

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A EFLUENTES DE UNA PLANTA DE CELULOSA SOBRE LA PLANTA ACUÁTICA INVASORA *EGERIA DENSA* Y OTROS PRODUCTORES PRIMARIOS: MÉTODO DE MESOCOSMOS

ALVARO T. PALMA,* † MARCELO G. SILVA, † CARLOS A. MUÑOZ, † CAROLINA CARTES, ‡ y FABIÁN M. JAKSIC †

† Pontificia Universidad Católica de Chile y Centro de Estudios Avanzados en Ecología y Biodiversidad (CASEB),

Alameda 340 Casilla 114-D, Santiago, Chile

‡ DSS Ambiente, Ernesto Pinto Lagarrigue 2C, San Pedro de la Paz, Chile

(Recibido el 9 de marzo de 2007; aceptado el 2 de agosto de 2007)

Resumen—La reciente desaparición de la planta acuática *Egeria densa*, especie nativa brasileña invasora, de un humedal en el sur de Chile impulsó una serie de esfuerzos por revelar el origen de este fenómeno. Debido a que estos cambios ocurrieron en el período en que una planta de celulosa recientemente construida iniciaba sus operaciones en el área, resulta plausible una duda razonable de relación causa-efecto. Implementamos un enfoque de mesocosmos para evaluar directamente el efecto del efluente (aguas residuales) de la planta de celulosa (EPC) en base a parámetros relacionados con el crecimiento de *E. densa* así como de otros productores primarios. Hemos hipotetizado que el efluente, con una disolución similar a la detectada en la zona del humedal en que el impacto negativo para el medioambiente era evidente, tiene un efecto considerablemente negativo sobre esta planta acuática así como sobre otros productores primarios dentro de un sistema de mesocosmos. Luego de la exposición prolongada (meses) tanto a EPC al 0% con agua pura de río, como a EPC tratado al 4 a 5% (v/v) de disolución, no se midió algún efecto sobre *E. densa*. Más aun, las plantas expuestas al efluente mostraron una tasa general de crecimiento significativamente más alta. Coincidentemente la concentración de clorofila *a* en la columna de agua y la biomasa del perifitón también cambiaron con el tiempo, pero sin un patrón atribuible a las aguas residuales. Los valores autotróficos obtenidos del patrón de crecimiento del perifitón no sugirieron enriquecimiento del sistema con materia orgánica. Nuestros resultados sólo se refieren al efecto directo del efluente de la planta de celulosa sobre varias respuestas bióticas, pero representan un importante avance hacia la generación del conocimiento científico necesario para comprender cómo funciona el ecosistema cuando recibe ésta y otras fuentes de agua no cuantificadas.

Palabras clave—Mesocosmos; Productores primarios; *Egeria densa*; Planta de celulosa

INTRODUCCIÓN

La creciente necesidad de comprender mejor los efectos ecológicos de la actividad humana sobre los ecosistemas ha impulsado el uso de enfoques de diseño específico, particularmente en medios acuáticos, y esto ha llevado al diseño e implementación de ecosistemas experimentales cerrados (mesocosmos) como herramientas para la investigación [1,2]. Los mesocosmos se han convertido en herramientas ampliamente usadas y aceptadas en la ecología experimental, ya que proporcionan un medio para llevar a cabo experimentos a nivel de ecosistema bajo condiciones reproducidas, controladas y repetibles, al mismo tiempo que se mantiene cierto realismo del medioambiente [3]. Entre los agentes relacionados con el ser humano que afectan los ecosistemas acuáticos, tanto de agua dulce como de agua de mar, aquéllos asociados con la industria del papel y la celulosa tienen una creciente importancia. Durante las últimas décadas, esta actividad ha experimentado un considerable repunte a nivel mundial, y se espera que aumente en un 77% desde 1995 a 2020 [4]. Durante las últimas dos décadas, se han implementado considerables esfuerzos para reducir el impacto de esta actividad sobre el medioambiente que la recibe [5], y se han logrado

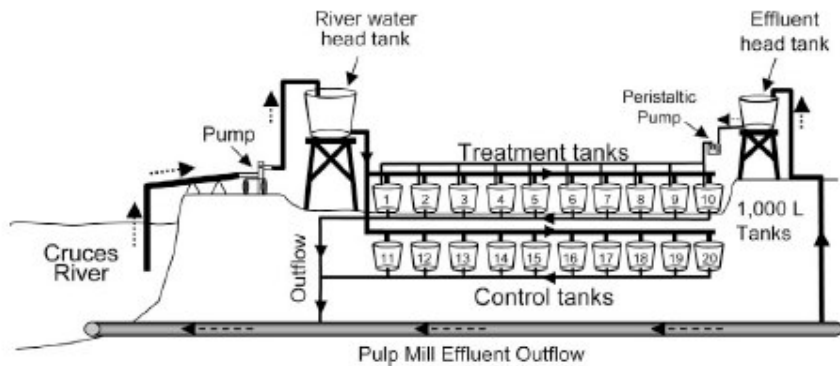
* Autor a quién enviar correspondencia
(apalma@bio.puc.cl)

Publicado en Internet el 2 de octubre de 2007

avances en la evaluación del efecto de los efluentes de plantas de celulosa (EPC) sobre los sistemas acuáticos [6]. Aún es importante, no obstante, determinar claramente el efecto directo de esta actividad industrial sobre los ecosistemas locales que la reciben. A pesar de que es difícil, particularmente debido a que los sistemas acuáticos receptores a menudo están expuestos a múltiples factores de estrés [7], la capacidad de comprender el efecto relativo de factores individuales representa un paso hacia el mejoramiento de nuestra capacidad de hacer predicciones válidas, basadas en la ecología y, así, contribuir con pautas reguladoras [8,9]. Tecnologías de flujo artificial (en adelante, mesocosmos) han sido usadas con éxito para lograr aquellas metas en los sistemas de los ríos [10–12]. El tamaño relativamente grande y las características de flujo continuo de este método experimental permiten el control de las condiciones de exposición, al mismo tiempo que mantienen el realismo del medioambiente [6]. Se considera que el flujo continuo es más apropiado que los experimentos estáticos en que no hay cambio del agua en que se realizan las pruebas, ya que en la naturaleza, los organismos están continuamente expuestos a soluciones renovadas. Por lo tanto, el uso del mesocosmos permite aislar los factores que se cree afectan negativamente parámetros identificados en un ecosistema.

En 2004 y 2005, se detectaron importantes cambios a nivel de ecosistema en uno de los sistemas de humedales más importantes de Chile: el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter en la sureña provincia de Valdivia. Durante este período, el santuario sufrió un proceso de rápida degradación del medioambiente, incluida la repentina y masiva muerte y migración de una colonia de cisnes de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*). Ésta y otras especies de aves del humedal dependen, en gran parte, de la planta acuática *Egeria densa*, especie originaria de Brasil que sirve como principal fuente de alimento. Esta planta también experimentó una grave extinción, factor que ha sido considerado como la principal causa de la desaparición de las aves en esa área. Este impacto negativo ocurrió al mismo tiempo en que la recientemente instalada planta de celulosa, propiedad de Celulosa Arauco y Constitución S.A. (en adelante, CELCO), inició sus operaciones a aproximadamente 32 km aguas arriba del santuario. A pesar de que resulta tentador vincular esta actividad industrial con los cambios en el ecosistema mencionados anteriormente, nuestro objetivo en el presente estudio fue comprender el efecto específico del EPC sobre *E. densa* así como sobre otros productores primarios en el sistema. Es obligatorio reconocer la complejidad de cualquier sistema natural, y este humedal no es la excepción. Es así que, si bien es necesario considerar un método con múltiples hipótesis de trabajo para ganar conocimientos respecto de las causas de los cambios generales observados en este humedal, nos concentramos en varios componentes importantes (parámetros) de este sistema—a saber, el efecto del EPC tratado sobre varios productores primarios del sistema (por ejemplo, *E. densa*, fitoplácton y perifíton). De ahí que nuestra principal hipótesis de trabajo establece que el EPC, a una disolución comparable con aquella detectada en la zona del santuario en que los impactos negativos eran evidentes, tiene un efecto significativamente negativo sobre varios parámetros bióticos medidos para varios componentes de este sistema como se cuantifica en un mesocosmos.

El objetivo general del presente estudio fue implementar un experimento de mesocosmos realista para detectar el posible impacto de los efluentes producidos por una gran planta de celulosa kraft libre de cloro elemental sobre los parámetros del sistema detallados anteriormente, durante un período prolongado de exposición a diferentes concentraciones de efluentes tratados.



| | | |
|----------------------------|---|---|
| River water head tank | : | Estanque principal con agua del río |
| Effluent head tank | : | Estanque principal con efluente |
| Treatment tanks | : | Estanques de tratamiento |
| Pump | : | Bomba |
| Persitaltic Pump | : | Bomba peristáltica |
| Cruces River | : | Río Cruces |
| Outflow | : | Flujo |
| Control tanks | : | Estanques de control |
| 1,000 L Tanks | : | Estanques de 1.000 litros |
| Pulp Mill Effluent Outflow | : | Flujo de salida del efluente de la planta de celulosa |

Fig. 1. Diagrama del mesocosmos experimental ubicado dentro del sitio de la planta de celulosa Celulosa Arauco y Constitución S.A. (32 km aguas arriba del Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, en la provincia de Valdivia en el sur de Chile), próximo a la toma de agua, casi 100 m aguas arriba en el río donde se descarga el efluente de la planta. La figura (no está a escala) presenta los componentes del diseño.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del mesocosmos

En diciembre de 2005, se implementó un conjunto de varios estanques grandes de flujo continuo próximos al Río Cruces (39°33'37''S, 72°53'20''O) en la región de Valdivia, sur de Chile. El diseño general del sistema correspondió a una adaptación de sistemas similares implementados en otros lugares [11,12], en que se consideraron dos niveles de tratamiento, cada uno con 10 réplicas: Uno con EPC al 0% con agua pura de río, y el otro con EPC tratado al 4 a 5% (v/v) de dilución. El diseño fue construido en el sitio de la planta de celulosa CELCO y consistió en veinte estanques cuadrados de polietileno de 1.000 L alineados en dos filas paralelas (Fig. 1). Mediante un sistema de colector interconectado, cada estanque recibió un flujo continuo alimentado por la gravedad (~2 L/min) de agua desde un estanque principal de 2.000 L lleno de agua bombeada desde una toma situada aproximadamente a 100-m aguas arriba de la descarga del efluente de la planta. El agua corría continuamente a través de un flujo de salida en el fondo, cubierto con una malla plástica de 500 μm , que estaba conectado a una tubería curvada hacia arriba para el control del volumen de agua de los estanques experimentales, volumen que en el caso del presente estudio se estableció en 600 L. La mitad de los estanques (estanques de tratamiento) recibieron un suministro adicional y continuo de efluente proveniente de un estanque principal de 500 L que se mantuvo permanentemente lleno con EPC al 100% obtenido directamente de la tubería de descarga de la planta de celulosa. Desde este estanque principal, el efluente fue bombeado a cada uno de los 10 estanques de tratamiento a una tasa de 100 ml/min, usando una bomba peristáltica (Masterflex™ L/S Nema tipo 13 controladores de goteo y cubierta de cabeza de bomba, y un sistema de tubería Tygon™; Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, EE.UU.) para mantener la concentración del efluente al 4 a 5% (v/v) dentro de los estanques. El sistema completo empezó a operar el 20 de diciembre de 2005, y ha estado funcionando de manera continua desde entonces.

excepto por unos pocos días en que el flujo se vio interrumpido en abril de 2006. A lo largo de todo este tiempo, el sistema no ha sido tocado, y únicamente se han removido desechos grandes (hojas y ramas) de la superficie del agua. Los resultados aquí presentados corresponden a aquellos cuantificados durante octubre de 2006.

Organismos del estudio y cuantificaciones biológicas: Productores primarios

La planta *E. densa* es una hierba acuática invasora originaria de Brasil y que se piensa fue introducida en el área de Valdivia cerca de 1908 [13]. Corresponde a una planta de rápido crecimiento que se propaga tanto sexualmente como a través de propagación vegetativa (fragmentos), y también es capaz de sufrir importantes cambios estacionales en su morfología y en el tamaño relativo [14]. Varios parámetros relacionados con el crecimiento de esta especie se midieron dentro del mesocosmos experimental creado para detectar el potencial efecto del EPC. Las plantas fueron recolectadas de agrupaciones de plantas que se presentaban naturalmente en el cercano río Calle-Calle, que no está conectado al humedal. Cinco individuos de igual tamaño y forma fueron incluidos en cada uno de los 20 estanques y se mantuvieron a un nivel medio del agua, sujetándolos suavemente con bandas elásticas a un tubo de cloruro de polivinilo (longitud, 50 cm; diámetro interno: 1,27 cm) suspendido desde arriba. El sistema permitió una rápida y fácil recuperación de las plantas con un mínimo de daño causado por la manipulación. Se midieron parámetros morfométricos para cada planta individual regularmente. A pesar del cuidado que se tuvo con las plantas durante todo el experimento, dos grupos separados (ensayos) de plantas tuvieron que ser considerados, porque las plantas individuales experimentaron el quiebre de sus ramas y un deterioro generalizado de los tejidos con el tiempo, lo que hizo difícil continuar con la mayoría de las cuantificaciones por más de cinco meses. Este último fenómeno, no obstante, fue descrito como de ocurrencia natural, en que *E. densa* sufre una evolución estacional de senescencia y quiescencia [15,16]. Un primer grupo de 100 plantas ($n = 5$ por estanque experimental) fue incluido en el experimento en diciembre de 2005 y recuperado finalmente en mayo de 2006. Un segundo grupo de plantas se incluyó a mediados de mayo de 2006 y fue cuantificado hasta septiembre de 2006. Después de un período de aclimatación de 44 días, las plantas del primer ensayo fueron medidas por primera vez. En el segundo ensayo, el tiempo transcurrido entre la inclusión de las plantas y las primeras mediciones fue de 15 días. La producción de nuevas hojas apicales se midió cada dos semanas luego de marcar el último nudo apical (como referencia) con una delgada, cinta plástica de color al comienzo de cada ensayo. Las mediciones mensuales de cada planta incluían el promedio del incremento total de la longitud total, el número de nudos por longitud de la planta, y el peso húmedo total. A partir del segundo estudio, las cuantificaciones adicionales incluyeron la longitud apical, las nuevas ramificaciones laterales y las raíces.

La biomasa de fitoplácton y la biomasa de perifitón se estimaron periódicamente mediante determinaciones de clorofila *a* luego de procedimientos metodológicos estándar levemente modificados [17,18]. A inicios de febrero de 2006, la biomasa de fitoplácton se determinó mensualmente, pasando un volumen conocido de agua (al menos 300 ml) desde cada estanque a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF (Advantec, Pleasanton, CA, EE.UU.). Los filtros fueron envueltos en aluminio y almacenados a -20°C . Luego los pigmentos fueron extraídos empapando los filtros en acetona al 90% por 24 horas a 0°C en completa oscuridad. La absorción del sobrenadante fue medida a 750 y 665 nm antes y después de la acidificación con 0,1 ml de 0,1 N HCl en un espectrofotómetro (Hach DR/2500; Hach Company, Loveland, CO, EE.UU.). La absorción registrada a 750 nm fue medida de la turbiedad del extracto y fue usada para corregir aquella registrada a 665 nm. La misma metodología de extracción fue aplicada para la cuantificación del perifitón; sin embargo, las muestras fueron obtenidas de platillos acrílicos cuadrados (área de superficie total, $22,66\text{ cm}^2$) suspendidos a nivel medio del agua en cada estanque experimental. Cinco de estos platillos fueron incluidos en cada estanque durante la primera semana

de julio de 2006, y cada mes, un platillo fue recuperado de cada estanque, envuelto en aluminio y almacenado a -20°C . Los platillos fueron rascados cuidadosamente con un escalpelo y lavados con agua destilada. Se obtuvieron dos submuestras iguales de esta solución usando un separador Folsom. Una submuestra se pasó por filtros Whatman GF/F para determinar la biomasa de clorofila *a*, y la segunda, a través de filtros GF/A para determinar el peso seco libre de cenizas (AFDW, por su sigla en inglés), otra conveniente forma de medir la biomasa de perifiton. Después de pasar las muestras por el filtro de fibra de vidrio, el procedimiento de extracción fue el mismo que se describió anteriormente. Para la determinación de AFDW, los filtros fueron secados en horno a 80°C por 24 horas o hasta que se hubo alcanzado un peso constante, luego fueron quemados a 450°C por 6 horas [18]. Un método útil para evaluar los efectos de las aguas residuales orgánicas en el índice autotrófico. Este índice se determina como la razón de AFDW a clorofila *a* en el perifiton recolectado en sustratos artificiales, e indica el grado del efecto que tiene el desecho orgánico. El índice autotrófico aumenta en proporción a la concentración de materia orgánica, debido a que los heterotrofos ocupan una mayor porción de la biomasa a medida que los desechos orgánicos aumentan [19]. Como se sugiere en otros estudios [20], un valor de 400 representa el límite más alto que indica condiciones de agua no contaminada.

Cantidades físicas, químicas y biológicas

A lo largo de todo el experimento de mesocosmos, la temperatura del agua fue medida continuamente. El agua en cada grupo de estanques (control, 0% EPC; tratamiento, 4–5% EPC; efluente, 100% EPC) también fue monitoreada de manera semanal o con mayor frecuencia para cuantificar el oxígeno disuelto (mg/L), el pH, el total de sólidos disueltos (mg/L), y la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) usando un sensor multiparámetro YSI 85 (YSI, Yellow Springs, OH, EE.UU.). Desde comienzos de enero de 2006, se cuantificaron variables adicionales (demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno, nitrógeno amoniacal, nitrato y nitrógeno Kjeldahl; todos en mg/L) mensualmente en el laboratorio analítico de la planta CELCO. Desde comienzos de junio de 2006, se agregaron a la lista las cuantificaciones mensuales de los totales de sulfato y bicarbonato.

Durante todo el experimento, la naturaleza del efluente tratado descargado al sistema de mesocosmos fue aquella de las condiciones normales de operación de la planta de celulosa kraft. Este efluente es el resultado de un proceso avanzado que incluye blanqueamiento con dióxido de cloro, libre de cloro elemental, y tres fases subsecuentes en que se trata el efluente líquido. El tratamiento primario corresponde a la sedimentación gravitacional de sólidos suspendidos, el secundario, la biodegradación aeróbica, y el terciario a una coagulación química para la decoloración.

Análisis estadísticos

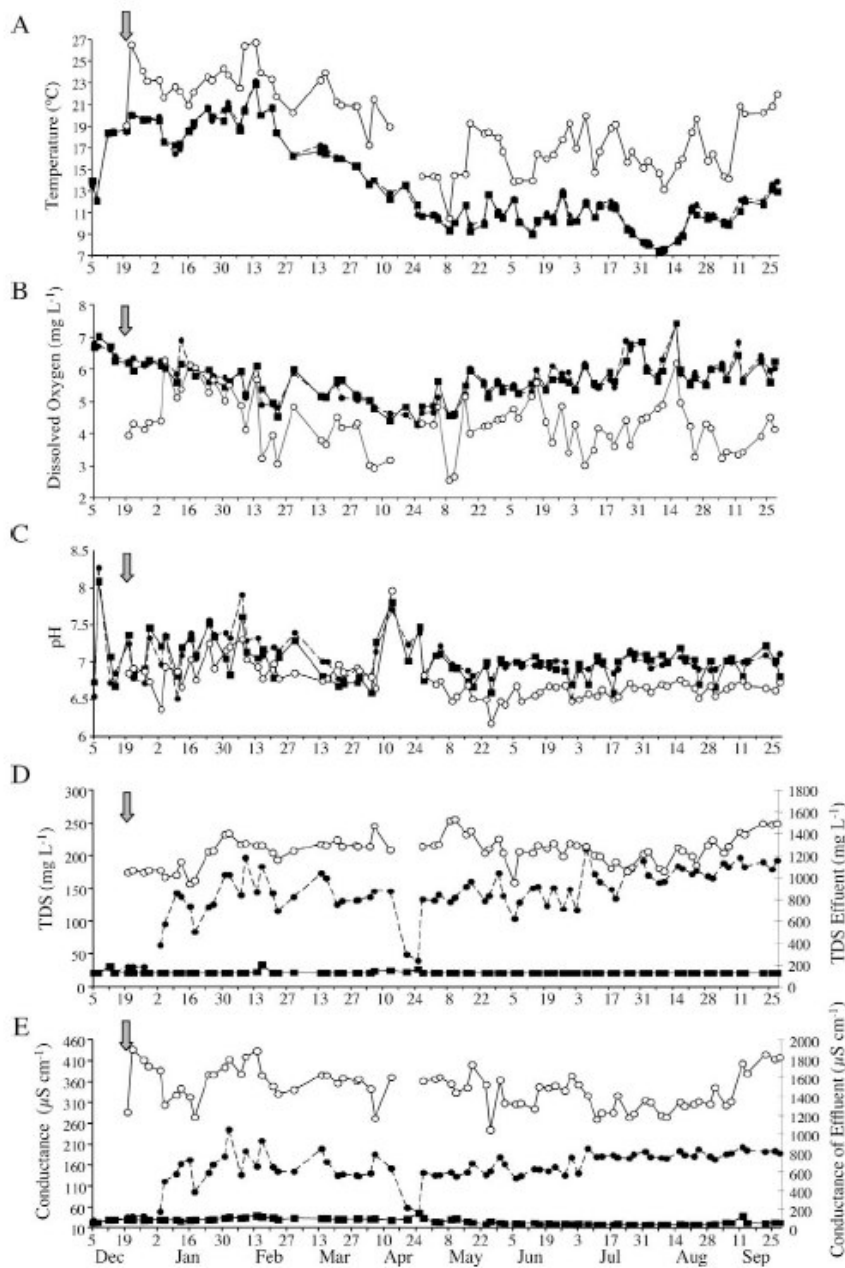
Durante el presente estudio, se cuantificaron dentro del mesocosmos diversas variables medioambientales (temperatura del agua, oxígeno disuelto y pH), que es probable que varíen según la estación y como resultado de actividad biológica. El tamaño y forma de nuestro diseño fue tal que podemos estar seguros de que cada unidad experimental (estanque) está expuesta de manera similar a dicha heterogeneidad del medioambiente. De ahí que nuestro diseño no tiene que lidiar con la heterogeneidad que ocurre con frecuencia dentro de un medio controlado, aspecto fundamental que debe considerarse en diseños experimentales como éste [21]. Nuestro diseño corresponde a un diseño en bloque (es decir, dos filas de estanques, cada una recibe un tipo de agua determinado: tratamiento o control) en que las variables dependientes relacionadas con el crecimiento se cuantifican en varios individuos dentro de cada estanque. Probamos la heterocedasticidad o salida de lo normal de todas las variables examinadas. Cuando no se cumplieron las suposiciones paramétricas (los residuos fueron analizados con el test de Cochran), se usaron transformaciones

apropiadas ($\log(x + 1)$) [22]. Se usó análisis de varianza de una vía con medidas repetidas, con el agua (tratamiento y control) como el factor intersujetos y el tiempo como el factor intrasujetos [23]. Se analizaron interacciones de nivel más alto con el test de Student– Newman–Keuls. Todos los tests fueron realizados con Statistica® (Versión 6.0; Statsoft, Tulsa, OK, EE.UU.), y el nivel de significación (α) se estableció en 0,05 desde el principio hasta el fin.

RESULTADOS

Cuantificaciones físicas y químicas

Durante el experimento, la temperatura dentro del mesocosmos presentó una variabilidad estacional esperada (Fig. 2A) y no varió significativamente entre los estanques de tratamiento y los controles ($F_{1, 158} = 0,065$; $p = 0,779$). Es probable que la temperatura se acerque a la temperatura del río, debido a que el diseño se encuentra ubicado cerca de la toma de agua, como a unos 100 m. La influencia térmica del efluente considerablemente más tibio, fue insignificante ($F_{2, 231} = 45,091$; $p < 0,0001$). Un patrón similar se observó para la variación en el tiempo en la concentración de oxígeno (Fig. 2B), que se encontraba cerca del punto o en el punto de saturación en el agua de todos los estanques ($F_{1, 158} = 0,067$; $p = 0,796$). No obstante, el promedio de la concentración más baja de oxígeno en el efluente al 100% ($4,29 \pm 0,71$ mg/L), no afectó nuestro sistema y difirió significativamente del promedio del agua experimental ($F_{2, 231} = 89,471$; $p < 0,0001$). El pH de todo el período tanto para las aguas de tratamiento como las de control tuvo valores promedio de 7,05 y 7,03, respectivamente, y varió de manera similar con el tiempo ($F_{1, 158} = 0,146$; $p = 0,703$). El efluente al 100%, no obstante, fue leve, pero significativamente más ácido ($F_{2, 231} = 14,548$; $p < 0,0001$), con solo un valor alto en febrero de 2006 (Fig. 2C). La influencia del EPC en términos de la cantidad del total de sólidos disueltos y conductividad, sin embargo, fue significativa (total de sólidos disueltos: $F_{2, 230} = 3613,209$; $p < 0,0001$; conductividad: $F_{2, 230} = 5117,329$; $p < 0,0001$). En cada caso, los valores medidos en el agua de tratamiento fueron intermedios (a pesar de estar más próximos al control) entre aquellos medidos en el efluente y aquellos medidos en el control (Fig. 2D y E).



| | | |
|--|---|--|
| Temperature (°C) | : | Temperatura (°C) |
| Dissolved Oxygen (mgL ⁻¹) | : | Oxígeno disuelto (mgL ⁻¹) |
| pH | : | pH |
| TDS (mgL ⁻¹) | : | TSD (mgL ⁻¹) |
| TDS effluent (mgL ⁻¹) | : | TSD en el efluente (mgL ⁻¹) |
| Conductance (µS cm ⁻¹) | : | Conductancia (µS cm ⁻¹) |
| Conductance of Effluent (µS cm ⁻¹) | : | Conductancia del efluente (µS cm ⁻¹) |

Fig. 2. Variables físicas y químicas cuantificadas regularmente dentro del mesocosmos desde mediados de diciembre de 2005 a septiembre de 2006: Temperatura (A); oxígeno disuelto (B); pH (C); total de sólidos disueltos (D); conductancia (E). Todas las variables cuantificadas a partir de lo siguiente: ● = agua de tratamiento (efluente de la planta de celulosa (EPC) al 4–5%); ■ = agua control (0% EPC); ○ = efluente completo (100% EPC). Las flechas identifican la fecha en que el sistema empezó a recibir aguas del efluente. TSD = total de sólidos disueltos.

Las variables adicionales de la calidad del agua medidas mensualmente (Tabla 1) no mostraron, en general, grandes diferencias en magnitud entre los tratamientos. Entre las dos variables de la demanda de oxígeno que se midieron, sólo la demanda química de oxígeno mostró valores levemente más altos en las muestras del agua de tratamiento, particularmente durante el primer mes; no obstante, en la mayoría de los casos, los valores fueron muy similares entre los tratamientos (Tabla 1). La concentración de sulfato (cuantificada desde junio) fue la única variable que consistentemente mostró mayores valores en los estanques de tratamiento (4–5% v/v EPC), mientras que la concentración de bicarbonato siguió una tendencia similar excepto por los últimos dos meses, cuando los valores en los estanques de control fueron mayores. Independiente de la variabilidad detectada en la magnitud de todas estas medidas, los valores observados fueron menores que las concentraciones recomendadas por las pautas medioambientales chilenas pertinentes (al menos en aquellos casos para los que existen pautas, ver última columna en la Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones (mg/L) de diversas variables de la calidad del agua medidas en estanques de tratamiento (T) con efluente de planta de celulosa (EPC) de 4 al 5% (v/v) y en estanques de control (C) con EPC al 0%^a

| Variables | Enero | | Febrero | | Marzo | | Abril | | Mayo | | Junio | | Julio | | Agosto | | Septiembre | | NCh |
|-------------------------------|-------|-----|---------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|------|-------|-------|--------|-------|------------|-------|--------------------|
| | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | |
| Demanda bioquímica de oxígeno | 2,15 | 2,1 | 4,78 | 4,6 | 7,9 | 8,02 | NM | NM | 3,67 | 4,33 | 6,8 | 5 | <2,0 | <2,0 | 2 | 2,76 | <2,0 | <2,0 | 35 ^b |
| Demanda química de oxígeno | 25 | 8,5 | 45,33 | 11,33 | 8 | 5,75 | NM | NM | 7,5 | 5,5 | 5 | 7 | 5 | ND | 9,33 | 2,75 | 8,5 | 7 | NA |
| Nitrógeno amoniacal | NM | NM | 0,045 | 0,038 | 0,07 | 0,06 | NM | NM | 0,14 | 0,1 | NM | NM | 0,12 | 0,12 | 0,09 | 0,08 | 0,08 | 0,11 | 2,5 ^c |
| Nitrito | NM | NM | ND | ND | ND | ND | NM | NM | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | >0,06 ^c |
| Nitrato | NM | NM | 0,35 | ND | 0,33 | 0,38 | NM | NM | ND | ND | 0,11 | 0,11 | 0,01 | ND | 0,13 | 0,08 | ND | 0,17 | 50 ^d |
| Nitrógeno Kjeldahl | NM | NM | 0,2 | 0,22 | 0,2 | 0,2 | NM | NM | 0,32 | 0,44 | 0,36 | 0,24 | 0,14 | 0,24 | 0,18 | 0,18 | 0,12 | 0,19 | 50 ^b |
| Fósforo total | NM | NM | 0,2 | 0,2 | <0,20 | <0,20 | NM | NM | <0,20 | <0,20 | 0,2 | 0,2 | <0,20 | <0,20 | <0,20 | <0,20 | <0,20 | <0,20 | 10 ^b |
| Sulfato | | | | | | | | | | | 57,8 | 5,4 | 97,45 | 7,5 | 36,8 | 4,7 | 95,1 | 4,8 | 1.000 ^b |
| Bicarbonato | | | | | | | | | | | 40,9 | 26,8 | 19,95 | 13,1 | 39,7 | 48,8 | 16 | 45,5 | NA |
| pH | 7,2 | 7,2 | 7,1 | 7,2 | 6,9 | 6,8 | 7,3 | 7,4 | 6,9 | 6,8 | 6,9 | 6,9 | 6,9 | 6,9 | 6,9 | 6,9 | 7 | 7 | 6-8,5 ^b |

^a Las muestras fueron recolectadas mensualmente durante el 2006 excepto en abril. Las concentraciones menores a los límites de detección de los instrumentos (0,01 mg/L para la mayoría de las variables, excepto para el total de fósforo [0,2 mg/L] y DBO5 [5-d demanda bioquímica de oxígeno; 2,0 mg/L]) están marcadas como ND. NCh denota los límites de concentración mencionados por diversas normas chilenas sobre la calidad del agua. NA = las normas no están disponibles; NM = no medido.

^b Decreto Supremo 90/2000 del Ministerio Secretaría General de la Presidencia (Chile) [29].

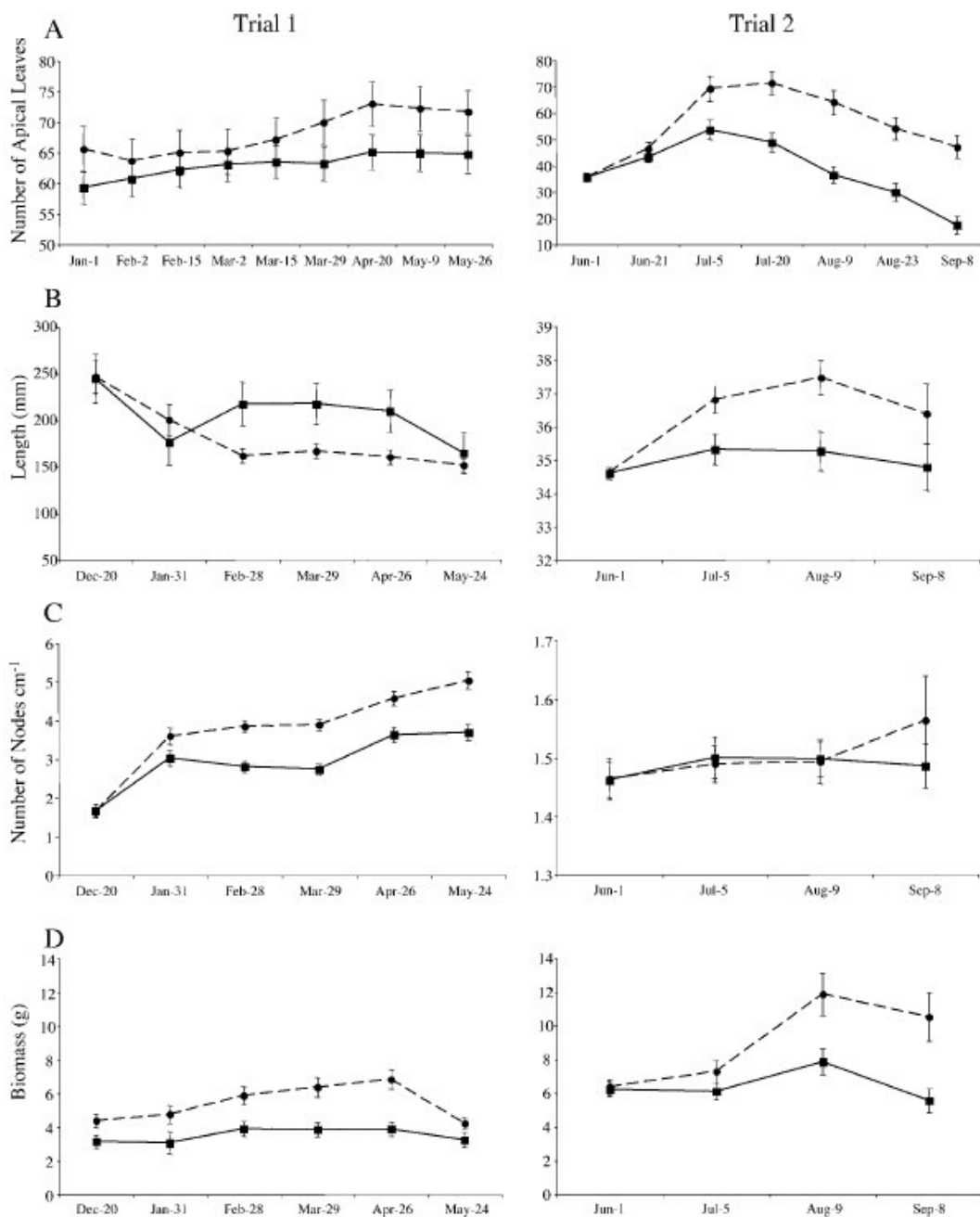
^c Guía de la CONAMA para el establecimiento de de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para Aguas Continentales Superficiales y Marinas (Chile) [30].

^d Norma Chilena Oficial NCH 409/1 de 2005 sobre requisitos para el agua potable [31]

Cuantificaciones del productor primario

El número de hojas apicales, nuestra variable para *E. densa* medida con mayor frecuencia, mostró cambios significativos con el tiempo. En ambos casos (ensayos 1 y 2), el número promedio de hojas fue mayor en las plantas expuestas al EPC (Fig. 3A), no obstante, hacia el término de cada ensayo, estos valores disminuyeron. A pesar de esto, las interacciones significativas detectadas entre las fuentes de variación (efluente y tiempo) durante cada ensayo indican que las plantas que recibieron agua del efluente produjeron hojas a una tasa más rápida que las plantas control (Tabla 2). Durante el ensayo 1, en ambos casos (tratamiento y control), nuevas hojas se produjeron continuamente hasta el 20 de abril (Fig. 3A). Durante el segundo ensayo, la formación de nuevas hojas apicales (en los estanques de tratamiento y en los estanques de control) ocurrió hasta el 5 de julio y el 22 de julio, respectivamente, y la tasa de formación de hojas posteriormente disminuyó en ambos casos (Fig. 3A). Durante el ensayo 1, la longitud de las plantas no mostró diferencias que pudieran atribuirse al efecto de cualquiera de los tratamientos (Fig. 3B); no obstante, la significativa interacción entre el efluente y el tiempo sugiere que con el tiempo, las plantas control crecieron más en longitud (Tabla 2). Durante el ensayo 2, sin embargo, las plantas de tratamiento se volvieron más largas poco después del inicio del estudio. El efecto general del efluente sobre esta variable fue significativo y positivo, y el cambio con el paso del tiempo también fue significativo (Tabla 2). El número de nudos que se formaron a una tasa constante y considerablemente más rápida en las plantas de tratamiento, se comparó al de las plantas control sólo durante el primer ensayo, mientras que durante el segundo ensayo se formaron nudos nuevos en todas las plantas. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre los tratamientos (Fig. 3C y Tabla 2). Durante cada ensayo, las plantas expuestas al efluente mostraron una pérdida de peso casi constante (excepto por una pérdida de peso medida durante la última fecha de cada ensayo), pero un significativo incremento en su biomasa (Fig. 3D). En cada caso, todos los factores fueron significativos, incluida la interacción entre efluente y tiempo (Tabla 2).

Para las cuantificaciones adicionales realizadas durante el segundo ensayo—a saber, longitud apical, número de ramas laterales y número de raíces (Fig. 4)—la adición del efluente tuvo un efecto significativo sobre la magnitud de estas tres variables en comparación con las plantas control (Tabla 3). A pesar de que se formaron considerablemente más raíces en las plantas que recibían el efluente, su tasa de formación en el tiempo (interacción entre efluente y tiempo) no fue diferente entre los tratamientos (Fig. 4C y Tabla 3). La biomasa de la clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$) cuantificada mensualmente (entre febrero y octubre) en muestras de agua fue altamente variable con el tiempo (Fig. 5), sin presentar una diferencia significativa general entre los tratamientos; no obstante, la diferencia significativa observada para el factor tiempo y para la interacción entre tiempo y efluente (Tabla 4) es probable que sea provocada por un pico en la biomasa medido en las muestra de tratamiento durante el mes de agosto. Además, en dos de tres ocasiones (julio y agosto), la biomasa de la clorofila *a* en los estanques de tratamiento fue significativamente más alta, y lo contrario ocurrió en el mes de marzo (Fig. 5).



Trial 1/Trial 2 : Ensayo 1/ Ensayo 2
 Number of apical leaves : Número de hojas apicales
 Length (mm) : Longitud (mm)
 Number of nodes cm^{-1} : Número de nudos cm^{-1}
 Biomass (g) : Biomasa (g)

Fig. 3. Variables morfológicas similares (\pm error estándar) medidas en *Egeria densa* durante dos ensayos separados (ensayo 1, columna de la izquierda; ensayo 2, columna de la derecha). Las plantas usadas durante el ensayo 1 fueron, en promedio, más largas y livianas que aquellas usadas en el ensayo 2. Número de hojas apicales (A); longitud de la planta (B); número de nudos (C); biomasa de la planta (D). Para el último ensayo se seleccionaron plantas muy similares. ● = plantas con tratamiento; ■ = plantas control.

Tabla 2. Análisis de varianza de mediciones repetidas con diseño en bloque para variables morfométricas medidas en *Egeria densa* durante dos ensayos separados del experimento con el mesocosmos^a

| Fuente de variación | Estudio 1 | | | | Estudio 2 | | | |
|-----------------------------|-----------|----------|-------------|----------|-----------|--------|-------------|----------|
| | <i>df</i> | ms | <i>F</i> | <i>p</i> | <i>df</i> | ms | <i>F</i> | <i>p</i> |
| N° de hojas apicales | | | | | | | | |
| Efluente | 1 | 1,836 | 24,20 | <0,0001 | 1 | 0,6021 | 13,11 | 0,0020 |
| Error | 17 | 0,076 | | | 18 | 0,0459 | | |
| Tiempo | 8 | 0,011 | 20,88 | <0,0001 | 5 | 0,1651 | 21,08 | <0,0001 |
| Tiempo x efluente | 8 | 0,002 | 4,25 | <0,0001 | 5 | 0,0548 | 7,00 | <0,0001 |
| Error | 136 | 0,001 | | | 90 | 0,0078 | | |
| Longitud total de la planta | | | | | | | | |
| Efluente | 1 | 14,82 | 0,1298 | 0,7231 | 1 | 41,2 | 4,46 | 0,0489 |
| Error | 17 | 114,23 | | | 18 | 9,22 | | |
| Tiempo | 5 | 2,84 | 0,1996 | 0,9618 | 3 | 11,61 | 5,29 | 0,0028 |
| Tiempo x efluente | 5 | 61,95 | 4,3616 | 0,0013 | 3 | 4,99 | 2,27 | 0,0905 |
| Error | 85 | 14,20 | | | 54 | 2,2 | | |
| N° de nudos/cm | | | | | | | | |
| Efluente | 1 | 14,002 | 12,175 | 0,0028 | 1 | 0,0106 | 0,245 | 0,6267 |
| Error | 17 | 1,150 | | | 18 | 0,0433 | | |
| Tiempo | 5 | 19,056 | 62,560 | <0,0001 | 3 | 0,0088 | 0,955 | 0,4206 |
| Tiempo x efluente | 5 | 0,689 | 2,261 | 0,0500 | 3 | 0,0133 | 1,435 | 0,2426 |
| Error | 85 | 0,305 | | | 54 | 0,0092 | | |
| Biomasa total de la planta | | | | | | | | |
| Efluente | 1 | 124,5647 | 4,431603502 | 0,0494 | 1 | 0,3641 | 14,38952349 | 0,0013 |
| Error | 17 | 28,1082 | | | 18 | 0,0253 | | |
| Tiempo | 5 | 8,6295 | 9,552079605 | <0,0001 | 3 | 0,1217 | 35,95867413 | <0,0001 |
| Tiempo x efluente | 5 | 3,8866 | 4,302178939 | 0,0015 | 3 | 0,0675 | 19,94936673 | <0,0001 |
| Error | 85 | 0,9034 | | | 54 | 0,0033 | | |

^a *df* = grados de libertad; ms = media de cuadrados. Un valor *p* en cursiva indica una diferencia significativa.

La biomasa del perifiton en los platillos artificiales, cuantificada de manera independiente como clorofila *a* y AFDW, mostró un crecimiento significativamente mayor en los platillos expuestos al efluente (estanques de tratamiento). Este patrón fue similar cuando se consideró cualquiera de las medidas (Fig. 6A y B). En ambos casos, el tratamiento (efluente) y el factor tiempo fueron significativos, a pesar de que su interacción no lo fue (Tabla 5). El cociente entre AFDW y la biomasa de la clorofila *a*, que determina un índice autotrófico en el perifiton recolectado en el sustrato artificial, no varió considerablemente con el tiempo ni mostró diferencias perceptibles entre los tratamientos (Fig. 6C).

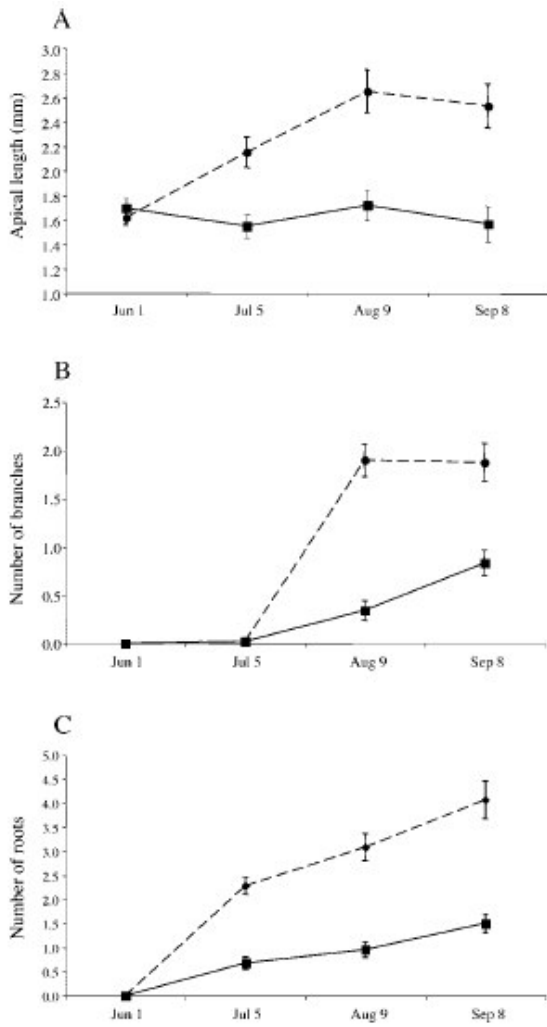
DISCUSIÓN

Este experimento de mesocosmos nos permitió estudiar el potencial efecto de los EPC sobre diferentes parámetros relacionados con el crecimiento en el caso de productores primarios en el Río Cruces cerca de Valdivia, Chile. A pesar de que nuestro principal interés fue investigar el efecto del efluente diluido sobre la planta acuática *E. densa*, además medimos la abundancia de la acumulación de fitoplácton y perifiton. A pesar de que éstos pueden representar sólo una porción de los componentes bióticos de cualquier sistema acuático, son de vital importancia dada su posición en la estructura trófica. De ahí que, comprender cómo estos organismos sobrellevan el acontecimiento de actividades humanas, como las descargas provenientes de las plantas de celulosa, resulta clave para comprender el funcionamiento de ecosistemas completos. De acuerdo con M.G. Dubé, “Se han hechos avances significativos en la evaluación y posterior reducción de los efectos de los efluentes de plantas de celulosa (EPC) sobre sistemas acuáticos . . . Durante los últimos 30 años, y con mayor insistencia desde mediados de la década de los 80, se han observado efectos medioambientales, se han implementado regulaciones y la industria ha respondido a estas

regulaciones con mejores procesos de control y el tratamiento de los efluentes” [6]. A pesar de que Dubé se estaba refiriendo principalmente al desarrollo de esta actividad industrial en el hemisferio norte, una tendencia similar se ha observado en Chile durante la década pasada. Junto con estas mejoras, se han logrado importantes avances en la evaluación de los efectos de los efluentes mediante la implementación de métodos experimentales, como los sistemas de mesocosmos [10–12,24], que permiten a los científicos lograr una mejor comprensión de los efectos específicos de las sustancias contaminantes en los ecosistemas acuáticos.

El presente estudio fue implementado principalmente para satisfacer la necesidad de comprender la posible relación entre los efluentes provenientes de las operaciones de la planta de celulosa CELCO, próxima a Valdivia, y el acontecimiento de una alteración generalizada del ecosistema, observada primeramente en el Río Cruces entre los años 2004 y 2005. Por lo tanto, uno de nuestros objetivos fue recrear las condiciones que simularan de mejor manera el sistema natural que recibe estos efluentes, aislando los factores y al mismo tiempo manteniendo el realismo del medioambiente. En el presente estudio nos hemos centrado principalmente en *E. densa*, una de las especies que ha experimentado un visible descenso en su abundancia a lo largo del sistema del Río Cruces.

A lo largo del presente estudio, los EPC no tuvieron un efecto negativo perceptible sobre los parámetros relacionados con el crecimiento que fueron medidos para *E. densa*. De hecho, se observó lo opuesto en muchas de las mediciones. Al menos en uno de dos ensayos independientes (y, en muchos casos, en ambos), la magnitud de variables como la formación de nuevas hojas apicales, formación de nudos, o biomasa total fue mayor en las plantas que se mantuvieron dentro de estanques que recibían efluente, en comparación con las plantas que se mantuvieron en estanques control que recibían agua pura de río. Otros parámetros adicionales medidos desde junio, como longitud apical, formación de ramas laterales y número de raíces, mostraron la misma tendencia en el tiempo. Este mayor crecimiento generalizado fue medido en plantas expuestas a EPC al 4 a 5% (v/v), a pesar del hecho de que ninguna de las variables medidas relacionadas con nitrógeno o fósforo (Tabla 1) mostró diferencias importantes entre los tratamientos. Incluso considerando que el carbono, en forma de bicarbonato, podría representar un nutriente limitante, las diferencias en la concentración observadas entre las aguas de control y tratamiento no explican este efecto positivo general del efluente, debido a que las plantas de cada grupo de estanques experimentaron tendencias similares en sus patrones de crecimiento. Por lo tanto, cierto efecto acumulativo aún no detectado en nuestras mediciones de la calidad del agua, de alguna manera probablemente promueve tasas de crecimiento más altas en plantas expuestas a este nivel del efluente. La falta de investigaciones comparables que usen plantas dentro de sistemas de mesocosmos nos impide, en este punto, hacer más especulaciones acerca de los mecanismos responsables de estas diferencias en el crecimiento altamente significativas.



Apical length (mm) : Longitud apical (mm)
 Number of branches : Número de ramas
 Number of roots : Número de raíces

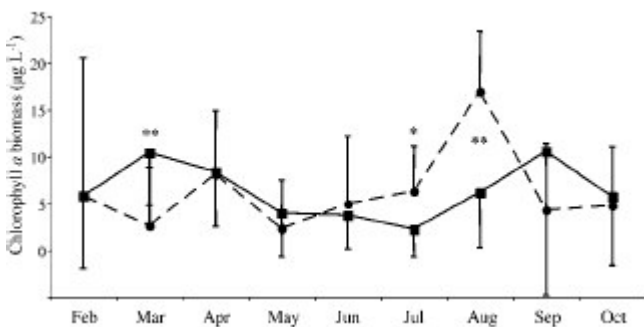
Fig. 4. Variables adicionales medidas en *Egeria densa* en cuatro ocasiones durante el ensayo dos. (A) Longitud apical usando una marca en el origen. (B) Número de ramas laterales producidas. (C) Número de nuevas raíces formadas. En todos los casos, las barras de error denotan el error estándar. ● = plantas con tratamiento; ■ = plantas control.

Tabla 3. Análisis de varianza de mediciones repetidas con diseño en bloque para variables morfométricas en *Egeria densa* durante el segundo ensayo del experimento con el mesocosmos^a

| Fuente de variación | df | ms | F | p |
|------------------------------|----|--------|--------|---------|
| Longitud apical | | | | |
| Efluente | 1 | 0,369 | 15,472 | <0,0001 |
| Error | 18 | 0,0239 | | |
| Tiempo | 3 | 0,0403 | 5,906 | 0,0015 |
| Tiempo x efluente | 3 | 0,0503 | 7,366 | 0,0003 |
| Error | 54 | 0,0068 | | |
| N° de ramas laterales | | | | |
| Efluente | 1 | 3,1684 | 31,870 | <0,0001 |
| Error | 18 | 0,0994 | | |
| Tiempo | 2 | 5,8386 | 86,272 | <0,0001 |
| Tiempo x efluente | 2 | 0,6881 | 10,168 | 0,0003 |
| Error | 36 | 0,0677 | | |
| N° de raíces | | | | |
| Efluente | 1 | 3,2523 | 53,030 | <0,0001 |
| Error | 16 | 0,0613 | | |
| Tiempo | 2 | 0,2619 | 7,463 | 0,0022 |
| Tiempo x efluente | 2 | 0,0127 | 0,361 | 0,6998 |
| Error | 32 | 0,0351 | | |

^a df = grados de libertad; ms = media de cuadrados. Un valor *p* en cursiva indica una diferencia significativa.

También consideramos la cuantificación sistemática de la clorofila *a* desde muestras de agua como una forma de comparar la relativa abundancia de fitoplácton entre los tratamientos. A pesar de la alta variabilidad descrita por este parámetro en el lapso de nueve meses, el fitoplácton fue significativamente más abundante en dos oportunidades (julio y agosto) en los estanques de tratamiento. Este período también corresponde al inicio de la primavera austral. Este resultado también sugiere la existencia de algún factor dentro de los estanques de tratamiento responsable del mayor crecimiento del fitoplácton.



Chlorophyll *a* biomass ($\mu\text{g L}^{-1}$) : Biomasa de la clorofila *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Fig. 5. Biomasa de la clorofila *a* (\pm desviación estándar) a partir de muestras de agua obtenidas mensualmente desde los estanques de tratamiento y control del mesocosmos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos para las fechas dadas. ● = plantas con tratamiento; ■ = plantas control. Prueba de Student–Newman–Keuls: **p* < 0,01; ***p* < 0,001.

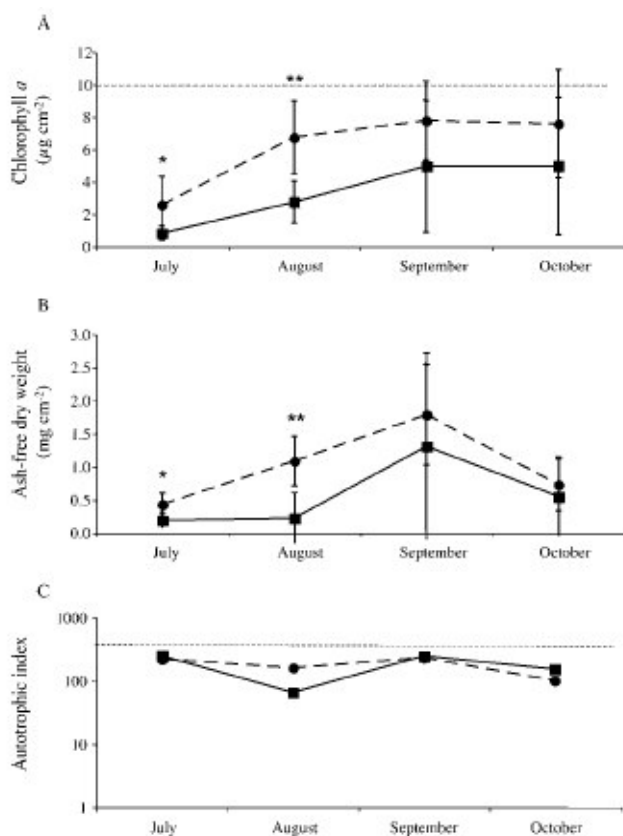
Como se observó en otros estudios similares, la abundancia de perifitón respondió de manera positiva a la adición de EPC [8,25,26] incluso en la concentración al 4 a 5%(v/v). Como se mencionó anteriormente, ninguno de los nutrientes (nitrógeno, fósforo y carbono) mostró diferencias marcadas entre los tratamientos, al menos durante las cuantificaciones mensuales; no obstante, la biomasa de perifitón, cuantificada tanto como clorofila *a* y como AFDW, fue

significativamente mayor dentro de los estanques de tratamiento. A pesar de que fueron más altos, estos últimos valores aún fueron menos que aquellos recomendados como límites máximos aceptables para la vida acuática en corrientes de agua dulce [27]. Se espera que el índice autotrófico, método útil para evaluar los efectos de las aguas de desecho orgánico [20], aumente de manera proporcional con la concentración de materia orgánica (o la demanda bioquímica de oxígeno), debido a que los heterotrofos ocupan una mayor porción de la biomasa a medida que el desecho orgánico aumenta [19]. Los valores calculados de este índice estuvieron muy cerca entre ambos tratamientos, y todos fueron menores que el valor 400, sugerido como el límite máximo que indica condiciones de agua limpia [20,28]. Además, estos resultados, a pesar de ser esperados dada la naturaleza de las fuentes de agua con que alimentamos nuestro sistema, nos permiten descartar la existencia de enriquecimiento orgánico usando una medida independiente y no simplemente basándonos en la magnitud de las variables químicas en el agua.

Tabla 4. Análisis de varianza de mediciones repetidas con diseño en bloque para biomasa de clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$) cuantificada en muestras de agua obtenidas mensualmente (febrero a octubre de 2006) del experimento en el mesocosmos^a

| Fuente de variación | df | ms | F | p |
|-------------------------------|-----|--------|-------|---------|
| Biomasa de clorofila <i>a</i> | | | | |
| Efluente | 1 | 0,7485 | 0,568 | 0,4606 |
| Error | 18 | 1,3166 | | |
| Tiempo | 8 | 4,8258 | 4,358 | <0,0001 |
| Tiempo x efluente | 8 | 5,3473 | 4,830 | <0,0001 |
| Error | 144 | 1,1074 | | |

^a df = grados de libertad; ms = media de cuadrados. Un valor *p* en cursiva indica una diferencia significativa.



Chlorophyll *a* ($\mu\text{g cm}^{-2}$) : Clorofila *a* ($\mu\text{g cm}^{-2}$)
 Ash-free dry weight (mg cm^{-2}) : Peso seco libre de cenizas (mg cm^{-2})
 Autotrophic index : Índice autotrófico (IA)

Fig. 6. Cambio en el tiempo en la biomasa de perifitón (\pm desviación estándar) (A) clorofila *a* y (B) peso seco libre de cenizas (AFDW) de muestras obtenidas mensualmente de platillos mantenidos dentro de cada estanque de tratamiento y control en el mesocosmos. La línea punteada en A indica el límite máximo aceptable recomendado para la vida acuática en corrientes de agua dulce (ver texto). También se indica (C) el índice autotrófico (IA; AFDW: clorofila *a*) del perifitón recolectado de estos mismos platillos. La línea punteada en C representa el límite máximo recomendado del IA para aguas limpia (ver texto). ● = plantas con tratamiento; ■ = plantas control. Prueba de Student–Newman–Keuls: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Tabla 5. Análisis de varianza de mediciones repetidas con diseño en bloque para biomasa de clorofila *a* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y peso seco libre de cenizas (AFDW; mg/cm^2) de perifitón cuantificadas mensualmente (julio a octubre de 2006) en muestras de platillos artificiales mantenidos dentro del experimento del mesocosmos^a

| Fuente de variación | df | ms | F | p |
|--------------------------------------|----|--------|--------|-------------------|
| Biomasa de clorofila <i>a</i> | | | | |
| Efluente | 1 | 9,2773 | 20,489 | <i>0,0003</i> |
| Error | 18 | 0,4528 | | |
| Tiempo | 3 | 5,2573 | 18,022 | <i><0,0001</i> |
| Tiempo x efluente | 3 | 0,1110 | 0,380 | 0,7675 |
| Error | 54 | 0,2917 | | |
| AFDW | | | | |
| Efluente | 1 | 3,8859 | 7,079 | <i>0,0159</i> |
| Error | 18 | 0,5490 | | |
| Tiempo | 3 | 5,6554 | 14,628 | <i><0,0001</i> |
| Tiempo x efluente | 3 | 0,4792 | 1,240 | 0,3044 |
| Error | 54 | 0,3866 | | |

^a df = grados de libertad; ms = media de cuadrados. Un valor *p* en cursiva indica una diferencia significativa.

La magnitud de la variación de la mayoría de las variables físicas y químicas medidas regularmente en nuestros estanques experimentales (de tratamiento y de control) fue esperada e influenciada principalmente por factores ambientales y estacionales. Una excepción fue la variabilidad en el tiempo de los sólidos disueltos y de la conductancia, que dentro de los estanques de tratamiento se vieron claramente afectadas por el aporte del efluente (Fig. 2). Entre las variables medidas mensualmente (Tabla 1), sólo la concentración de sulfato varió de acuerdo a lo esperado, con concentraciones más altas medidas dentro de los estanques de tratamiento. Por lo tanto, el presente estudio no detectó una fuente clara de nutrientes que darían cuenta de las altas tasas de crecimiento generalizadas de diversos productores primarios en un sistema que funcionó de manera ininterrumpida por más de nueve meses. Los experimentos con mesocosmos de larga duración, como éste, se justifican y deben ser considerados, particularmente cuando el objetivo es detectar o comprender el efecto de sustancias contaminantes sobre parámetros estructurales de un ecosistema (por ejemplo, productores primarios) que experimentan importantes cambios naturales estacionales.

Agradecimientos—Agradecemos la entusiasta asistencia en laboratorio de Luis Henríquez y las instalaciones proporcionadas por José M. Fariña. El manuscrito se benefició sustancialmente de los comentarios realizados por dos revisores anónimos. Esta investigación fue financiada por el aporte para investigación de la Pontificia Universidad Católica (PUC)-Arauco y por el aporte Fondo de Áreas Prioritarias (FONDAP) 1501-001 (Programas 2 y 5) al Centro de Estudios Avanzados en Ecología y Biodiversidad.

REFERENCIAS

1. Ives AR, Foufopoulos J, Klopfer ED, Klug JL, Palmer TM. 1996. Bottle or big-scale studies: How do we do ecology? *Ecology* 77: 681–685.
2. Petersen JE, Cornwell JC, Kemp WM. 1999. Implicit scaling in the design of experimental aquatic ecosystems. *Oikos* 85:3–18.
3. Lamberti GA, Steinman AD. 1993. Research in artificial streams: Applications, uses, and abuses. *J North Am Benthol Soc* 12:313–384.

4. Organization for Economic Cooperation and Development. 2001. *Environmental Outlook*. Paris, France.
5. Gillespie W, Schwartz J. 2004. Bringing science to bear on the water-quality regulatory process. In Borton DL, Hall TJ, Fisher RP, Thomas JF, eds, *Pulp and Paper Mill Effluent Environmental Fate and Effects*. DesTech, Lancaster, PA, USA, pp 554–563.
6. Dubé MG. 2004. Advances in assessing the effects of pulp and paper mill effluents on aquatic systems. In Borton DL, Hall TJ, Fisher RP, Thomas JF, eds, *Pulp and Paper Mill Effluent Environmental Fate and Effects*. DesTech, Lancaster, PA, USA, pp 397–409.
7. Lowell RB, Culp JM, Dube´ MG. 2000. A weight-of-evidence approach for northern river risk assessment: Integrating the effects of multiple stressors. *Environ Toxicol Chem* 19:1182–1190.
8. Culp JM, Lowell RB, Cash KJ. 2000. Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weightof- evidence risk assessments for large rivers. *Environ Toxicol Chem* 19:1167–1173.
9. Wiegner TN, Kaplan LA, Newbold JD, Ostrom PH. 2005. Contribution of dissolved organic C to stream metabolism— A mesocosm study using ¹³C-enriched tree-tissue leachate. *J North Am Benthol Soc* 24:48–67.
10. Culp JM, Podemski CL, Cash KJ, Lowell RB. 1996. Utility of field-based artificial streams for assessing effluent effects on riverine ecosystems. *J Aquat Ecosyst Health* 5:117–124.
11. Dubé MG, MacLatchy DL, Culp JM, Gillis G, Parker R, Courtenay S, Gilman C. 2002. Utility of mobile, field-based artificial streams for assessing effects of pulp mill effluents on fish in the Canadian environmental effects monitoring (EEM) program. *J Aquat Ecosyst Stress Recov* 9:85–102.
12. Dubé MG, Culp JM, Cash KJ, Glozier NE, MacLatchy DL, Podemski CL, Lowell RB. 2002. Artificial streams for environmental effects monitoring (EEM): Development and application in Canada over the past decade. *Water Qual Res J Can* 37:155–180.
13. Ramirez C, Figueroa H, Hauenstein E, Contreras D. 1989. Distribution of benthic flora in lower course of the Valdivian River, Chile. *Estuaries* 12:111–118.
14. Haramoto T, Ikusima I. 1988. Life cycle of *Egeria densa* Planch., an aquatic plant naturalized in Japan. *Aquat Bot* 30:389–403.
15. Barko JW, Smart RM. 1981. Comparative influences of light and temperature on the growth and metabolism of selected submersed freshwater macrophytes. *Ecol Monogr* 51:219–235.
16. Getsinger KD, Dillon CR. 1984. Quiescence, growth, and senescence of *Egeria densa* in lake Marion. *Aquat Bot* 20:329–338.
17. Holm-Hansen O, Lorenzen CJ, Holmes RW, Strickland JDH. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal du Conseil Permanent International Pour L'Exploration de la Mer* 30:3–15.
18. Biggs BJB. 1989. Biomonitoring of organic pollution using periphyton, South Branch, Canterbury, New Zealand. *N Z J Mar Freshw Res* 23:263–274.
19. Welch EB, Jacoby JM. 2004. *Pollutant Effects in Freshwater: Applied Limnology*, 3rd ed. Spon, New York, NY, USA.
20. Collins GB, Weber CI. 1978. Phycoperiphyton (algae) as indicators of water quality. *Trans Am Microsc Soc* 97:36–43.
21. Potvin C. 1993. ANOVA: Experiments in controlled environments. In Scheiner SM, Gurevitch J, eds, *Designs and Analysis of Ecological Experiments*. Chapman & Hall, New York, NY, USA, pp 46–68.
22. Zar JH. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
23. von Ende CN. 1993. Repeated-measures analysis: Growth and other time-dependent measure. In Scheiner SM, Gurevitch J, eds, *Designs and Analysis of Ecological Experiments*. Chapman & Hall, New York, NY, USA, pp 113–137.
24. Tana J, Lehtinen K-J, Mattsson K, Engstro¨m C. 2003. Effects in mesocosms exposed to bleach plant effluents from elemental chlorine-free and totally chlorine-free kraft pulp production. In Stuthridge TR, van den Huevel MR, Marvin NA, Slade AH, Gifford J, eds, *Environmental Impacts of Pulp and Paper Waste Streams*. SETAC, Pensacola, FL, USA, pp 423–431.
25. Culp JM, Cash KJ, Glozier NE, Brua RB. 2003. Effects of pulp mill effluent on benthic assemblages in mesocosms along the Saint John River, Canada. *Environ Toxicol Chem* 22:2916–2925.
26. Cash KJ, Culp JM, Glozier NE, Brua B, Firth BK, Wilson GM. 2004. Using mesocosms to explore the relationship between algal accrual responses and nutrient exposure (nitrogen and phosphorus) on the Wapiti River, AB, Canada. In Borton DL, Hall TJ, Fisher RP, Thomas JF, eds, *Pulp and Paper Mill Effluent Environmental Fate and Effects*. DesTech, Lancaster, PA, USA, pp 473–480.
27. Baird DJ, Brock TCM, de Ruitter PC, Boxall ABA, Culp JM, Eldridge P, Hommen U, Jak RG, Kidd KA, Dewitt T. 2001. The food-web approach in the environmental management of toxic substances. In Baird DJ, Burton GA, eds, *Ecological Variability: Separating Anthropogenic from Natural Causes of Ecosystem Impairment*. SETAC, Pensacola, FL, USA, pp 83–122.
28. Biggs BJB. 1989. Biomonitoring of organic pollution using periphyton, South Branch, Canterbury, New Zealand. *N Z J Mar Freshw Res* 23:263–274.
29. Gobierno de Chile. 2000. Norma de emisi3n para la regulaci3n de contaminantes asociados a las descargas de residuos lıquidos a aguas marinas y continentales superficiales. Decreto 90/2000. Ministerio Secretarıa General de la Presidencia, Chile. 30. Comisi3n Nacional del Medio Ambiente de Chile (CONAMA). 2004. Guıa para el

establecimiento de las normas secundarias de calidad ambiente para aguas continentales superficiales y marinas
Santiago, Chile.

31. Instituto Nacional de Normalización Chile. 2005. Agua potable. Parte 1. Requisitos. NCH 409/1. Santiago, Chile.