayos (agudo o crónico), y las características de la información generada.

### **2.1.9 Estimación de las Unidades Tóxicas**

La estimación de las Unidades de Toxicidad (UT) para los efluentes seleccionados fue determinada aplicando la siguiente formula (US EPA, 1992):

$$\text{Unidad de Toxicidad (UT): } UT = 100/(\text{CE50 o CL50 o LOEC})$$

Las unidades de toxicidad son una medición de la toxicidad de una muestra en múltiplos de CE50 o CL50 o LOEC. La ventaja de las unidades de toxicidad es que éstas pueden ser tratadas de forma análoga a unidades de concentración cuando se hacen cálculos de dilución u otro cálculo de balance de masa como en los modelos de calidad de agua.

## 2.2 ESTUDIOS DE FASE SÓLIDA.

### 2.2.1 *Bioensayo de sobrevivencia y crecimiento en el anfípodo *Hyalella gracilicornis* Gonz.*

La evaluación de toxicidad en el sedimento se realizó exponiendo 10 juveniles de 7 a 14 días de edad a 200 mL de sedimento cubierto con 200 mL de agua en envases de 500 mL. El experimento tuvo una duración de 10 días a 20 °C, durante los cuales el agua se recambia al menos una vez al día y se alimentan con microalgas y Tetramin. Se contemplaron ocho réplicas por muestra de sedimento y para el control. En la Tabla 7 se presenta un resumen con las condiciones bajo las cuales se realizaron los bioensayos.

Al final del bioensayo se contabilizó el número de sobrevivientes comparando la muestra con el control. Si la toxicidad letal es baja o ausente se determinó toxicidad subletal. El efecto sobre el crecimiento de los juveniles entre tratamientos y control se evaluó por diferencia de longitud o peso seco al término del bioensayo. Método basado en el protocolo US EPA (1994).

**Tabla 7.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos en el anfípodo *Hyalella gracilicornis* Gonz.

Volumen sedimento/ envase experimental	100 mL
Volumen agua/ envase	175 mL
Volumen envase experimental	500 mL
Numero réplicas/ muestra	4
Nº organismos / tratamiento	40
Edad organismos de ensayo	Juveniles (entre 500 – 710 µm)
Tiempo de exposición	14 días
Temperatura de exposición	20° C
Agua de dilución	Agua laguna (Price)
pH Agua dilución	7,2
Oxígeno disuelto agua dilución	8 mg/L
Recambio de agua	Cada 48 horas (100 mL)
Alimentación / recambio	Microalgas de agua dulce (2 mL) / envase, alimento YCT

### 2.2.2 *Bioensayo de inhibición de la germinación y del crecimiento de plántulas en sedimento con semillas de vegetales herbáceos (lechuga, rábano y trigo).*

Se utilizó un volumen de 800 ml de sedimento en envase de 1 L, en el cual se sembraron 10 semillas de lechuga, rábano y trigo, incubados a 25 °C hasta la emergencia, para luego ser transferidas a un invernadero donde completaron su desarrollo. El tiempo de duración fue de dos semanas. El diseño incluyó tratamientos en triplicado, y un control con sedimento de un área del río Itata sin contaminación. Se cuantificó el número de semillas germinadas y si hay desarrollo de plantas, mediante el peso de las partes aéreas. En la Tabla 8 se presenta

un resumen con las condiciones bajo las cuales se realizaron los bioensayos. El protocolo de este bioensayo es una adaptación del N° 208 de la OECD (1984).

**Tabla 8.** Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los ensayos de inhibición de la germinación y del crecimiento de plántulas en sedimento con semillas de vegetales herbáceos (lechuga, rábano y trigo).

Peso de sedimento / unidad experimental	600 g
Numero replicas/muestra	3
N° Plantas/unidad experimental	10 por especie (en total = 30)
Temperatura bioensayo	20 °C
pH suelo	6,5
pH Sedimento Pre – Imp – Post-impacto	5 – 5 – 5
Fotoperíodo	Luz artificial continua
Tiempo de exposición	14 días
Suelo control	Tierra jardín (Control jardín) y Sedimento río Itata (Cont. Itata)

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 BIOENSAYOS DE EFLUENTES:

##### 3.1.1 Bioensayo de toxicidad aguda con juveniles de *Hyalella gracilicornis* Gonz.

Los resultados de las mortalidades de los anfípodos expuestos por 48 horas a las concentraciones más altas de las tres muestras de efluente se presentan en las Tablas 9. Las muestras de efluentes de A.S. Loncoche y EDAS no presentaron toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>) sobre *H. gracilicornis* a las 48 hrs. de exposición, sin embargo se registró mortalidad del 30% y 15% de los organismos expuestos por 48 horas al efluente puro, respectivamente. Por otra parte, la muestra de efluente de la empresa Lácteos Valdivia presentó una Concentración Letal (CL<sub>50</sub>) de 11,7% (9,5 - 14,3 %) a las 48 horas de exposición. Mientras que el efluente de Celco Valdivia no presentó toxicidad aguda.

**Tabla 9.** Resultados de los bioensayos de toxicidad aguda con *H. gracilicornis*, para las muestras de los efluentes A.S. Loncoche, Celco Valdivia, EDAS y Lácteos Valdivia.

MUESTRA	RESULTADOS		
	Nº muertos/Nº expuestos	Porcentaje de Mortalidad (%)	48 h CL <sub>50</sub>
A.S Loncoche (100%)	6 / 20	30	N.D
Celco Valdivia periodo alto caudal Eucaliptus	0/20	0	N.D
Celco Valdivia periodo bajo caudal Eucaliptus	0/20	0	N.D
Celco Valdivia periodo alto caudal Pino	0/20	0	N.D
Celco Valdivia periodo bajo caudal Pino	0/20	0	N.D
Lácteos Valdivia (25%)	20/20	100	11,7% (9,5 - 14,3%)
EDAS (100%)	3/20	15	N.D

N.D = No Detectado.

De las cuatro empresas evaluadas, solamente el efluente de la empresa Lácteos Valdivia presentó niveles de toxicidad suficiente (CL<sub>50</sub>), para estimar las Unidades Tóxicas agudas (U.T.a.), que alcanzó un valor de 8,5 es decir, el efluente puro (sin dilución) de Lácteos Valdivia tendría una carga de 8,5 veces la letalidad del CL<sub>50</sub> determinado mediante diluciones del efluente.

### 3.1.2 Bioensayo agudo con el microcrustáceo *Daphnia obtusa* Kurz.

Los ensayos realizados con *Daphnia obtusa*, para las muestras de los efluentes A.S. Loncoche, Celco Valdivia y EDAS, no registraron toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>) a las 24 y 48 horas de exposición (Tabla 10). Sin embargo, la muestra correspondiente a Lácteos Valdivia registró una toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>) de 17,1 % y 15,9 % a las 24 y 48 horas de exposición, respectivamente.

**Tabla 10.** Resultados de los bioensayos de toxicidad aguda con *D. obtusa*, para las muestras de los efluentes A.S. Loncoche, Celco Valdivia, EDAS y Lácteos Valdivia.

MUESTRA	RESULTADOS		
	24 h CL <sub>50</sub>	48 h CL <sub>50</sub>	Comentario
A.S. Loncoche	N.D	N.D	pH = 6,7 Cond. = 402 µS/cm TDS= 0,23 g/L
Celco Valdivia periodo alto caudal Eucaliptus	N.D	N.D	pH = 6,36 Cond. = 1230 µS/cm TDS= 0,83 g/L
Celco Valdivia periodo bajo caudal Eucaliptus	N.D	N.D	pH = 6.16 Cond. = 1363 µS/cm TDS= 0,84 g/L
Celco Valdivia periodo alto caudal Pino	N.D	N.D	pH = Cond. = µS/cm TDS= g/L
Celco Valdivia periodo bajo caudal Pino	N.D	N.D	pH = Cond. = µS/cm TDS= g/L
Lácteos Valdivia	17,1% (15,2 - 19,2%)	15,9% (14,2 - 17,7%)	pH = 7,5 Cond. = 2.50 mS/cm TDS= 1.39 g/L
EDAS	N.D	N.D	pH = 6,8 Cond. = 325 µS/cm TDS= 0,18 g/L

N.D = No Detectado.

### 3.1.3 Bioensayo agudo con trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* Walb y *Gambusia affinis*.

Los resultados de los bioensayos realizados con *Oncorhynchus mykiss* durante el mes de Noviembre de 2006, para las muestras de los efluentes A.S. Loncoche, Celco, periodo alto caudal (proceso pino y eucaliptos), Lácteos Valdivia y EDAS, se entregan en la Tabla 11.

Es posible observar que los ensayos realizados con el efluente de Lácteos Valdivia fue el que presentó la mayor toxicidad, seguido de A.S. Loncoche y EDAS, cuyos valores de CL50 a las 96 horas de exposición fueron de 8.8%, 64.3 %, 72.1 %, respectivamente, mientras que la muestra de efluente de Celco, durante el periodo de alto caudal durante el proceso de Pino como de eucaliptos, no se detectó toxicidad finalizado el ensayo. Expresado en unidades tóxicas, el efluente de Lácteos Valdivia resultó tener la mayor carga tóxica, con un valor de 11,4 U.T.a, seguido de A.S. Loncoche y EDAS, con 1,5 y 1,4 U.T.a, respectivamente.

**Tabla 11.** Resultados de los bioensayos de toxicidad aguda con *O. mykiss*, para las muestras de los efluentes Lácteos Valdivia A.S. Loncoche y EDAS expresados en % y U.T.a

EFLUENTE	CL50-96 h	Rango de confianza	U.T.a
A.S. Loncoche	64,3 %	(61,2 % - 67,5 %)	1,5
Celco Valdivia periodo alto caudal Eucaliptus	N.D	-----	-----
Celco Valdivia periodo alto caudal pino	N.D	-----	-----
Lácteos Valdivia	8,8 %	(7,6 % - 10,2 %)	11,4
EDAS	72,1 %	(65,7 % - 78,2 %)	1,4

Por otra parte, el ensayo para la muestra de efluente durante el periodo de bajo caudal se realizó con la especie *Gambusia affinis*; para la producción de celulosa a partir de Eucaliptus no presentó toxicidad aguda para los peces expuestos por un periodo de 96 horas, ya que no se observa mortalidad en las dos concentraciones del efluente más altas y el 10% que se manifiesta en las concentraciones más bajas es el mismo que presentó la mortalidad del control. Del mismo modo, en el caso de la muestra de efluente de producción de celulosa a partir de pino, no se registró mortalidad alguna en los organismos expuestos durante 96 horas. Los resultados se presentan en la tabla 12.

**Tabla 12.** Resultados de los bioensayos de toxicidad aguda con *G. affinis*, para la muestra del efluente de Celco Valdivia durante el periodo de bajo caudal, cuando la planta procesaba Pino como Eucaliptos.

EFLUENTE	CL50-96 h	Rango de confianza	U.T.a
Celco Valdivia periodo bajo caudal Eucaliptus	N.D	-----	-----
Celco Valdivia periodo bajo caudal pino	N.D	-----	-----

### 3.1.4 Bioensayo crónico con la microalga *Selenastrum capricornutum* Printz.

Los ensayos realizados con *Selenastrum capricornutum* con las muestras de los efluentes A.S. Loncoche y EDAS, registraron una inhibición significativa de la tasa de crecimiento de la población al 100% de su concentración, con valores de 21.3% y 9.3% respectivamente (Tablas 13 y 19). Por otra parte, todas las diluciones ensayadas de la muestra de efluente de la empresa Lácteos Valdivia produjeron inhibición de la tasa de crecimiento de la población de *Selenastrum capricornutum* (Tabla 18), presentando las concentraciones más altas (100 y 50 %), además de una total inhibición de la tasa de crecimiento, muerte celular cercana a un 30 % de la población de células inoculadas al inicio del bioensayo, lo que corresponde a un  $CE_{50-96\ h}$  de 30,6 % (28,9 – 32,3%) equivalente a 3,3 U.T.c. (Unidades tóxicas crónicas). Mientras que los ensayos realizados con el efluente provenientes de Celco Valdivia tanto para el periodo de alto como de bajo caudal y cuando la planta procesaba pino y eucalipto no registraron inhibición de la tasa de crecimiento, por el contrario, para el periodo de bajo caudal durante el proceso de Eucalipto se indujo a una leve estimulación del crecimiento algal, estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al control. Las diluciones de la muestra produjeron también estimulación del crecimiento que varió entre un 4,8 – 0,6%. Las Tablas 14 a 17 muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 13.** Tasas de crecimiento ( $k$ , div.día<sup>-1</sup>) de *Selenastrum capricornutum* en los diferentes tratamientos del efluente de A.S. Loncoche.

Tratamiento [%]	Nº Promedio (células ml <sup>-1</sup> ) x 10 <sup>5</sup>	k div.día <sup>-1</sup>	% k	% Inhibición de k	% Activación de k
Control	10,77	1,69	100	/	/
100	3,99	1,33	78,7	21,3	/
50	7,44	1,55	91,9	8,1	/
25	15,29	1,81	107,1	/	7,1
12,5	12,14	1,73	102,4	/	2,4

**Tabla 14.** Tasas de crecimiento ( $k$ , div.día<sup>-1</sup>) de *Selenastrum capricornutum* en los diferentes tratamientos durante la producción de celulosa a partir de pino durante el periodo de bajo caudal.

Tratamiento [%]	N (células ml <sup>-1</sup> ) X 10 <sup>5</sup>	k div.día <sup>-1</sup>	% k	% inhibición de k	% activación de k
<b>Control</b>	<b>7,00</b>	<b>1,53</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>100</b>	<b>6,51</b>	<b>1,51</b>	<b>98,7</b>	<b>1,3</b>	
<b>50</b>	<b>6,96</b>	<b>1,53</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	
<b>25</b>	<b>6,91</b>	<b>1,53</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	
<b>12,5</b>	<b>6,63</b>	<b>1,51</b>	<b>98,7</b>	<b>1,3</b>	
<b>6,25</b>	<b>6,69</b>	<b>1,52</b>	<b>99,2</b>	<b>0,8</b>	

**Tabla 15.** Resultados del Bioensayo crónico con *Lemna valdiviana* durante el periodo de alto caudal (Producción de eucalyptus).

Concentración Muestra (%)	Nº final frondas	Crecimiento de nuevas frondas (Nº final - Nº inicial)	% Crecimiento	% Inhibición del crecimiento (% I = 100 - % crecimiento)
Control	40	20	100	0
6,25 %	39	19	95	5
12,5 %	40	20	100	0
25 %	38,6	18,6	93,3	6,7
50 %	37,3	17,3	86,6	13,4
100 %	37,6	17,6	88,3	11,7

**Tabla 16.** Tasas de crecimiento ( $k$ , div.día<sup>-1</sup>) de *Selenastrum capricornutum* expuesta a efluente de producción de celulosa a partir de Eucalyptus durante el periodo de bajo caudal, en los diferentes tratamientos

Tratamiento	N (células ml <sup>-1</sup> ) X 10 <sup>5</sup>	k div.día <sup>-1</sup>	% k	% inhibición de k	% activación de k
Control	9,33	1,64	100	0	0
100	11,0	1,70	103,4	0	3,4
50	11,7	1,72	104,8	0	4,8
25	10,2	1,67	101,8	0	1,8
12,5	9,71	1,65	100,6	0	0,6
6,25	9,82	1,65	100,9	0	0,9

**Tabla 17.** Tasas de crecimiento ( $k$ , div.día<sup>-1</sup>) de *Selenastrum capricornutum* en los diferentes tratamientos durante la producción de celulosa a partir de Eucalipto durante el periodo de alto caudal.

Tratamiento [%]	N (células ml <sup>-1</sup> ) X 10 <sup>6</sup>	k div.día <sup>-1</sup>	% k	% inhibición de k
Control	1,27	1,75	100	0
100	1,23	1,73	99,0	1,0
50	1,22	1,73	98,9	1,1
25	1,27	1,75	98,8	0,2
12,5	1,32	1,76	100	0

**Tabla 18.** Tasas de crecimiento ( $k$ , div.día<sup>-1</sup>) de *Selenastrum capricornutum* en los diferentes tratamientos del efluente de Lácteos Valdivia.

Tratamiento [%]	Nº Promedio (células ml <sup>-1</sup> ) x 10 <sup>5</sup>	k div.día <sup>-1</sup>	% k	% Inhibición de k	% Activación de k
Control	10,8	1,7	100,0	/	/
100	0,1	0,0	0,0	100,0	/
50	0,1	0,0	0,0	100,0	/
25	4,0	1,3	78,8	21,2	/
12,5	10,4	1,7		/	/

**Tabla 19.** Tasas de crecimiento ( $k$ , div.día<sup>-1</sup>) de *Selenastrum capricornutum* en los diferentes tratamientos del efluentes de EDAS.

Tratamiento [%]	Nº Promedio (células ml <sup>-1</sup> ) x10 <sup>5</sup>	k div.día <sup>-1</sup>	% k	% Inhibición de k	% Activación de k
Control	10,8	1,7	100,0	/	/
100	7,0	1,5	90,7	9,3	/
50	13,7	1,8	105,0	/	5,0
25	15,4	1,8	107,5	/	7,5
12,5	15,9	1,8	108,2	/	8,2

### 3.1.5 Bioensayo crónico con *Lemna valdiviana* Phil.

Los ensayos realizados con *Lemna valdiviana*, para las muestras de los efluentes A.S. Loncoche, Celco Valdivia y EDAS (Tablas 20 a 24 y 26) no registraron un efecto inhibitorio significativo sobre la multiplicación de las frondas de *Lemna valdiviana* comparada con el grupo control, y en el caso del efluente de Celco Valdivia, durante el periodo de bajo caudal cuando la planta procesa Eucalipto, se observó un incremento en el número de frondas en las distintas concentraciones por sobre un 25% (tabla 23). Sin embargo, en el efluente de la empresa Lácteos Valdivia (Tabla 25), presentó un efecto inhibitorio significativo sobre la multiplicación de las frondas de *Lemna valdiviana*, con una Concentración de Efecto sobre el 50% de los individuos (CE50-96 h) a las 96 hrs de exposición de 13,6 % del efluente, lo que equivale a 7.4 Unidades Toxicas crónicas (subletales).

**Tabla 20.** Planilla de Registro del Bioensayo del efluente de A.S. Loncoche con *Lemna valdiviana*.

Concentración Muestra (%)	Promedio de frondas	Crecimiento de nuevas frondas (N° final -N° inicial)	% Crecimiento	% de Inhibición del crecimiento	% Activación del crecimiento
Control	30,3	11,3	100	/	/
50 %	36	16	154	/	54
100 %	33,6	13,6	132	/	32

**Tabla 21.** Resultados del Bioensayo crónico con *Lemna valdiviana* durante el periodo de bajo caudal (Producción de pino).

Concentración de la Muestra (%)	Promedio de frondas	Crecimiento de nuevas frondas (N° final -N° inicial)	% de crecimiento	% de Inhibición del crecimiento (% I = 100 - % de crecimiento)
Control	<b>115.3</b>	<b>75.3</b>	100	<b>0</b>
6,25 %	<b>114</b>	<b>74</b>	98,2	<b>1,8</b>
12,5 %	<b>115</b>	<b>75</b>	99,5	<b>0,5</b>
25 %	<b>119.3</b>	<b>79.3</b>	105,3	<b>- 5,3 (activación)</b>
50 %	<b>126.3</b>	<b>86.3</b>	114,6	<b>- 14,6 (activación)</b>
100 %	<b>116</b>	<b>76</b>	100,9	<b>- 0,9 (activación)</b>

**Tabla 22.** Resultados del Bioensayo crónico con *Lemna valdiviana* durante el periodo de alto caudal (Producción de Pino).

Concentración de la Muestra (%)	N° final de frondas	Crecimiento de nuevas frondas (N° final -N° inicial)	% de crecimiento	% de Inhibición del crecimiento (% I = 100 - % de crecimiento)
Control	<b>62</b>	<b>42</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
6,25 %	<b>57.3</b>	<b>37.3</b>	<b>88,8</b>	<b>11,2</b>
12,5 %	<b>58.3</b>	<b>38.3</b>	<b>91,3</b>	<b>8,7</b>
25 %	<b>53</b>	<b>33</b>	<b>78,6</b>	<b>21,4</b>
50 %	<b>52.6</b>	<b>32.6</b>	<b>77,8</b>	<b>22,2</b>
100 %	<b>49.3</b>	<b>29.3</b>	<b>69,8</b>	<b>30,2</b>

**Tabla 23.** Resultados del Bioensayo crónico con *Lemna valdiviana* durante el periodo de bajo caudal (Producción de eucalyptus).

Concentración de la Muestra (%)	Nº final de frondas	Crecimiento de nuevas frondas (Nº final –Nº inicial)	% de crecimiento	% de Inhibición del crecimiento (% I = 100 - % de crecimiento)
Control	<b>76.6</b>	<b>36.6</b>	100	<b>0</b>
6,25 %	<b>74</b>	<b>34</b>	92,72	<b>7,3</b>
12,5 %	<b>72.6</b>	<b>32.6</b>	89,09	<b>10,91</b>
25 %	<b>77.3</b>	<b>37.3</b>	101,81	<b>-1,81 (activación)</b>
50 %	<b>83</b>	<b>43</b>	117,27	<b>-17,27 (activación)</b>
100 %	<b>87.3</b>	<b>47.3</b>	129,09	<b>-29,09 (activación)</b>

**Tabla 24.** Resultados del Bioensayo crónico con *Lemna valdiviana* durante el periodo de alto caudal (Producción de eucalyptus).

Concentración de la Muestra (%)	Nº final de frondas	Crecimiento de nuevas frondas (Nº final –Nº inicial)	% de crecimiento	% de Inhibición del crecimiento (% I = 100 - % de crecimiento)
Control	<b>40</b>	<b>20</b>	100	<b>0</b>
6,25 %	<b>39</b>	<b>19</b>	95	<b>5</b>
12,5 %	<b>40</b>	<b>20</b>	100	<b>0</b>
25 %	<b>38.6</b>	<b>18.6</b>	93,3	<b>6,7</b>
50 %	<b>37.3</b>	<b>17.3</b>	86,6	<b>13,4</b>
100 %	<b>37.6</b>	<b>17.6</b>	88,3	<b>11,7</b>

**Tabla 25.** Planilla de Registro del Bioensayo del efluente Lácteos Valdivia con *Lemna valdiviana*.

Concentración Muestra (%)	Promedio de frondas	Crecimiento de nuevas frondas (N° final –N° inicial)	% Crecimiento	% de Inhibición del crecimiento	% Activación del crecimiento
Control	32	12	100	/	/
6,25%	30,6	10,6	88,8	11,2	/
12,5%	27,3	7,3	61,1	38,9	/
25%	21,6	1,6	13,8	86,2	/
50 %	20	0	0	100	/
100 %	20	0	0	100	/

**Tabla 26.** Planilla de Registro del Bioensayo del Efluente EDAS con *Lemna valdiviana*

Concentración Muestra (%)	Promedio de frondas	Crecimiento de nuevas frondas (N° final –N° inicial)	% Crecimiento	% de Inhibición del crecimiento	% Activación del crecimiento
Control	30,3	10,3	100	/	/
50 %	34,6	14,6	141,9	/	41,9
100 %	32,3	12,3	119,3	/	19,3

### 3.1.6 Bioensayo crónico con *Daphnia obtusa* Kurz.

Los resultados de los ensayos de toxicidad crónica (Tabla 27) para la muestras A.S. Loncoche y EDAS indican que estos efluentes no presentan toxicidad, ya que no se registraron diferencias significativas entre el control de laboratorio y las muestras. Sin embargo, en la muestra Lácteos Valdivia se observó una disminución en el nivel reproductivo de la especie, que se refleja en una disminución del promedio de neonatos producidos, determinándose así una concentración a la cual no se observa un efecto (NOEC) de 1% y una concentración mínima a la cual se observa un efecto (LOEC) de 5 %. De acuerdo a lo anterior, el efluente de Lácteos Valdivia tiene 20 U.T.c. Por otra parte, para el efluente Celco Valdivia, cuando la planta procesa Eucalyptus durante el periodo de bajo caudal no se registró toxicidad crónica a los 21 días de exposición, sin embargo durante el periodo de alto caudal se registró una disminución en el número de neonatos de *Daphnia obtusa* y el control de laboratorio (Tabla 27). Esto indica que existen diferencias significativas entre el control de laboratorio y las muestras, observándose una disminución en el nivel reproductivo de la especie, que se refleja en una disminución del promedio de neonatos producidos. Cabe destacar, que la producción de neonatos durante el periodo de bajo caudal es menor que durante el periodo de alto caudal. Por otra parte, cuando la planta procesa pino,

durante el periodo de bajo caudal no se observó diferencias significativas en la toxicidad crónica con el RIL, pero estas si fueron observadas durante el periodo de alto caudal

**Tabla 27.** Valores promedio, varianza y desviación estándar de neonatos producidos por *D. obtusa*, para las muestras de los efluentes de A.S. Loncoche (100%), Celco Valdivia (100%), EDAS (100%) y Lacteos Valdivia (5%).

	Promedio	Desv. Estándar	Varianza
Control	52,3	2,45	6,01
A.S.Loncoche (100%)	53,1	1,72	2,98
Control	87.7	2.83	8.01
Celco Valdivia periodo alto caudal Eucaliptus	60*	2.66	7.11
Control	62.6	12.6	160.0
Celco Valdivia periodo bajo caudal Eucaliptus	49.0	8.82	77.7
Control	73.3	3.74	14.01
Celco Valdivia periodo alto caudal Pino	60.1	3.47	12.1
Control	67.3	12.3	151.7
Celco Valdivia periodo bajo caudal Pino	55.7	16.1	259.7
Control	53.7	2.94	8.67
Lacteos Valdivia (5%)	43,5 *	2,41	5,83
Control	52.3	2.45	6.01
EDAS (100%)	52,3	2,16	4,67

Control = Control de laboratorio (agua reconstituida)

\* = Diferencias significativas

### 3.2. ESTUDIOS DE FASE SÓLIDA.

#### 3.2.1 Bioensayo de sobrevivencia y crecimiento en el anfípodo *Hyaella gracilicornis* Gonz.

Los resultados de los ensayos de sobrevivencia y crecimiento en el anfípodo *Hyaella gracilicornis*, realizados con los sedimentos del cuerpo receptor donde las empresas A.S. Loncoche y Lácteos Valdivia realizan sus descargas se presentan en las Tablas 28 y 29. De acuerdo con ellos, es posible señalar que no se evidenciaron efectos inhibitorios en el crecimiento y peso de *H. gracilicornis* para las tres zonas evaluadas (pre-impacto, impacto y post\_impacto) en cada empresa.

Sin embargo, se detectaron diferencias significativas en la sobrevivencia del grupo de anfípodos expuestos a los sedimentos de la empresa EDAS de la zona de pre-impacto comparados con los del grupo control (Tabla 30), lo cual evidencia toxicidad aguda (mortalidad) de aquel sedimento. Por otra parte, impacto y post impacto carecen de toxicidad letal ya que no se evidenciaron efectos negativos sobre la sobrevivencia de los anfípodos, sin embargo, se evidenció un efecto inhibitorio estadísticamente significativo en el crecimiento de los anfípodos ( $p < 0.05$ ) (Tabla 30) expuestos a los sedimentos de las zonas de impacto con un 4.5% y post-impacto con un 4.8% con respecto a la longitud alcanzada del grupo control.

En este contexto, es necesario señalar que el peso promedio de los anfípodos refleja el comportamiento de las longitudes en estos dos sitios, por otra parte, los datos de pesos, no pudieron ser sometidos a análisis estadísticos debido a que solo existía un dato por sitio.

**Tabla 28.** Registro de sobrevivencia, valores de peso promedio/ Individuo (gramos) y análisis estadístico ( $p > 0.05$ ) de los valores en longitud del cefalotórax (mm) de anfípodos de la especie *Hyaella gracilicornis* a los 14 días de exposición a las muestras de sedimento de la empresa A.S. Loncoche, de un total de 40 organismos de ensayo por tratamiento.

Identificación muestra	Sobrevivencia a los 14 días	Peso promedio/individuo (g)	Longitud promedio (mm)*
Sedimento Control	33 de 40	$5,2 \times 10^{-5}$	0,3126
Sedimento Pre-impacto	38 de 40	$8,6 \times 10^{-5}$	0,3316
Sedimento Impacto	38 de 40	$5 \times 10^{-5}$	0,3170
Sedimento Post-impacto	30 de 40	$4,3 \times 10^{-5}$	0,3104

**Tabla 29.** Registro de sobrevivencia, valores de peso promedio/ Individuo (gramos) y análisis estadístico ( $p>0.05$ ) de los valores en longitud del cefalotórax (mm) de anfípodos de la especie *Hyaella gracilicornis* a los 14 días de exposición a las muestras de sedimento de la empresa Lácteos Valdivia, de un total de 40 organismos de ensayo por tratamiento.

Identificación muestra	Sobrevivencia a los 14 días	Peso Promedio/Individuo (g)	Longitud promedio (mm)*
Sedimento Control	33 de 40	$5,2 \times 10^{-5}$	0,3120
Sedimento Impacto	34 de 40	$7,6 \times 10^{-5}$	0,3388
Sedimento Post-impacto	35 de 40	$7,3 \times 10^{-5}$	0,3288

**Tabla 30.** Registro de sobrevivencia, valores de peso promedio/ Individuo (gramos) y análisis estadístico ( $p>0.05$ ) de los valores en longitud del cefalotórax (mm) de anfípodos de la especie *Hyaella gracilicornis* a los 14 días de exposición a las muestras de sedimento de la empresa EDAS, de un total de 40 organismos de ensayo por tratamiento.

Identificación muestra	Sobrevivencia a los 14 días	Peso promedio/ individuo (g)	Longitud promedio (mm)*
Sedimento Control	33 de 40	$5,2 \times 10^{-5}$	0,3120
Sedimento Pre-impacto	2 de 40	-	-
Sedimento Impacto	38 de 40	$5,3 \times 10^{-5}$	0,2985
Sedimento Post-impacto	38 de 40	$5 \times 10^{-5}$	0,2968

\*Los valores de longitud del cefalo-torác (expresados en mm) corresponden a 30 individuos por tratamiento, elegidos al azar.

Por otra parte los resultados de los ensayos de sobrevivencia y crecimiento en el anfípodo *Hyaella gracilicornis*, realizados con los sedimentos del cuerpo receptor zona de pre impacto y post impacto para el efluente de Celco Valdivia se presentan en la Tabla 31. De acuerdo a ellos, es posible señalar que durante el periodo de bajo caudal la muestra E2 (sedimento del río, área de postimpacto de la descarga) presentó toxicidad aguda para los anfípodos, ya que más de un 50% de ellos murió antes de los 7 días de exposición.

Por otra parte, el efecto en el crecimiento de los isópodos por exposición a las distintas muestras de sedimento se evaluó en función de las longitudes céfalo-torácicas de los organismos experimentales al término del bioensayo (14 días). Los valores registrados se presentan en la Tabla 32. Como grupo control se utilizaron sedimentos de un humedal de Concepción, de la localidad de origen de los organismos y sin contaminación aparente.

Los resultados indican que no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento que experimentaron los organismos sobrevivientes a los 14 días de exposición al sedimento del área de pre impacto (E1) respecto al área de post impacto (E2) del río Cruces (Test de Tukey,  $P>0,05$ ).

**Tabla 31.** Registro de sobrevivencia y crecimiento de anfípodos de la especie *Hyaella gracilicornis* expuestos a las muestras de sedimento, de un total de 30 organismos de ensayo por tratamiento durante el periodo de bajo caudal.

Identificación muestra	Sobrevivencia a los 7 días	Sobrevivencia a los 14 días	Promedio Long del cefalotórax (mm)**
Control	30 de 30	27 de 30	0,27
Pre-impacto E1	30 de 30	29 de 30	0,26
Post-impacto E2	12 de 30 *	7 de 30 *	0,29

\* Significativamente diferente al pre-impacto y al control.

\*\*Los valores de longitud del cefalo-torác (expresados en mm) corresponden a 30 individuos por tratamiento, elegidos al azar.

El bioensayo con *Hyaella* se modificó para las muestras tomadas en el periodo de alto caudal. Con el objeto de registrar además del incremento en tamaño el incremento en peso de estos animales se aumentó el número de individuos expuestos por sedimento a 80 y el peso individual promedio se obtuvo dividiendo el peso total de los sobrevivientes por el número de sobrevivientes. La longitud promedio del anfípodo se mantuvo en base a la medición individual de una submuestra de 30 individuos.

Durante el periodo de alto caudal la muestra de sedimento del río Cruces en la zona de post-impacto de la descarga de Celco-Valdivia, presentó toxicidad aguda leve, que se manifestó en un 14,3 % de mortalidad en los anfípodos expuesto durante 14 días. El menor número de individuos totales en este tratamiento se debe a la pérdida accidental de una de las diez réplicas.

Por otra parte, no se manifiesta un efecto inhibitorio estadísticamente significativo en el crecimiento del anfípodo ( $p > 0,05$ ) expuesto a los distintos sedimentos con respecto al grupo control. Los registros de sobrevivencia y crecimiento de los anfípodos se presentan en la Tabla 33.

**Tabla 32.** Registro de sobrevivencia y crecimiento de anfípodos de la especie *Hyaella gracilicornis* expuestos a las muestras de sedimento, de un total de 80 organismos de ensayo por tratamiento durante el periodo de alto caudal. El crecimiento se midió en una submuestra de 30 individuos.

Identificación muestra	Sobrevivencia a los 14 días	Promedio Long del cefalotórax (mm)*
Sedimento Control	78 de 80 (97,5 %)	0,324
Sedimento Pre-impacto	76 de 80 (95 %)	0,393
Sedimento Impacto	78 de 80 (97,5 %)	0,384
Sedimento Post-impacto	60 de 70 (85,7 %)	0,314

\*Los valores de longitud del cefalo-torác (expresados en mm) corresponden a 30 individuos por tratamiento, elegidos al azar.

**Tabla 33.** Registro de sobrevivencia y crecimiento de anfípodos de la especie *Hyaella gracilicornis* expuestos a las muestras de sedimento, de un total de 80 organismos de ensayo por tratamiento durante el periodo de alto caudal. El crecimiento se midió en una submuestra de 30 individuos.

Identificación muestra	Sobrevivencia a los 14 días	Promedio Long del cefalotórax (mm)*
Sedimento Control	78 de 80 (97,5 %)	0,324
Sedimento Pre-impacto	76 de 80 (95 %)	0,393
Sedimento Impacto	78 de 80 (97,5 %)	0,384
Sedimento Post-impacto	60 de 70 (85,7 %)	0,314

\*Los valores de longitud del cefalo-torác (expresados en mm) corresponden a 30 individuos por tratamiento, elegidos al azar.

Complementariamente a la longitud cefalotorácica de una submuestra de 30 individuos por tratamiento, también se registró el peso del total de individuos por grupo de tratamiento (sobrevivientes de 80 iniciales), expuestos a la acción de los sedimentos por 14 días. Se evidenció, tanto en el tamaño como en el peso de los anfípodos, que los organismos de ensayo expuestos a los sedimentos de las zonas pre-impacto e impacto tuvieron un mayor crecimiento que aquellos criados en el sedimento control, pero las diferencias entre los distintos sitios no son significativas.

### 3.2.2 *Bioensayo de inhibición de la germinación y del crecimiento (en función del peso) de plántulas en el sedimento.*

La composición de los sedimentos del río Cruces (arena – limo) permitió realizar bioensayos de siembra directa en el sustrato para evaluar germinación y crecimiento en semillas de vegetales herbáceos (lechuga, rábano y trigo). Los resultados de los ensayos en sedimentos de descarga de los efluentes A.S. Loncoche, Lácteos Valdivia y EDAS se presentan en las Tablas 34 y 35.

Los resultados indican que para A.S. Loncoche, la zona de Pre-impacto presenta una clara inhibición de la germinación de las semillas de las tres especies, mientras que en la zona de Impacto sólo germinaron las semillas de rábano, sin embargo, el crecimiento de estas plantas estadísticamente menor en relación al control. Post-impacto, si bien, no tiene efecto inhibitor sobre la germinación en ninguna especie, si presenta un efecto inhibitor del crecimiento de las tres especies, en relación al sedimento control ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, los sedimentos de la zona de descarga directa del efluente de la empresa Lácteos Valdivia, para las dos zonas estudiadas (Impacto y Post- Impacto), inhibe totalmente la germinación (0%) de las 3 especies de semillas plantadas respecto a los controles.

Los sedimentos provenientes de la zona de Pre-impacto para la empresa EDAS demostraron ser inhibidores totales para la germinación de las semillas de trigo y lechuga (0 % de germinación) y en menor grado para el rábano (16,6% de germinación), sin

embargo, las pocas plantas de rábano que germinaron, presentaron un efecto inhibitorio en el crecimiento. Por otra parte, en las zonas de Impacto y Post-Impacto las especies germinadas en los sedimentos no demostraron diferencias significativas en el crecimiento con respecto a las plantas del sedimento control.

**Tabla 34.** Evaluación de la calidad ambiental en 3 muestras de sedimentos (Pre-Impacto, Impacto y Post-impacto) de las empresas A.S. Loncoche, Lácteos Valdivia y EDAS a través de su efecto inhibitorio de la germinación de semillas de trigo, rábano y lechuga sembradas 14 días antes del recuento.

SUSTRATO ENSAYADO	Porcentaje de semillas germinadas (%) para la muestra de A.S. Loncoche		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Lechuga</i>
Control	85	85	-
Pre-Impacto	0	0	0
Impacto	0	30	0
Post-Impacto	86,6	73,3	83,3
	Porcentaje de semillas germinadas (%) para la muestra Lácteos Valdivia		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Lechuga</i>
Control	85	85	76,6
Impacto	0	0	0
Post- Impacto	0	0	0
	Porcentaje de semillas germinadas (%) para la muestra EDAS		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Lechuga</i>
Control	85	85	76,6
Pre-Impacto	0	16,6	0
Impacto	90	93,3	96,6
Post-Impacto	93,3	86,6	53,3

**Tabla 35.** Crecimiento (en función de los pesos promedios (gr) de las tres especies de plantas (trigo, rabano y lechuga) que crecieron en los distintos tipos de sustrato (control, Pre-impacto, Impacto y Post-impacto) de las empresas A.S Loncoche y EDAS.

Sustrato ensayado	Peso promedio (gramos) para la muestra A.S. Loncoche		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Lechuga</i>
Control	0,116	0,209	0,047
Pre-Impacto	-	-	-
Impacto	-	0,100	-
Post-Impacto	0,097	0,144	0,031
	Peso promedio (gramos) para la muestra EDAS		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Lechuga</i>
Control	0,116	0,209	0,047
Pre-Impacto	-	0,036	-
Impacto	0,136	0,187	0,051
Post-Impacto	0,097	0,189	0,049

Nota: Los resultados de crecimiento para la muestra de Lácteos Valdivia no se incluyen debido a que la germinación para las tres especies de plantas fue completamente inhibida.

Por otra parte, los resultados de los ensayos de germinación de semillas sembradas en elutriado de los sedimentos del sector pre-impacto y post-impacto de la descarga del efluente de Celco Valdivia en el río Cruces, con una exposición de 48 hrs y durante el periodo de alto caudal, cuando ocurre el proceso con eucalipto, se presenta en la Tabla 36. El efecto del elutriado de los distintos sedimentos del río sobre el crecimiento de la raíz primaria que emerge de la semilla se cuantificó midiendo la longitud de ellas al final del periodo de exposición (48 hrs). En la misma tabla 34 se incluyen los valores del promedio de longitud del hipocotilo por grupo para las tres especies de plantas.

**Tabla 36.** Efecto sobre la germinación y la longitud promedio (mm) del hipocotilo de semillas de trigo, rábano y trébol germinadas por 48 hrs en elutriado de sedimento del río Cruces (alto caudal, eucalipto).

Elutriado sed. 209	Porcentaje de semillas germinadas (%)		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Trébol</i>
<b>Control</b>	<b>93,3 a</b>	<b>86,6 a</b>	<b>100 a</b>
<b>Pre impacto</b>	<b>93,3 a</b>	<b>90,0 a</b>	<b>100 a</b>
<b>Impacto</b>	<b>96,6 a</b>	<b>93,3 a</b>	<b>93,3 a</b>
<b>Post impacto</b>	<b>100 a</b>	<b>93,3 a</b>	<b>96,6 a</b>
Elutriado sedimentos 581-06-2630, 31 y 32	Longitud promedio (mm)		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Trébol</i>
<b>Control</b>	<b>32.29 a</b>	<b>22.00 a</b>	<b>17.77 a b</b>
<b>Pre impacto</b>	<b>35.36 a b</b>	<b>20.89 a</b>	<b>16.20 a</b>
<b>Impacto</b>	<b>28.10 a c</b>	<b>16.21 a c</b>	<b>12.68 a c</b>
<b>Post impacto</b>	<b>30.37 a</b>	<b>25.43 a b</b>	<b>12.62 a c</b>

a, b, c: Letras iguales en el promedio de crecimiento de diferentes sedimentos con una misma especie indican que no hay diferencias significativas, letras distintas indica diferencia significativa.

Los resultados de germinación en el elutriado de los sedimentos indican que no hay diferencias significativas para las tres especies entre los distintos sitios (Test de Tukey).

El análisis estadístico que contrasta la longitud del hipocotilo de las semillas expuestas al elutriado de los sedimentos (Test de Tukey) muestra que el sedimento del sector Pre-impacto no se diferencia estadísticamente del sector Post-impacto con las tres especies, en tanto que el sedimento de Impacto generó un menor crecimiento de las raíces que en Pre-impacto pero que esta diferencia es solo significativa en la semilla de trigo.

Durante el proceso de pino, en régimen de alto caudal, el efecto de los sedimentos sobre la germinación y el crecimiento del hipocotilo de las semillas se presenta en la Tabla 37.

**Tabla 37.** Efecto sobre la germinación y la longitud promedio (mm) del hipocotilo de semillas de trigo, rábano y trébol germinadas por 48 hrs en elutriado de sedimento del río Cruces (alto caudal, pino).

Elutriado sedimentos 695-06-3094, 95 y 96	Porcentaje de semillas germinadas (%)		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Trébol</i>
Control	93,3 a	86,6 a	100 a
Pre impacto	80,0 a b	90,0 a	93,3 a
Impacto	100 a c	96,6 a	93,3 a
Post impacto	100 a c	90,0 a	96,6 a
<b>Elutriado sed. 212</b>			
	Longitud promedio (mm)		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Trébol</i>
Control	32.29 a	22.00 a	17.77 a
Pre impacto	38.21 a b	22.89 a	13.39 b
Impacto	32.37 a	21.07 a	13.46 b
Post impacto	26.73 a c	15.89 a	10.86 b

a, b, c: Letras iguales en el promedio de crecimiento de diferentes sedimentos con una misma especie indican que no hay diferencias significativas, letras distintas indica diferencia significativa.

La tasa de germinación de las tres especies no rebela efecto inhibitor en los sedimentos bajo la influencia del efluente de CELCO.

El crecimiento de la raíz de las tres especies indica que no hay diferencias significativas entre Pre-impacto e Impacto o Post-impacto excepto en la semilla de trigo donde Post-impacto ejerció una cierta inhibición. Este menor crecimiento respecto a Pre-impacto puede estar sobredimensionado por un crecimiento sobre-estimulado en Pre-impacto, dado que el control agua destilada fue menor a este último pero no significativamente diferente del Post-impacto.

Los resultados de los ensayos de germinación de semillas durante el periodo de bajo caudal y mientras la planta procesaba eucalipto se presentan en la Tabla 38. En esa oportunidad no se pudo extraer sedimento en el sitio de Impacto.

**Tabla 38.** Efecto sobre la germinación y la longitud promedio (mm) del hipocotilo de semillas de trigo, rábano y trébol germinadas por 48 hrs en elutriado de sedimento del río Cruces (bajo caudal, eucalipto).

Elutriado sedimentos código 157	Porcentaje de semillas germinadas (%)		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Trébol</i>
Control	93,3 a	86,6 a	100 a
Pre impacto	100 a	86,6 a	93,3 a
Post impacto	100 a	93,3 a	96,6 a
<b>Elutriado sedimentos código 157</b>			
	Longitud promedio (mm)		
	<i>Trigo</i>	<i>Rábano</i>	<i>Trébol</i>
Control	32.29 a	22.00 a	17.77 a
Pre impacto	38.53 b	19.11 a	13.86 b
Post impacto	29.73 a	18.18 a	10.45 c

a, b, c: Letras iguales en el promedio de crecimiento de diferentes sedimentos con una misma especie indican que no hay diferencias significativas, letras distintas indica diferencia significativa.

La germinación de las tres especies de semillas no muestra diferencias significativas entre los sedimentos. La elongación del hipocotilo en elutriado de esos sedimentos indica que en el sitio de Post-impacto la raíz de trébol crece menos que en Pre-impacto. Lo mismo sugieren los datos de trigo, pero en este caso dado que Post-impacto no se diferencia del control agua destilada, más parece haber un efecto estimulador del crecimiento en Pre-impacto que no se manifiesta en Post-impacto. Con rábano no hay diferencias entre los sedimentos.

### 3.3 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL AGUA DEL SANTUARIO CARLOS ANDWANTER (VALDIVIA).

Para la muestra de agua superficial y sedimento de la zona del Santuario de Valdivia se realizaron ensayos de toxicidad aguda y crónica con las especies *H. gracilicornis*, *D. obtusa*, *O. mykiss*, *S. capricornutum* y *L. valdiviana* y con semillas de plantas de Trigo, Rábano y Trébol. Un resumen de los resultados se presentan en la tabla 39.

**Tabla 39.** Resumen de resultados de los bioensayos de toxicidad aguda y crónica para las matrices de agua y sedimento del Santuario de Valdivia en distintas especies.

Especies de prueba	RESULTADOS			
	Matriz agua		Matriz sedimento	
	Toxicidad Aguda	Toxicidad Crónica	Toxicidad Aguda	Toxicidad Crónica
<i>H. gracilicornis</i>	N.D.		N.D.	N.D.
<i>D. obtusa</i>	N.D.	N.D.		
<i>O. mykiss</i>	N.D.			
<i>S. capricornutum</i>		N.D.		
<i>L. valdiviana</i>		N.D.		
Trigo			Presenta	-
Rábano			Presenta	-
Trébol			Presenta	Presenta

Nota: Los resultados de toxicidad crónica (efecto sobre el crecimiento) para Trigo y Rábano no se presentan ya que no se pudo realizar un análisis estadístico por no existir suficientes datos.

La muestra de agua superficial del Santuario de Valdivia no presenta toxicidad aguda sobre las tres especies evaluadas (*H. gracilicornis*, *D. obtusa* y *O. mykiss*), así mismo, no se detecta toxicidad crónica sobre *D. obtusa*, ya que no se observa una disminución en el nivel reproductivo con respecto al control, del mismo modo, no se observa un efecto inhibitorio sobre la tasa de crecimiento de *S. capricornutum* y sobre la multiplicación de frondas de *L. valdiviana* comparadas con el grupo control.

La muestra de sedimento no evidenció toxicidad aguda ni crónica sobre la especie *H. gracilicornis* ya que no se registraron efectos significativos sobre la sobrevivencia y el crecimiento de los anfípodos al compararlos con el sedimento control.

Por otra parte, los resultados de los ensayos con semillas de Trigo, Rábano y Trébol evidenciaron toxicidad aguda ya que se observó inhibición sobre la germinación, así

mismo, se observó un efecto crónico del sedimento del Santuario sobre el crecimiento de las plantas que se desarrollaron a partir de las semillas que lograron germinar. No se realizó análisis estadístico para las semillas de trigo y rábano germinadas por no haber suficientes datos para ello. El análisis estadístico de los datos de germinación de las semillas de trébol indican un claro efecto inhibitor de la germinación de las semillas comparadas con el control ( $P < 0,05$ ). En la Tabla 40 se presentan los resultados en porcentaje de semillas germinadas y el peso promedio para las tres especies ensayadas.

**Tabla 40.** Evaluación de la calidad ambiental del sedimento del Santuario Carlos Andwanter (Valdivia) a través de su efecto inhibitor de la germinación y crecimiento (en función del peso) de semillas de trigo, rábano y trébol sembradas 14 días antes del recuento.

SUSTRATO ENSAYADO	Porcentaje de semillas germinadas (%)		
	Trigo	Rábano	Trébol
CONTROL	85	85	70
SANTUARIO	3,3	6,6	10
	Peso promedio (gramos)		
	Trigo	Rábano	Trébol
CONTROL	0,206	0,170	0,027
SANTUARIO	0,044	0,027	0,010

### 3.4 VERIFICACIÓN DE TOXICIDAD SOBRE GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN SEDIMENTOS.

El efecto inhibitor sobre la germinación de las tres especies de plantas estudiadas en el sector de río Cruces anterior a la descarga (Pre Impacto) de las tres empresas evaluadas, pudiendo o no persistir este efecto en la zona de descarga del efluente (Impacto), y en la zona posterior a ésta (Post Impacto), corresponde a una situación contraria a la que se esperaba y no concuerda con la mayoría de los resultados de los ensayos realizados con el anfípodo *H. gracilicornis* en los mismos sedimentos.

En este contexto, cabe señalar que una característica que llama la atención, es la heterogeneidad en la composición de sedimento del río, el cual varía mucho a simple vista en su estructura granulométrica dentro del corto trecho entre las estaciones pre-impacto, impacto y post-impacto, así como en su contenido de restos vegetales en degradación. La mayor abundancia de éste último componente en algunos sedimentos, es probablemente el responsable de un pH más ácido (alrededor de 5), debido a la descomposición vegetal en un ambiente pobre en oxígeno, característica común de las capas sub-superficiales de sedimentos areno-limosos. Es en este sentido, los sedimentos que presentaron un efecto inhibitor sobre la germinación tenían un pH alrededor de 5, mientras que los sedimentos con leve o sin efecto inhibitor tenían un pH 6 o más (Tabla 41).

Como una forma de verificar si la toxicidad detectada en sedimentos del río Cruces se mantiene al preparar un elutriado de ese material, se preparó una mezcla en partes iguales de sedimento y agua (agua reconstituida) y luego separando el líquido del sedimento por

decantación y centrifugación, se procedió a evaluar la presencia de toxicidad en ese líquido mediante bioensayos con neonatos de *Daphnia* y con semillas de trigo y lechuga que fueron puestas en papel filtro humedecido en el mismo elutriado.

En las Tablas 41 y 42 se presentan los resultados de los ensayos de elutriado sin dilución para *Daphnia obtusa* y semillas de trigo y lechuga. Se observa que el único elutriado de sedimento que manifiesta toxicidad significativa (100% de mortalidad) para *Daphnia obtusa* es el de la zona de pre-impacto para EDAS, sin embargo, esto se debe probablemente al bajo pH (4,1).

Por otra parte, los resultados del elutriado en semillas de trigo no presentan inhibición sobre la germinación, siendo la zona de pre-impacto de la muestra EDAS la única que presenta una inhibición de un 10%, con un desarrollo de los epicolitos menos vigorosos a simple vista con respecto a los otros sitios. Del mismo modo, el número de semillas de Lechuga germinadas no fue inferior en relación al control. Los resultados obtenidos del elutriado, no concuerdan con la inhibición sobre la germinación observada en las dos especies de plantas enterradas directamente en el sedimento, por ende, el pH cuyos resultados para la zona Pre-impacto de las muestras EDAS y Loncoche fueron de 4,1 y 4,8 respectivamente, y que resultaron ser más ácidos que en las muestras de sedimento, no se puede relacionar a los efectos tóxicos que presentaron los sedimentos. Es posible que tal efecto inhibitorio en los sedimentos se deba principalmente a la composición granulométrica, que coincidió con algunas zonas que presentaron a simple vista mayor composición de limo, lo que se refleja en un sedimento mas fino, compacto y de difícil permeabilidad del agua.

**Tabla 41.** Mortalidad de neonatos de *Daphnia obtusa* expuestos a elutriado de sedimento de diversos sectores del río Cruces que fueron inhibidores de la germinación. Se indica el pH del elutriado.

Localidad de origen del sedimento	pH elutriado	Nº de muertos / Nº expuesto (%)
Control – agua reconstituida	8,3	2 / 20 (10 %)
Pre-impacto EDAS	4,1	20 / 20 (100 %)
Pre-impacto Loncoche	4,8	0 / 20
Impacto Loncoche	6,2	0 / 20
Impacto Lácteos Valdivia	6,0	1 / 20 (5 %)
Post-impacto Lácteos Valdivia	6,6	0 / 20
Sedimento Santuario C. A.	6,3	2 / 20 (10 %)

**Tabla 42.** Germinación de semillas de trigo y lechuga expuestas a elutriado de sedimentos de diversos sectores del río Cruces que fueron inhibidores de la germinación.

<b>Localidad de origen del sedimento</b>	<b>pH elutriado</b>	<b>Nº de semillas trigo sin germinar / Nº expuesto (%)</b>	<b>Nº de semillas lechuga sin germinar / Nº expuesto (%)</b>
Control – agua reconstituida	8,3	0 / 10	3/ 10 (30 %)
Pre-impacto EDAS	4,1	1 / 10 (10 %)	2/ 10 (20 %)
Pre-impacto Loncoche	4,8	0 / 10	0/ 10
Impacto Loncoche	6,2	0 / 10	3/ 10 (30 %)
Impacto Lácteos Valdivia	6,0	0 / 10	1/ 10 (10 %)
Post-impacto Lácteos Valdivia	6,6	0 / 10	1/ 10 (10 %)
Sedimento Santuario C. A.	6,3	0 / 10	2/ 10 (20 %)

#### 4. CONCLUSIONES

Si bien, los bioensayos de toxicidad son una herramienta efectiva en la evaluación de la calidad ambiental de efluentes industriales, aguas superficiales y sedimentos receptores, estos métodos biológicos de evaluación dan una respuesta global a los contaminantes disueltos en las aguas superficiales y sedimentos.

Los resultados aquí expuestos, nos ofrecen una visión general de lo que está ocurriendo con estos cuatro efluentes y las zonas impactadas por ellos, en este sentido, se reúnen los resultados en unidades tóxicas (UT) que nos permiten estimar la calidad ecotoxicológica de muestras ambientales complejas. En este estudio se considera un promedio de las unidades tóxicas obtenidas en los bioensayos para cada localidad, como un índice ecotóxico.

Las Tablas 43a y 43b presentan los valores de CL50, CE50, LOEC y UT para cada especie y para cada localidad. En los residuos líquidos de las industrias evaluadas, A.S Loncoche, Lácteos Valdivia y EDAS, se observan similares resultados, para las especies *H.gracilicornis* y *D. obtusa*, donde sólo la empresa Lácteos Valdivia presenta toxicidad aguda (CL50). Sin embargo, el ensayo realizado con *O. mykiss* presenta letalidad en los tres efluentes, siendo Lácteos Valdivia mayor en 10 unidades tóxicas por sobre EDAS y A.S. Loncoche.

Por otra parte, los ensayos realizados con las especies *Selenastrum capricornutum*, *L. valdiviana* y *D. obtusa*, sólo registraron efectos de toxicidad crónica con el efluente de la empresa Lácteos Valdivia, siendo *D. obtusa* la más sensible al efluente con una concentración mínima de la muestra que produce un efecto significativo (LOEC) de 5%.

**Tabla 43.** Parámetros ecotóxicológicos y unidades tóxicas (UT) obtenidos para cada especie con las muestras de las tres empresas. a) Bioensayos de toxicidad aguda, b) Bioensayos de toxicidad crónica.

a)

	A.S Loncoche		Lacteos Valdivia		EDAS	
	LC50	UTa	LC50	UTa	LC50	UTa
<i>H. gracilicornis</i>	N.D	---	11,7%	8,5	N.D	---
<i>D. obtusa</i>	N.D	---	15,9%	6,2	N.D	---
<i>O. mykiss</i>	64,3%	1,5	8,8%	11,4	72,1%	1,4

b)

	A.S Loncoche		Lácteos Valdivia		EDAS	
	EC50 / LOEC	UTc	EC50 / LOEC	UTc	EC50 / LOEC	UTc
<i>S. capricornutum</i>	N.D	---	30,6%	3,3	N.D	---
<i>L. valdiviana</i>	N.D	---	13,6%	7,4	N.D	---
<i>D. obtusa</i>	N.D	---	5%	20	N.D	---

En la Tabla 29 se resume las unidades tóxicas promedio agudas y crónicas para cada empresa. Los efluentes provenientes de A.S. Loncoche y EDAS presentaron índices de toxicidad aguda aproximadamente 17 veces menor con respecto a Lácteos Valdivia y no presentaron toxicidad crónica.

Por otra parte, para el efluente de Lácteos Valdivia los valores más altos se encontraron para la toxicidad crónica (10,2 UTc). Algunos estudios realizados por Riveros et al. (1996), sugieren un aumento en la toxicidad a mayores contenidos de materia orgánica, grasas y aceites totales, que lo ocurre con este efluente, que presenta niveles de grasas y aceites y DBO<sub>5</sub> que sobrepasan lo establecido por la norma de emisión (D.S. 90/2000)

**Tabla 44.** Promedio de unidades tóxicas agudas y crónicas para las muestras de cada empresa.

Empresa	U.T Agudas	U.T crónicas
A.S Loncoche	0,5	---
Lácteos Valdivia	8,7	10,2
EDAS	0,5	---

De acuerdo a lo anterior, los valores de toxicidad encontrados para las aguas receptoras del efluente Lácteos Valdivia, indican ser los más altos de contaminación en relación a los otros dos efluentes (A.S. Loncoche y EDAS), tanto a nivel de efectos agudos como crónicos. Por lo tanto, sería necesario mejorar el sistema de tratamiento para reducir la toxicidad del efluente, considerando que Lácteos Valdivia descarga a un cuerpo receptor sin capacidad de dilución (rio Cayumapu).

Los ensayos realizados en sedimentos con el anfípodo *H. gracilicornis*, no refleja lo encontrado en la matriz agua, ya que tanto A.S. Loncoche como Lácteos Valdivia no presentaron toxicidad aguda ni crónica. Lo que ocurre con Lácteos Valdivia, que presentó toxicidad en agua, probablemente se deba a que los compuestos que presenta el efluente sean compuestos que no tengan afinidad con los sedimentos y por lo tanto no están acumulándose en estos, ya sea porque no son lipofílicos o porque los sedimentos no reúnen las características físicas para atrapar los compuestos que presenta el efluente. En este contexto, es quizás posible explicar porque en el caso de EDAS se presentaron efectos agudos en la zona de preimpacto y efectos crónicos en la zona de impacto y post impacto.

Al observar los sedimentos provenientes de las zonas de descarga y aledaños de EDAS, se pudo ver a simple vista que este sedimento corresponde en su gran mayoría a limo, un sedimento muy fino, que probablemente este acumulando algún compuesto tóxico para el anfípodo y que no necesariamente corresponde al efluente, ya que esta condición se presenta en la zona de preimpacto.

Del mismo modo los resultados de germinación con plantas (trigo, lechuga y rábano), nos muestran que probablemente, la composición granulométrica del sedimento este jugando un factor importante en la germinación y crecimiento de estas tres especies de plantas, y que los efectos inhibitorios aquí observados no se deban a toxicidad de los sedimentos, si no más bien a las características físicas del sedimento. En este contexto, los ensayos realizados con el elutriado de la zona de preimpacto de EDAS sólo manifestaron toxicidad letal para *Daphnia magna*, sin embargo, el pH fue mucho más ácido (4,1) y esta lejos de las condiciones óptimas de sobrevivencia de este organismo en un ensayo de laboratorio.

Por otra parte, los ensayos realizados en el Santuario de la Naturaleza no reflejan toxicidad aguda ni crónica en ninguna de las especies ensayadas, tanto para la matriz agua como para los sedimentos, lo que puede validar lo descrito anteriormente, que sean los sedimentos por sus características físicas los que estén impidiendo la germinación y crecimiento de las plantas ensayadas, ya que el elutriado ensayado sobre *D. obtusa* no presentó toxicidad aguda.

Por otra parte, los ensayos de toxicidad aguda realizados con los efluentes provenientes de la Planta Valdivia de Celco, durante los procesos de Celulosa tanto con Pino como Eucaliptos, en los periodos de Bajo y Alto caudal durante el año 2006, no registraron toxicidad aguda (CL50) en ninguna de las 4 especies ensayadas (*H. gracilicornis*, *D. obtusa*, *G. affinis* y *O. mykiss*), por lo tanto, el efluente no produce efectos letales en las especies ensayadas.

Por otra parte los ensayos de toxicidad crónica para las especies *L. valdiviana*, *S. capricornotum*, *G. affinis* y *O. mykiss*, no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Por otra parte, la especie *D. obtusa*, durante el periodo de alto caudal presentó bajos niveles de toxicidad crónica a los 21 días de exposición (entre 18 y 32 % de inhibición reproductiva), tanto para el efluente durante el proceso de pino como eucalipto.

Para contrastar los resultados del efluente se realizaron pruebas en el cuerpo receptor de éste, se evaluaron las zonas de pre-impacto (E1), y post-impacto (E2), a la descarga del efluente, los resultados de estos ensayos agudos, sobre las especies *H. gracilicornis*, *G. affinis*, *O. mykiss* y *D. obtusa*, se presentan en la Tabla 45.

**Tabla 45.** Resumen sobre la detección de toxicidad mediante los bioensayos agudos realizados para las muestras del cuerpo receptor (Río Cruces) zona de pre-impacto (E1) y zona de post-impacto (E2), durante los periodos de alto y bajo caudal.

Especies	Estación	Periodo de bajo caudal		Periodo de alto caudal	
		<i>Eucalipto</i>	<i>Pino</i>	<i>Eucalipto</i>	<i>Pino</i>
<i>H. gracilicornis</i>	E1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>G. affinis</i>	E1	N.D.	N.D.	/	/
	E2	N.D.	N.D.	/	/
<i>O. mykiss</i>	E1	/	/	N.D.	N.D.
	E2	/	/	N.D.	N.D.
<i>D. obtusa</i>	E1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: No detectado.

Estos resultados indican que no se registró toxicidad aguda (CL50) en ninguna de las zonas evaluadas con las especies ensayadas, tanto en periodo de alto como de bajo caudal.

Por otra parte los resultados de los ensayos de toxicidad crónica (Tabla 46), en estas zonas no registraron efectos sobre el crecimiento y la reproducción de las especies ensayadas. Sin embargo, para la microalga *S. capricornotum*, en la zona de post impacto, se evidenció un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento, observándose una estimulación de la misma en el periodo de alto caudal y cuando la planta procesaba celulosa a partir de pino; esta tasa fue de un 8,2 % superior al control, así mismo, se observó durante el conteo que las células eran mas grandes que las del control, lo que puede atribuirse a una mayor cantidad de nutrientes en esa zona, por otra parte, durante el proceso de celulosa a partir de eucalipto en el periodo de bajo caudal, la zona de post-impacto, también presentó activación del crecimiento significativo con respecto al control ( $p < 0,05$ ) de un 4,3%,

En los ensayos realizados con la especie *L. valdiviana* se observó un efecto inhibitor sobre la multiplicación de las frondas en la muestra de agua receptora de la zona de pre-impacto (E1), es decir en el agua del río antes de la descarga de CELCO. La otra especie que presentó diferencias significativas en su nivel reproductivo con respecto al control, es *D. obtusa*, en las zonas de pre y post impacto cuando la planta procesa celulosa a partir de eucalipto en el periodo de bajo caudal, lo mismo ocurre cuando la planta ocupa pino en el mismo periodo, pero solo en la estación de pre-impacto. Este efecto solo puede atribuirse a las variables naturales del río como cambios en su composición de nutrientes debido a un evento de lluvia, lo que trae consigo además cambios en el pH, o a la descarga de otro tipo de residuos río arriba, principalmente porque esos efectos se presentan en la zona anterior a la descarga del efluente.

**Tabla 46.** Resumen sobre la detección de toxicidad mediante los ensayos crónicos realizados para las muestras del cuerpo receptor (Río Cruces) zona de pre-impacto (E1) y zona de post-impacto (E2), durante los periodos de alto y bajo caudal.

Especie	Estación	Periodo de Bajo Caudal		Periodo de Alto Caudal	
		<i>Eucalipto</i>	<i>Pino</i>	<i>Eucalipto</i>	<i>Pino</i>
<i>S. capricornutum</i>	E1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>L. valdiviana</i>	E1	N.D.	N.D.	N.D.	P
	E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>D. obtusa</i>	E1	P.	P.	N.D.	N.D.
	E2	P*	N.D.	N.D.	N.D.
<i>G. affinis</i>	E1	N.D.	N.D.	/	/
	E2	N.D.	N.D.	/	/
<i>O. mykiss</i>	E1	/	/	N.D.	N.D.
	E2	/	/	N.D.	N.D.

N.D.= No presenta toxicidad crónica P= Presenta toxicidad crónica.

P\*= No hay diferencia en la fecundidad de *Daphnia* antes y después de la descarga.

Del grupo de organismos expuestos al efluente o al cuerpo receptor destaca por su sensibilidad *Daphnia obtusa*, la cual manifiesta efectos leves pero significativos en la reproducción, mientras que otros parámetros subletales como el crecimiento de peces, plantas y microalgas no detectan efectos negativos en la misma muestra.

Se detectó influencia negativa sobre algunos organismos en las muestras del río antes del impacto de la descarga de CELCO, lo cual descarta al efluente como causante de toxicidad en el cuerpo receptor en ese particular muestreo. Curiosamente, se dio que habiendo detectado con *Daphnia* toxicidad crónica en el río en zona de Pre-impacto, ésta ya no estaba presente después de la descarga del efluente; ¿dilución de un factor deletéreo en el río por mezcla con un efluente sin toxicidad? Está claro que el efluente tiene cierto nivel de nutrientes que al menos las microalgas usan para provecho propio y que podría contrarrestar algún factor negativo arrastrado por el río. Cabe hacer notar que en la década del 90 el bioensayo con microalgas reveló efectos inhibidores del crecimiento en el cuerpo receptor de la descarga de una industria de celulosa que evacuaba sus residuos al río Biobío, sin tratamiento secundario (Gaete *et al.*, 1999). Al mismo tiempo el enriquecimiento del río en materia orgánica disuelta y particulada sustentaba un fuerte incremento en la reproducción de *Daphnia* respecto al sector de pre-impacto.

De los resultados generados en este estudio no surge información suficiente para referirse a la toxicidad diferencial entre efluentes de pino y eucalipto. La única especie que manifiesta cierto nivel de efecto es *Daphnia* con una fecundidad 18 % menor al control con efluente de pino y con 32 % menor con efluente de eucalipto. Tampoco hay evidencias que indiquen una preponderancia de efectos negativos en el agua del río durante el régimen de bajo caudal respecto al periodo de alto caudal.

Por otra parte, la evaluación tóxica de los sedimentos revela en *Hyalella* una mortalidad considerable en el área de post-impacto en el periodo de bajo caudal del río la cual es mínima en el periodo de alto caudal. El hecho que estos animales no manifiesten efecto

negativo en el crecimiento e incluso tienden a alcanzar mayor tamaño y peso que en el control en el periodo de alto caudal nos sugiere que en el futuro se realicen monitoreos de los sedimentos con *Hyalella* para clarificar esta aparente incongruencia.

Con respecto al efecto que los sedimentos tienen sobre la germinación de semillas, tanto en régimen de alto o bajo caudal del río no se aprecian influencias negativas asociables al impacto de la descarga del efluente de CELCO en el río. El crecimiento de la raíz por su parte manifiesta diferencias entre el sedimento de Pre-impacto y el de Impacto o el de Post-impacto preferentemente en trigo, donde la diferencia en longitud en los promedios alcanza a un máximo de un 30 % en un caso y entre 21 y 23 % en los otros casos. Además, considerando que cuando la longitud radicular alcanzada en Pre-impacto es superior al control agua destilada, pero los sitios Impacto o Post-impacto no difieren significativamente de dicho control entonces no es apropiado reconocer como inhibición el menor crecimiento de los sitios bajo la influencia de la descarga sino más bien hay una diferencia con respecto al Pre-impacto por sobre-crecimiento en ese sitio, efecto que no se repite en los sitios aguas abajo. Las otras semillas no rebelan efectos destacables sobre su crecimiento con excepción de trébol en sedimento de Post-impacto durante bajo caudal donde se detecta una longitud promedio un 24 % más corta que en Pre-impacto.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

APHA. 1992. Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th Edition, 1992. American Public Health Association 1015 Fifteenth Street, NW, Washington, DC 20005

ASTM. 1988. Standard guide for conducting renewal life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. ASTM E-1193. pág. 739-755.

Gaete H., Larrain A., Bay-Schmith, E., Cifuentes, A., Rodriguez, J., Baeza, J., 1999. Chronic toxicity and physico-chemical characteristics of the receiving water of pulp mill effluents locate in the Biobio river basin (Central Chile). *Ecotoxicol. Environ. Rest.* 2 (2), 67-74.

NCh 2083 Of.1999. Bioensayos de Toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera).

NCh 2706 Of 2002. NORMA CHILENA OFICIAL. Calidad de agua - Bioensayo de inhibición de crecimiento de algas en agua dulce con *Selenastrum capricornutum*. Instituto Nacional de Normalización.

OECD. 1984. Method 208: Terrestrial Plants, Growth Test. Guidelines for Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development. 6 págs.

US EPA. 1990. Technical support document for water quality-based toxics control. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water Enforcement and Permits. Office of Water Regulations and Standards. Washington. D.C. 20460

US EPA. 1992. Introduction to Water Quality-Based Toxics Control for the NPDES Program. USEPA Office of Water (EN-338) . 831-S-92-002, March 1992

US EPA. 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-90/027F. Cincinnati, Ohio 45268. 293 págs.

US EPA. 1994. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA/600/R94/024. Duluth, Minnesota 55804. 133 págs.

US EPA. 1995. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1300. Daphnid Chronic Toxicity Test. USEPA, 712-C-94-120.1