



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

**IMPACTO POR HIDROCARBUROS EN EL SEDIMENTO, EL
SUELO Y EL AGUA DE UN EMBALSE PATAGÓNICO: EMPLEO
DE MICROALGAS COMO BIOINDICADORAS DE
CONTAMINACIÓN Y REMEDIACIÓN**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

Bioq. Leandro Nahuel Rotondo
Director: Dr. Pedro Felix Temporetti
Codirectora: Dra. Verónica Cecilia Mora

2020

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos hidrófobos que forman parte de la compleja mezcla del petróleo. Poseen un alto factor de bioconcentración, y propiedades tóxicas, cancerígenas y mutagénicas en organismos acuáticos. El estudio de los sedimentos de los cuerpos de agua, así como de los suelos circundantes, puede aportar información relevante referida a la identificación de áreas afectadas por estos compuestos. Por otro lado, el fitoplancton es utilizado como bioindicador de contaminación, siendo una de las técnicas utilizadas, en este sentido, los bioensayos en microcosmos con sedimentos. Asimismo, el manejo de sitios contaminados con HAPs, requiere del uso de estrategias de remediación siendo la oxidación química *in situ* (ISCO) una de las técnicas más estudiadas. Entre los oxidantes más utilizados se pueden mencionar el reactivo de Fenton (FN), el ión persulfato (PS) y el ión permanganato (PM). Luego de la aplicación estos procesos de remediación, el fitoplancton puede resultar útil también como indicador biológico de la eficiencia del tratamiento de degradación de un contaminante.

La presente tesis se desarrolló en el embalse Los Barreales, situado en el área de Vaca Muerta, Provincia del Neuquén, una de las principales cuencas hidrocarburíferas del país. El desarrollo de esta industria incrementa, considerablemente, los riesgos ambientales de la región. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto que los HAPs sobre sedimentos y suelos del embalse, así como sobre las poblaciones de microalgas autóctonas. Además, analizar el potencial uso de las microalgas tanto como indicadores biológicos de contaminación como de eficiencia de remediación con ISCO.

Se realizó una **caracterización** fisicoquímica del ambiente, así como el análisis de la composición del fitoplancton y su variación estacional (**Capítulo I**). El embalse se clasificó como monomítico templado, mesotrófico, de pH alcalino, y conductividad elevada en comparación a la mayoría de los ambientes acuáticos de Patagonia Norte. La influencia de la sedimentación de los sólidos aportados por el río Neuquén se reflejó en la baja transparencia de la columna de agua y en las elevadas concentraciones de fósforo. La composición estacional de grupos algales mostró una predominancia de diatomeas en verano, y de criptofitas y clorofitas el resto del año. Los sedimentos y suelos del ambiente, presentaron una textura arenosa, con fracciones de fósforo asociadas principalmente al calcio.

Se realizaron, en primer término, ensayos de **contaminación** (**Capítulo II**) utilizando agua del embalse, sedimentos/suelos con agregado de diferentes HAPs: antraceno (Ant), pireno (Pir), fenantreno (Fen) ó benzo(a)antraceno (BaA); ó con petróleo crudo, y algas autóctonas aisladas del ambiente. Los resultados indicaron que: 1) La contaminación con HAPs condujo a una menor concentración de nutrientes en solución; 2) La abundancia algal y la clorofila “a” disminuyeron en los tratamientos con Fen. La especie *Scenedesmus quadricauda* resultó sensible a la contaminación con Fen, por lo que se seleccionó y aisló para los bioensayos posteriores; 3) El crecimiento de *S. quadricauda* se vió afectado para aquellos tratamientos con sedimentos contaminados con Pir, Fen ó BaA, y suelos con Fen; 4) En el bioensayo sin sedimentos/suelos, se observó una disminución en la abundancia de *S.*

quadricauda para todos los HAPs; y 5) La abundancia de *S. quadricauda* luego de las incubaciones con sedimentos con agregado de petróleo crudo mostró efectos negativos para todas las concentraciones ensayadas. Dentro de las especies que componen la comunidad fitoplanctónica del embalse, la clorofita *S. quadricauda* fue sensible, en ensayos de laboratorio, a la contaminación por HAPs y petróleo crudo en sedimentos y suelos del ambiente.

En segundo término se llevaron a cabo ensayos de **remediación** de los sedimentos y suelos previamente contaminados (**Capítulo III**), utilizando tres tratamientos oxidantes (reactivo de fenton, ión persulfato, ión permanganato), y realizando incubaciones con agua del embalse y *S. quadricauda*. La aplicación de técnicas de oxidación química *in situ* sobre los sedimentos y suelos del embalse resultó en diferente efectividad de degradación de los HAPs contaminantes de acuerdo con el oxidante aplicado: para FN, sólo fue > 50% cuando se realizó sobre sedimentos; en el caso de PS la eficiencia fue intermedia; y el PM resultó el oxidante más eficaz. Asimismo, este último oxidante permitió mantener las condiciones de pH alcalinas propias del cuerpo de agua en estudio. La aplicación de PS produjo los menores crecimientos de *S. quadricauda*, FN tuvo variaciones dependientes del HAP contaminante, y la oxidación con PM resultó en el mejor desarrollo del indicador. En este sentido, este último oxidante representó la mejor opción para la remediación de sedimentos y suelos del embalse Los Barreales contaminados con Fen y BaA, permitiendo la utilización de *S. quadricauda* como bioindicador de efectividad de remediación.

La caracterización del embalse Los Barreales descrita en el **Capítulo I** permitió establecer una línea base de calidad, su estado trófico y el aporte de nutrientes de la cuenca y la composición de la comunidad fitoplanctónica a lo largo de las estaciones del año. Los resultados obtenidos en el **Capítulo II** indicaron que los bioensayos con especies de algas autóctonas son útiles para detectar el efecto de la contaminación por HAPs en los sedimentos/suelos del embalse, y constituyeron el primer enfoque para crear una herramienta de monitoreo rápido para evaluar el efecto de los derrames de petróleo en la cuenca de Vaca Muerta. En el **Capítulo III**, *S. quadricauda* demostró también ser útil como indicadora de efectividad de remediación química de sedimentos/suelos del embalse, obteniéndose los resultados más promisorios para el caso de la aplicación de PM como oxidante, tanto para el desarrollo del indicador algal como para la degradación del contaminante.

Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are hydrophobic compounds that are part of the complex mixture of petroleum. They have a high bioconcentration factor and toxic, carcinogenic and mutagenic properties on aquatic organisms. The study of water bodies' sediments, as well as of the surrounding soils, can provide relevant information regarding the identification of areas affected by these compounds. On the other hand, phytoplankton is used as a bioindicator of contamination, being one of the techniques used, in this sense, bioassays in microcosms with sediments. Likewise, the management of PAH contaminated sites requires the use of remediation strategies, being *in situ* chemical oxidation (ISCO) one of the most studied techniques. Among commonly used oxidants, the Fenton reagent (FN), the persulfate ion (PS) and the permanganate ion (PM) can be mentioned. After applying these remediation processes, phytoplankton can also be useful as a biological indicator of the efficiency of the pollutant degradation treatment.

This thesis was developed in Los Barreales reservoir, located in Vaca Muerta area, Neuquén Province, one of the main hydrocarbon basins of the country. The development of this industry considerably increases the environmental risks in the region. The objective of this work was to study the effect of PAHs on reservoir sediments and soils, as well as on the populations of native microalgae, in addition to their potential use as biological indicators of contamination and of the remediation efficiency with ISCO.

A physicochemical characterization of the environment was carried out, as well as the analysis of the phytoplankton composition and its seasonal variation (**Chapter I**). The reservoir was classified as temperate monomictic, mesotrophic, with alkaline pH, and a high conductivity in comparison to most of Northern Patagonia aquatic environments. The influence of the sedimentation of the solids contributed by the river Neuquén was reflected in the low transparency of the water column and in the high phosphorus concentrations. The seasonal composition of algal groups showed a predominance of diatoms in summer, and cryptophytes and chlorophytes the rest of the year. The sediments and soils of the environment presented a sandy texture, with phosphorus fractions mainly associated with calcium.

At first place, contamination assays were carried out (**Chapter II**) using reservoir water, sediments/soils with the addition of different PAHs: anthracene (An), pyrene (Py), phenanthrene (Ph) or benz(a)anthracene (Ba); or with crude oil, and native algae isolated from the environment. The results indicated that: 1) Contamination with PAHs led to a lower concentration of nutrients in solution; 2) The algal abundance and chlorophyll "a" concentrations decreased in the treatments with Ph. The species *Scenedesmus quadricauda* was sensitive to contamination with Ph, therefore it was selected and isolated for the subsequent bioassays; 3) The growth of *S. quadricauda* was affected for sediments contaminated with Py, Ph or Ba, and soils with Ph; 4) In a bioassay without sediments/soils, a decrease in the abundance of *S. quadricauda* was observed for all PAHs; and 5) The abundance of *S. quadricauda* after incubations with sediments with added crude oil showed negative effects for all concentrations

tested. Among the species that are part of the reservoir phytoplankton community, the chlorophyte *S. quadricauda* was sensitive, in laboratory tests, to contamination by PAHs and petroleum in sediments and soils of the environment.

Second, remediation tests on previously contaminated sediments and soils were carried out (**Chapter III**), by using three different oxidant treatments (fenton reagent, persulfate ion or permanganate ion), and incubating with reservoir water and *S. quadricauda*. The application of ISCO techniques on reservoir sediments and soils resulted in different PAH degradation effectiveness according to the oxidant applied: For FN, it was only > 50 % when it was carried out on sediments; in the case of PS, the efficiency was intermediate; and PM was the most effective oxidant. Likewise, this last oxidant allowed maintaining the alkaline pH conditions typical of the water body under study. The application of PS produced the lowest growth of *S. quadricauda*, FN had variations dependent on the contaminating PAH, and oxidation with PM resulted in the best development of the indicator. In this sense, this last oxidant represented the best option for the remediation of sediments and soils of Los Barreales reservoir contaminated with Ph and Ba, allowing the use of *S. quadricauda* as a bioindicator of remediation effectiveness.

The characterization of Los Barreales reservoir described in **Chapter I** made it possible to establish a quality baseline, its trophic status and the contribution of nutrients from the basin, the presence of PAHs in its different compartments, and the seasonal composition of the phytoplankton community. The results obtained in **Chapter II** indicated that bioassays with native algae species are useful to detect the effect of PAH contamination on reservoir sediments/soils, and thus to serve as a rapid monitoring tool to evaluate the effect of oil spills in Vaca Muerta basin. In **Chapter III**, *S. quadricauda* also proved to be useful as an indicator of chemical remediation effectiveness of reservoir sediments/soils, with promising results in the case of the application of PM as an oxidant, both for the development of the algal indicator as for pollutants degradation.

El presente trabajo, para optar al grado de Doctor en Biología de la Universidad Nacional del Comahue, fue realizado en el Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), Universidad Nacional del Comahue-CONICET, y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Universidad Nacional de La Plata-CONICET, bajo la dirección del Dr. Pedro F. Temporetti y la codirección de la Dra. Verónica C. Mora.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Pedro Temporetti, y a mi codirectora, la Dra. Verónica Mora, quienes con sus conocimientos y apoyo me guiaron a través de cada una de las etapas de este proyecto.

Al Dr. Pedrozo, consejero y compañero de planta alta, y a todo el Grupo de Estudios en Calidad de Agua y Recursos Acuáticos (GECARA), Guadalupe Beamud, Gustavo Baffico, Daniela Nichela, Monica Diaz, Susana Moyano, por sus aportes a este trabajo, y sobre todo por la buena onda de cada día laboral. También a los compañeros y compañeras de laboratorio, Rubén, Romi, Eli, Juan...y especialmente a May, que me ha acompañado tanto dentro como fuera de la oficina.

A todos aquellos que hicieron posible las campañas de muestreo, Pablo Alvear, Pepe Di Giusto, Ariel Mayoral, Robert Sauval, Miguel Nichela y F. Berna.

A todas las personas que me recibieron en el CINVESTAV de Mérida, México: Al Dr. Pech por darme la oportunidad, al Dr. Sébastien Putzeys, por haberme recibido y por su predisposición y acompañamiento durante mi estadía; a Isis y Karen, por abrirme las puertas de su hogar; y a todos aquellos con los que compartimos esos meses de laboratorio. A la contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM), y a PEMEX, que a través del aporte del Fondo Sectorial CONACYT- SENER-Hidrocarburos, proyecto 201441, hicieron posible la realización de los ensayos.

También quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca para poder realizar esta tesis, y por el financiamiento de este trabajo a través del PICT 2018 4387 ANPCYT.

A la Universidad Nacional del Comahue, y al Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación, así como también al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) por permitirme realizar una estadía para llevar a cabo análisis en sus laboratorios.

A la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Provincia del Neuquén, por permitarnos realizar las campañas de muestreo.

A Prefectura Naval Argentina de Mari Menuco, por su acompañamiento logístico en el reconocimiento de los sitios de muestreo.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis amigos, de acá y de allá, y principalmente a mi familia, que estuvo presente a pesar de la distancia, y sin el apoyo de la cual no hubiera podido llevar adelante este proyecto.

Índice

	<i>Pág.</i>
1. Introducción general	15
1.1. <i>Contaminación de ambientes acuáticos</i>	15
1.1.2. <i>Rol de los sedimentos y suelos</i>	16
1.1.3. <i>Bioindicadores</i>	17
1.1.4. <i>Fitoplancton como bioindicador</i>	17
1.2. <i>Explotación petrolera y contaminación</i>	18
1.2.1. <i>Petróleo</i>	18
1.2.2. <i>Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)</i>	19
1.2.3. <i>Legislación</i>	21
1.2.4. <i>Antecedentes</i>	22
1.2.4.1. <i>Contaminación</i>	22
1.2.4.2. <i>Fitoplancton como bioindicador</i>	24
1.3. <i>Remediación de sitios contaminados por petróleo</i>	24
1.3.1. <i>Remediación química in situ (ISCO)</i>	25
1.3.2. <i>Antecedentes</i>	25
2. Objetivos	27
2.1. <i>Marco de estudio</i>	27
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	27
3. Hipótesis	28
4. Área de estudio y colección de las muestras	29
4.1. <i>Área de estudio</i>	29
4.2. <i>Sitios y fechas de muestreo</i>	32
5. Capítulo I: Caracterización del agua, sedimentos y suelos del embalse Los Barreales	
5.1. <i>Introducción</i>	35
5.2. <i>Materiales y Métodos</i>	44
5.2.1. <i>Columna de agua</i>	44
5.2.2. <i>Agua intersticial</i>	51
5.2.3. <i>Sedimentos y suelos</i>	52
5.2.4. <i>Análisis estadísticos</i>	56
5.3. <i>Resultados</i>	57
5.3.1. <i>Columna de agua</i>	57
5.3.2. <i>Agua intersticial</i>	69
5.3.3. <i>Sedimentos</i>	72
5.3.4. <i>Suelos</i>	79
5.4. <i>Discusión</i>	85

6. Capítulo II: Evaluación de los efectos sobre los nutrientes y el fitoplancton producidos por la contaminación artificial con hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos y sedimentos del embalse Los Barreales.

6.1 Introducción	97
6.1.1. Contaminación con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	97
6.1.2. Fitoplancton como bioindicador de contaminación	98
6.2. Materiales y Métodos	100
6.2.1. Colección y procesamiento de muestras	101
6.2.2. Ensayo 1: Incubaciones de sedimentos y suelos contaminados con diferentes HAPs	101
6.2.2.1. Realización del ensayo	101
6.2.2.2. Isotermas de fijación de fósforo en los sedimentos	102
6.2.2.3. Determinación de capacidad de intercambio catiónico (CIC) de los sedimentos contaminados	103
6.2.3. Ensayo 2: Bioensayo con ensamble algal natural y fenantreno	104
6.2.3.1. Obtención del ensamble de algas nativas	104
6.2.3.2. Realización del bioensayo	105
6.2.4. Aislamiento de <i>Scenedesmus quadricauda</i>	106
6.2.5. Ensayo 3: Bioensayo con <i>S. quadricauda</i> y diferentes HAPs en sedimentos/suelos	107
6.2.5.1 Realización del bioensayo	107
6.2.5.2. Estimación del coeficiente de partición de los HAPs	108
6.2.6 Ensayo 4: Bioensayo con <i>S. quadricauda</i> y agua contaminada con diferentes HAPs	110
6.2.7 Ensayo 5: Bioensayo con <i>S. quadricauda</i> y petróleo crudo en sedimentos	111
6.2.8. Análisis estadísticos	114
6.3. Resultados	114
6.3.1. Ensayo 1: Incubaciones de sedimentos y suelos contaminados con diferentes HAPs	114
6.3.1.1. Isotermas de fijación de fósforo en los sedimentos	116
6.3.1.2. Determinación de capacidad de intercambio catiónico (CIC) de los sedimentos contaminados	117
6.3.2. Ensayo 2: Bioensayo con ensamble algal natural y fenantreno	117

6.3.3. Ensayo 3: Bioensayo con <i>S. quadricauda</i> y diferentes HAPs en sedimentos/suelos	120
6.3.3.1. Estimación del coeficiente de partición de los HAPs	122
6.3.4. Ensayo 4: Bioensayo con <i>S. quadricauda</i> y agua contaminada con diferentes HAPs	123
6.3.5. Ensayo 5: Bioensayo con <i>S. quadricauda</i> y petróleo crudo en sedimentos	124
6.4. Discusión	125
6.5. Conclusiones	130

7. Capítulo III: Evaluación de los efectos de diferentes estrategias de remediación química *in situ*, utilización de algas nativas del Embalse los Barreales como indicadores de efectividad de remediación.

7.1. Introducción	133
7.1.1. Remediación química <i>in situ</i> (ISCO)	133
7.1.1.1. Fenton (FN)	134
7.1.1.2. Persulfato (PS)	135
7.1.1.3. Permanganato (PM)	136
7.1.1.4. Efectos sobre la comunidad bacteriana	137
7.1.2. Fitoplancton como bioindicador de efectividad de remediación	138
7.2. Materiales y Métodos	138
7.2.1. Remediación de sedimentos y suelos	138
7.2.2. Bioensayos con sedimentos/suelos remediados y <i>Scenedesmus quadricauda</i>	144
7.2.3. Análisis estadísticos	144
7.3. Resultados	145
7.3.1. Remediación de sedimentos y suelos	145
7.3.2. Bioensayos con sedimentos/suelos remediados y <i>Scenedesmus quadricauda</i>	154
7.4. Discusión	162
7.5. Conclusiones	168

8. Conclusiones generales

169

9. Bibliografía

172

10. Trabajo de respaldo

207

11. Anexos

246

I: Reactivos utilizados 246

II: Medios de cultivo utilizados 248

<i>III: Gráficos LC50</i>	250
<i>IV: Composición del petróleo crudo:</i>	251
<i>V: Cromatogramas</i>	254

1. Introducción general

1.1. Contaminación de ambientes acuáticos

La contaminación de un ambiente acuático se define como la alteración de las condiciones ecológicas del mismo debido al aporte masivo de sustancias orgánicas o inorgánicas, tanto de origen autóctono como alóctono, lo cual puede derivar en la afectación de cualquiera de sus usos (consumo humano, industria, agricultura, pesca y actividades recreativas) así como de la biota autóctona del propio ambiente (Ringuelet, 1967). El aporte de sustancias alóctonas ocurre cuando éstas son vertidas directamente al cuerpo de agua, o indirectamente en el suelo o la atmósfera, llegando finalmente al ambiente acuático a través de escorrentías o precipitaciones. Está relacionada fuertemente con la actividad antrópica, siendo las fuentes principales las industrias, la agricultura y ganadería, y los desechos domésticos y urbanos (Wetzel, 2001).

Un adecuado sistema o modelo de seguimiento de los parámetros ambientales adquiere relevancia al momento de evaluar la contaminación de los cuerpos de agua (Håkanson y Jansson, 1983). Varios parámetros físicos y químicos (tales como turbidez, pH, oxígeno disuelto, nitrógeno, fósforo y sólidos suspendidos) y biológicos (por ejemplo niveles de clorofila, algas, producción primaria, zoobentos y zooplancton), pueden ser utilizados para determinar el estado trófico de los cuerpos de agua (OECD, 1982; Horne y Goldman, 1994; Wetzel, 2001; Schindler *et al.*, 2008). Sin embargo, estos parámetros suelen presentar fuertes fluctuaciones estacionales que dificultan la categorización de un cuerpo de agua. Por ejemplo, una variación en la concentración de nutrientes esenciales tales como fósforo (P) y nitrógeno (N) en la columna de agua y en el agua intersticial de los sedimentos de los ambientes acuáticos, debido al aumento de la biomasa fitoplanctónica y la temperatura, que a su vez acrecienta la descomposición microbiana y la intensidad de los procesos de difusión en los sedimentos (Maassen *et al.*, 2005; Wetzel, 2001).

1.1.2. Rol de los sedimentos y suelos

Aunque la importancia de los sedimentos en los ambientes acuáticos se conoce desde hace bastante tiempo (Böstrom *et al.*, 1982; Søndergaard *et al.*, 2003; Jeppesen *et al.*, 2005), ha adquirido mayor relevancia en las últimas décadas (Lee-Hyung *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2009;; Temporetti *et al.*, 2013; Temporetti *et al.*, 2014), debido a su demostrada capacidad de retener o liberar los contaminantes, actuando como nuevas fuentes de contaminantes, muchos años después de que el proceso de contaminación ha sido detenido (Golterman, 2004). En este sentido, el estudio de los sedimentos puede aportar información relevante referida, entre otros aspectos, a la diferenciación de áreas contaminadas y sin contaminar, tipo de sustancias contaminantes, concentraciones, patrones de dispersión de los mismos (Håkanson y Jansson, 1983) y determinación del estado trófico del ambiente (Bai *et al.*, 2009; Temporetti *et al.*, 2014). Uno de los aspectos más destacados de los sedimentos es que constituyen un eslabón significativo en el ciclo de los nutrientes en los lagos. Los nutrientes son transportados al fondo por sedimentación, y a partir de diversos y complejos procesos mecánicos, físicos, químicos y biológicos, una fracción puede hacerse disponible y retornar a la columna de agua (Forsberg, 1989). Håkanson y Jansson (1983) proponen que esta recirculación puede ser muy importante cuando los elementos involucrados son nutrientes esenciales tales como el P y N, proceso que en la bibliografía se menciona como “**carga interna**” (Böstrom *et al.*, 1982; Golterman *et al.*, 1983; Håkanson y Jansson, 1983; Istvánovics *et al.*, 2004; Nürnberg, 2009; Chorus *et al.*, 2020).

El P es el nutriente que tiene mayor importancia respecto al N para este proceso, dado que el estado trófico del cuerpo de agua puede ser sustancialmente influenciado por la liberación de P desde los sedimentos (Carey y Rydin, 2011). Debido a que el P constituye un serio problema en muchos ambientes acuáticos, enriquecidos en nutrientes, ya que las medidas de restauración generalmente son bastante costosas, la necesidad de comprender los procesos del ciclo de nutrientes en estos ambientes es crítica, particularmente cuando son elegidas medidas de restauración específicas, por ejemplo, la oxidación química de los sedimentos (Håkanson y Jansson, 1983).

Por otro lado, los suelos son también depósitos de un amplio rango de contaminantes generados por la actividad humana. Los contaminantes presentes en suelos pueden ingresar a los ambientes acuáticos cercanos a través de escorrentía, superficial y/o subterránea, afectando de esta forma a los organismos acuáticos y su hábitat (Wang *et al.*, 2009). La evaluación del riesgo ambiental de suelos contaminados es llevada a cabo frecuentemente mediante análisis fisicoquímicos. Estos análisis resultarían insuficientes para inferir su influencia biológica, debido a que no permiten considerar efectos sinérgicos o antagonistas entre diferentes compuestos para establecer la toxicidad general sobre los organismos del ambiente. Por lo tanto, es de gran utilidad una aproximación biológica que permita complementar las determinaciones fisicoquímicas e integrar los efectos de todos los contaminantes biodisponibles y sus interacciones (Eom *et al.*, 2007).

1.1.3. Bioindicadores

La caracterización química de los sedimentos y la composición química de los lixiviados de los mismos permiten, a través de técnicas analíticas estándares, obtener datos químicos útiles. Sin embargo, no suministran información relativa a la toxicidad y la biodisponibilidad de los contaminantes para los organismos que habitan en la columna de agua y los sedimentos. Alvarez y Pena (2004), definen a los bioindicadores como especies o comunidades cuya presencia indica una condición medioambiental definida, y responden fisiológica o conductualmente a un amplio espectro de sustancias y concentraciones tóxicas de las mismas, sean éstas de origen orgánico o inorgánico, natural o antrópico. Por lo tanto, una vez conocido y caracterizado un ecosistema acuático, la presencia y proporción de ciertas especies constituye una unidad de referencia acerca de las condiciones cualitativas de un cuerpo acuático (Ptacnik *et al.*, 2008).

1.1.4. Fitoplancton como bioindicador

Los organismos autótrofos que forman parte del plancton han demostrado ser indicadores sensibles del estrés contaminante de sistemas acuáticos. Estos indicadores resultan útiles debido a que sus tiempos de reproducción son cortos, y por lo tanto la respuesta de la comunidad es relativamente más rápida que la de otras comunidades acuáticas (Bellinger y

Sigee, 2015). Las técnicas más usadas para evaluar la toxicidad de sedimentos ó suelos contaminados son los bioensayos con especies del fitoplancton (Munawar y Munawar, 1987; Eichel *et al.*, 2014; Diaz *et al.*, 2015).

1.2 Explotación petrolera y contaminación

1.2.1. Petróleo

El petróleo es una mezcla muy compleja de composición variable de hidrocarburos de diversos puntos de ebullición y estados sólido, líquido y gaseoso, que se disuelven unos en otros para formar una solución de viscosidad variable. Contiene principalmente hidrocarburos saturados, etilénicos, acetilénicos, cíclicos y bencénicos o aromáticos, dentro de los cuales encontramos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), junto con algunos compuestos oxigenados, sulfurados y nitrogenados. Dependiendo del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran el petróleo, las propiedades que los caracterizan y determinan definen su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o solventes (IAPG, 2001).

Entre otras propiedades que diferencian a los distintos compuestos que constituyen el petróleo, es de especial importancia su volatilidad. Al calentarse el petróleo, se evaporan preferentemente los compuestos ligeros (de estructura química sencilla y bajo peso molecular), de tal manera que conforme aumenta la temperatura, los componentes más pesados van incorporándose al vapor. De esta forma, se generan curvas de destilación que permiten diferenciar el tipo de petróleo y los rendimientos que se pueden obtener de los productos por separación directa, de acuerdo con su densidad API (parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo) (IAPG, 2001).

En la Argentina predominan las siguientes clases de petróleo conforme al tipo de hidrocarburos que predominan: Petróleo de base asfáltica, son negros, viscosos y de elevada densidad ($0,95 \text{ g mL}^{-1}$), ricos en compuestos cíclicos y en hidrocarburos aromáticos; petróleo de base parafínica: de color claro, fluidos y de baja densidad ($0,75 - 0,85 \text{ g mL}^{-1}$), con mayor proporción de hidrocarburos lineales; y petróleo de base mixta, con características y rendimientos comprendidos entre las otras dos variedades principales (IAPG,

2001). Alvaro et al. (2017) analizaron una muestra de petróleo de la cuenca Neuquina mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, por el método ASTM D-5739/00. La gravedad específica del petróleo fue de 38 grados API, densidad $0,84 \text{ g mL}^{-1}$ y se clasificó como ligero. De acuerdo con el peso molecular de los hidrocarburos, aquellos de hasta 14 átomos de carbono correspondieron al 94,1 % y los de quince o más átomos de carbono 5,9 %. Los hidrocarburos parafínicos representaron un 32,0 ($\pm 0,2$) %, los nafténicos y de mayor PM un 28,2 ($\pm 0,2$) %, los monoaromáticos 5,40 ($\pm 0,2$) % y los isoparafínicos 34,4 ($\pm 0,2$) %.

1.2.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los HAPs son compuestos orgánicos formados por anillos aromáticos simples fusionados, lo que los convierte en compuestos hidrofóbicos, poco solubles en agua y con un alto factor de bioconcentración (Fetzer, 2000), y poseen propiedades tóxicas, mutagénicas y cancerígenas (IARC, 1983; Upham *et al.*, 1998). Se han identificado aproximadamente 130 HAPs en la naturaleza, de los cuales, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) identifica a 16 (Figura 1) como contaminantes prioritarios (Peluffo, 2016).

Los HAPs son contaminantes que pueden entrar en el medio ambiente a través de la combustión incompleta de la materia orgánica (como la madera) y de los combustibles fósiles (como el petróleo y el carbón). Se ha estimado que más del 90 % de HAPs totales liberados al medio ambiente se acumulan en el suelo (Wild y Jones, 1995). La vida media calculada de los HAPs en suelos y sedimentos es variable y responde a diferencias en los parámetros ambientales del sitio (temperatura, pH, nutrientes, disponibilidad de oxígeno y agua, salinidad y tipo de suelo o sedimento), y a componentes biológicos (Cerniglia, 1993). Los HAPs se clasifican como de bajo peso molecular (HAPs-BPM), si están formados por dos o tres anillos aromáticos, y como de alto peso molecular (HAPs-APM) si poseen cuatro o más anillos (Wick *et al.*, 2011). Los HAPs-BPM son más susceptibles a la degradación y volatilización en comparación con los HAPs-APM, ya que con el aumento del peso molecular aumenta la hidrofobicidad, disminuye la solubilidad en agua y la presión de vapor disminuye, lo que hace que la estructura sea más recalcitrante. Por

ejemplo, Alegbeleye *et al.* (2017) han demostrado que la vida media promedio del fenantreno (HAP-BPM de tres anillos) varía de 16 a 126 días en el suelo, mientras que para el benzo(a)pireno (HAP-APM de cinco anillos) la vida media puede variar de 229 a 1500 días. A su vez, las moléculas con una disposición lineal tienden a ser menos solubles que las moléculas angulares. Por ejemplo, el antraceno es menos soluble que el fenantreno y el naftaleno es menos soluble que el criseno o el benzo(a)antraceno (Okere y Semple, 2012). Debido a la alta complejidad de la mezcla de HAPs en el petróleo, y a las diferencias en la biodegradación entre HAPs de distinto peso molecular, es necesario en estudios de degradación el empleo tanto de HAPs-BPM como de HAPs-APM.

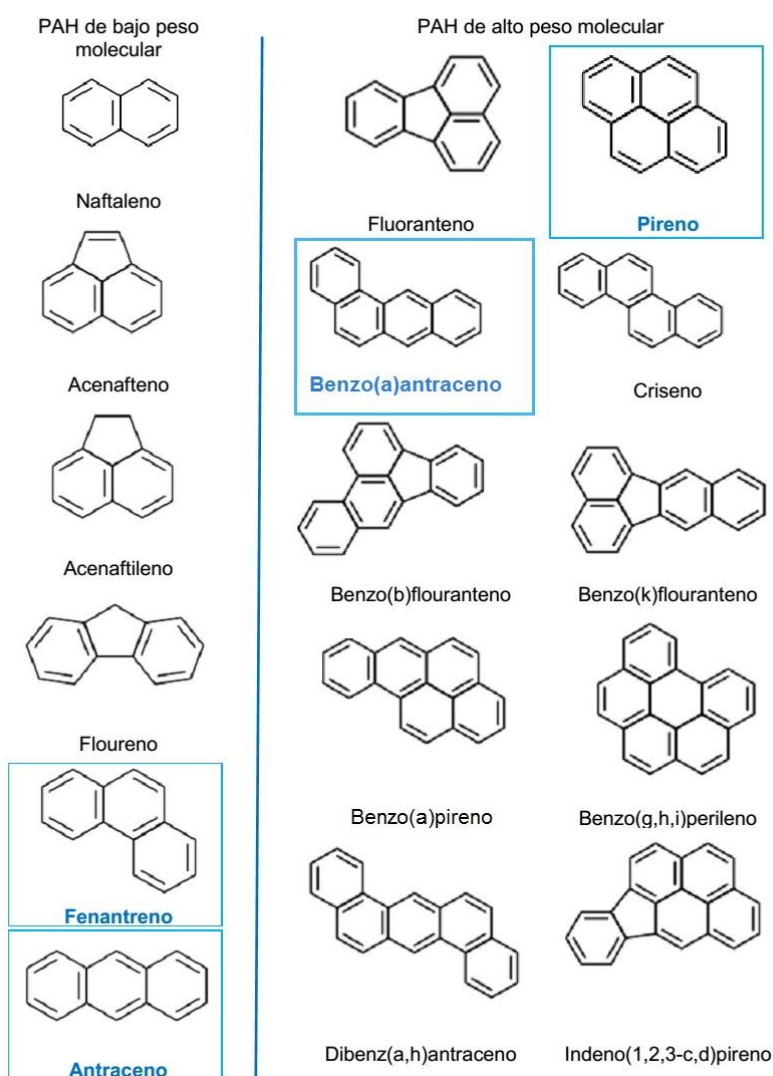


Figura 1: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) de bajo y alto peso molecular listados como los 16 HAPs de estudio prioritario según la EPA. Los HAPs encuadrados en azul representan los utilizados en el presente trabajo.

1.2.3. Legislación

En el año 1993 se promulgó la Ley Nacional 24051 de Residuos Peligrosos, cuyo Decreto reglamentario (número 831/93) cita las concentraciones de distintos contaminantes permitidas en suelos con distintos usos: agrícola, residencial e industrial. Aunque esta ley fue derogada en 2002 por la Ley 25612, que establece un nuevo régimen penal por el uso de Residuos Industriales, ésta última tuvo un veto parcial pero no fue reglamentada, por lo que no se cuenta con nuevos valores de concentraciones permitidas. Por lo tanto, al no contar con una ley reglamentada, se sigue aplicando la ley 24051. En la Tabla 1 se pueden observar los niveles guías de calidad de suelo para los HAPs que se propone estudiar en este proyecto. La provincia del Neuquén, mediante el decreto 2263, establece que son de aplicación subsidiaria en el territorio provincial los niveles guía mencionados para la Ley Nacional 24051.

Tabla 1: Niveles guías en suelos para los HAPs utilizados en este trabajo, valores (en ppm de suelo seco: ppm_{ss}) permitidos para sus distintos usos (Ley 24051 de residuos peligrosos, Decreto 831/93).

Contaminante	Uso Agrícola (ppm _{ss})	Uso Residencial (ppm _{ss})	Uso Industrial (ppm _{ss})
Antraceno	*	*	*
Pireno	0,1	10	100
Fenantreno	0,1	5	50
Benzo(a)antraceno	0,1	1	10

(*) No figura en la lista de Residuos peligrosos de dicha Ley.

En el caso de los sedimentos, no existe en Argentina una ley que establezca valores guía. Sin embargo, es posible considerar los criterios propuestos por la Guía de Calidad de Sedimentos propuesta por la USEPA (Swartz, 1999), cuyos valores de Límite de Efecto observable (TEC, del inglés: Threshold effect concentration) y Máximo Efecto Observable (HAET, del inglés: Highest apparent effect threshold) sobre organismos acuáticos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Valores de concentraciones en sedimentos (en ppm de sedimento seco: ppm_{ss}) para el Límite de Efecto observable (TEC) y el límite superior de efecto aparente (HAET) sobre organismos acuáticos propuestos por la USEPA, para cada uno de los HAPs utilizados en el presente trabajo. Datos obtenidos de Swartz (1999).

Contaminante	TEC (ppm _{ss})	HAET (ppm _{ss})
Antraceno	0,025	6,50
Pireno	0,075	8,00
Fenantreno	0,045	3,45
Benzo(a)antraceno	0,035	2,55

1.2.4. Antecedentes

1.2.4.1. Contaminación

El impacto de la explotación petrolera sobre el medio ambiente tiene una nutrida historia internacional, que ha ocupado las primeras planas en numerosas ocasiones, principalmente debido a grandes derrames en ambientes marinos que produjeron lo que se conoce como “mareas negras”. Entre los derrames de hidrocarburos más representativos encontramos el del buque “Torrey Canyon” en 1967, que contaminó las costas de Francia con miles de toneladas de petróleo; la pérdida del “Amoco Cadiz” en 1978 frente a Galicia, que liberó aproximadamente 230.000 toneladas de petróleo a lo largo de 100km de costa, el desastre del Ixtoc I en 1979 en el Golfo de México, el siniestro del “Exxon Valdez” en 1989 en Alaska, que derramó 37.000 toneladas de crudo, el derrame de la Guerra del Golfo en 1991, considerado el más grande de la historia, el del buque Prestige en 2002 en las costas de Galicia, y la explosión de la plataforma Deepwater Horizon en 2010, nuevamente en el Golfo de México (Libes, 2009).

En Argentina uno de los casos más importantes registrados fue el derrame de hidrocarburos en Caleta Córdova, a 20 km de Comodoro Rivadavia, en 2007, donde se derramaron 300 m³ de petróleo crudo en la costa marítima (<https://opsur.org.ar/2017/10/12/petroleo-y-medioambiente-el-caso-de-argentina/>). Por otro lado, para el caso de ambientes de agua dulce, en 1999 se produjo la colisión de dos buques en Magdalena, provincia de Buenos Aires, generando un derrame estimado en 5.000 m³ de crudo, lo que posteriormente

sería considerado el mayor derrame de petróleo en agua dulce de la historia mundial (Leturia y Nugoli, 2017).

De las cinco cuencas sedimentarias productivas con yacimientos en Argentina, el presente trabajo se realizó en la cuenca neuquina del yacimiento Vaca Muerta. Este yacimiento abarca las provincias de Mendoza, Neuquén, Río Negro y La Pampa, de origen marino y edad jurásico-cretácico, es el más importante del país por sus reservas y explotación (Cabanillas *et al.*, 2013). La región Andino Patagónica y la extraandina, en particular la de Patagonia Norte, tienen extensos y profundos cuerpos de agua naturales (principalmente de origen glaciario) y embalses que se ubican sobre las grandes cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Colorado. En la zona del Valle Inferior de los Ríos Limay y Neuquén se observan en modo creciente asentamientos de explotación petrolera, y en los últimos años ha habido casos de accidentes que han provocado derrames de hidrocarburos, con una afectación directa al ambiente circundante. El último de ellos, en octubre del 2018, se produjo por una falla en el pozo YPF.Nq.Lcav-26, ubicado en el yacimiento Bandurria Sur, el cual afectó 45 hectáreas con lodos e hidrocarburos, entre ellos gas y petróleo, que impactaron directamente en el suelo y la vegetación (<https://www.rionegro.com.ar/como-se-produjo-el-derrame-de-vaca-muerta-que-afecto-45-hectareas-DN5917775/>). En este marco, el desarrollo de la industria hidrocarburífera con la explotación del yacimiento de Vaca Muerta incrementa los riesgos ambientales, lo que representa un desafío muy importante en términos de protección del medio ambiente (FAO, 2017).

En el área del yacimiento de Vaca Muerta existen algunos estudios relacionados a la presencia de hidrocarburos en agua y sedimentos. En la cuenca del río Colorado, COIRCO (2018) analizó la presencia de los 16 HAPs prioritarios mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (EPA 3540 C/ 8270 D), obteniendo valores no detectables en todos los sitios analizados (límite de cuantificación: 0,006 ppm de sedimento seco: ppm_{ss}). En la cuenca del río Neuquén Monza *et al.* (2013) analizaron la presencia de hidrocarburos mediante cromatografía gaseosa acoplada a detector de ionización en llama (Método EPH-04, revision1.1), encontrando en el embalse Los Barreales concentraciones de 2.25 ppm_{ss} de hidrocarburos

alifáticos y no detectables para los 16 HAPs prioritarios (límite de detección: 0.023 ± 0.005 ppm_{ss}).

1.2.4.2. *Fitoplancton como bioindicador de contaminación*

La comunidad fitoplanctónica ha sido ampliamente utilizada como bioindicador a nivel mundial (Dokulil, 2003; Parmar *et al.*, 2016), principalmente como indicador del estado trófico de los ambientes acuáticos, tanto marinos (Dobal *et al.*, 2011; Hemraj *et al.*, 2017) como de agua dulce (Diaz-Pardo *et al.*, 1998; Amengual-Morro *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014), así como de la presencia de contaminantes como metales o hidrocarburos derivados del petróleo (Megharaj *et al.*, 2000; Verlecar *et al.*, 2006; Hjorth *et al.*, 2007; Thuy *et al.*, 2018; Margiotta *et al.*, 2020). En la región existen estudios sobre el impacto antrópico sobre cuerpos de agua que analizan su efecto sobre el fitoplancton, por ejemplo, los estudios de Rovedatti *et al.* (2000) y Nannavecchia (2016) sobre ríos de la provincia de Buenos Aires, aunque son escasos los trabajos que utilizan el fitoplancton como indicador de contaminación con HAPs. Peralta y Fuentes (2005) encontraron correlación entre la presencia de hidrocarburos y cambios en la composición de la comunidad fitoplanctónica del bañado de Carilauquen en la provincia de Mendoza, y Sargian *et al.* (2007) analizaron el efecto de los hidrocarburos sobre la comunidad fitoplanctónica de ambientes marinos antárticos. Sin embargo, el primer estudio en Patagonia que propone el uso del fitoplancton nativo como bioindicador ha sido realizado en el sistema Río Agrio-Caviahue por Diaz *et al.* (2015), donde se estudiaron tres especies algales autóctonas, identificando a dos de ellas como potenciales bioindicadores, *Cyanidium caldarium* y *Euglena mutabilis*, en ensayos realizados sobre suelos contaminados artificialmente con fenantreno. El embalse Los Barreales (38°33'03" S, 68°49'21" O), situado en la cuenca del Río Neuquén, en el monte austral de la provincia de Neuquén, es un sistema donde los estudios en relación al uso de algas como indicadoras de contaminación por HAPs son inexistentes.

1.3. *Remediación de sitios contaminados por petróleo*

Las estrategias de remediación de sitios contaminados se han convertido en un campo de investigación muy importante (Aprill y Sims, 1990; Baud-Grasset *et al.*, 1993; Bennett, 1995; Germida *et al.*, 2002; Gerhardt *et al.*,

2009). La remediación de sitios contaminados con HAPs mediante bioremediación es una de las tecnologías más aceptadas, pero tiene ciertas limitaciones en la degradación de compuestos aromáticos complejos. Las tecnologías de oxidación química se han convertido en una promisoriosa alternativa para el tratamiento de suelos contaminados con HAPs, debido a la alta eficiencia de eliminación del contaminante en un tiempo relativamente corto. Además, permiten su combinación con tratamientos de biorremediación para lograr una completa recuperación del suelo (de Souza e Silva *et al.*, 2009). En la actualidad son de interés el uso de tecnologías de remediación secuencial, donde una tecnología rápidamente agresiva como el tratamiento térmico o la oxidación química *in situ* es combinada con una etapa más lenta y de menor costo, como la bioremediación (Tsitonaki *et al.*, 2008).

1.3.1. Remediación química *in situ* (ISCO)

Una de las técnicas más estudiadas para remediación de sitios contaminados con hidrocarburos emplea los procesos de oxidación química *in situ* (ISCO, del inglés *In Situ Chemical Oxidation*), los cuales consisten en la inyección de oxidantes tanto en suelos como en el agua superficial de la zona contaminada. Las técnicas de ISCO han sido aplicadas tanto en suelos, mediante una suspensión de la fase sólida en el oxidante líquido ó “slurry” (Oprea *et al.*, 2009), así como también en aguas subterráneas mediante el bombeo y tratamiento (pump and treat) ó la inyección de oxidantes (Ordóñez Suarez, 2001; Baciocchi *et al.*, 2014). En el caso de sedimentos, la tecnología de remediación se ha aplicado en sedimentos de canales y ríos mediante previa extracción de los mismos (Bursztyn Fuentes *et al.*, 2018; Usman *et al.*, 2018), aunque su utilización en grandes cuerpos de agua no ha sido desarrollada hasta el momento. Se han utilizado diferentes formas de oxidantes para ISCO, siendo los más comunes el ión permanganato (MnO_4^-), el reactivo de Fenton: peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e ión ferroso (Fe^{+2}); ozono (O_3) y persulfato ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) (Huling y Pivetz, 2006).

1.3.2. Antecedentes

En las últimas décadas se ha registrado, en la región Andino Patagónica, un rápido incremento de la superficie de suelos contaminados con hidrocarburos y sus derivados, debido a la expansión del área de explotación

petrolera. La disposición final de los residuos generados en refinerías, así como los derrames accidentales, proponen grandes desafíos para la remediación de esas superficies (Brutti et al., 2018). Además de la utilización de diferentes técnicas de biorremediación con microorganismos autóctonos, fitorremediación y rizorremediación (Ciano, 2000; Luque, 2000), se han realizado diversos estudios sobre la aplicación de técnicas ISCO sobre suelos contaminados con HAPs (Mora et al., 2009; Mora et al., 2014; Peluffo, 2016; Medina, 2017). Sin embargo, la remediación de sedimentos lacustres contaminados con HAPs en la región ha sido poco estudiada hasta el momento, habiéndose realizado algunos estudios de biorremediación en sedimentos intermareales patagónicos (Dionisi *et al.*, 2011; Lozada *et al.*, 2014), pero careciendo de antecedentes previos para ambientes lénticos.

2. Objetivos

2.1. Marco de estudio

En el marco del impacto que la contaminación por actividad petrolera produce sobre la calidad de sedimentos de ambientes acuáticos y suelos circundantes, se estudió el efecto que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) tienen sobre un embalse patagónico (Los Barreales), así como sobre las poblaciones de microalgas autóctonas, y su uso como indicadores biológicos de contaminación por HAPs. Por otro lado, se evaluó el uso de microalgas del embalse Los Barreales como bioindicadoras en la determinación de la eficiencia de remediación química *in situ* (ISCO).

2.2. Objetivos específicos

1) *Caracterizar los sedimentos lacustres y suelos susceptibles de contaminación por HAPs.*

2) *Caracterizar las asociaciones de especies fitoplanctónicas en el cuerpo de agua seleccionado en relación a la disponibilidad natural de nutrientes.*

3) *Evaluar la respuesta de sedimentos, de los suelos y el fitoplancton a dosis crecientes de contaminación por HAPs.*

4) *Investigar el uso de las algas nativas del cuerpo de agua estudiado como bioindicadoras de contaminación (HAPs) de suelos y de sedimentos lacustres.*

5) *Evaluar la utilización y efectividad de algas nativas del embalse como indicadoras biológicas del proceso de remediación química de suelos y sedimentos contaminados por HAPs.*

3. Hipótesis

De acuerdo a los objetivos específicos enumerados, se plantearon las siguientes hipótesis:

1) *“La contaminación por HAPs disminuye el crecimiento de las algas y provoca cambios en la estructura y capacidad de intercambio iónico de suelos y sedimentos”.*

2) *“Al menos una especie de las algas nativas del embalse Los Barreales, puede resultar útil como indicadora biológica de contaminación por HAPs”.*

3) *“Al menos una especie de las algas nativas del embalse Los Barreales, puede resultar útil como indicadora biológica de efectividad de remediación química de suelos y sedimentos contaminados por HAPs”.*

4. Área de estudio y colección de muestras

4.1. Área de estudio

El embalse Los Barreales está ubicado en la cuenca del río Neuquén y situado en la zona de explotación petrolera de Vaca Muerta, en el este de la provincia de Neuquén, Argentina (38°33'03"S; 68°49'21"O). Los asentamientos urbanos mas cercanos son las localidades de Añelo (20 km en dirección norte), Villa Mari Menuco y San Patricio del Chañar (25 y 50 km en dirección este, respectivamente), y Cutral Co (60 km en dirección sur). El embalse se ubica dentro del área del yacimiento Loma de La Lata, por lo que la zona aledaña al embalse muestra una importante actividad de extracción de petróleo y gas, como puede observarse a partir de la presencia de pozos de extracción en la zona (Figura 2).

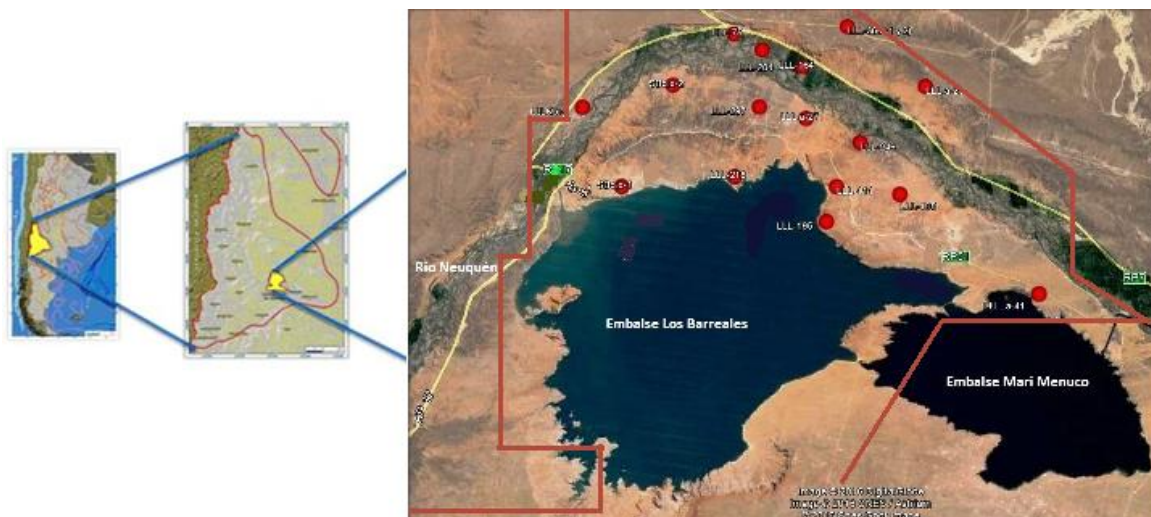


Figura 2: Ubicación geográfica de yacimiento Vaca Muerta (izquierda), yacimiento Loma de La Lata (centro) y embalse Los Barreales (derecha), y distribución de pozos de extracción (círculos rojos). Modificado de Varela (2013).

La región presenta un clima de tipo semiárido de meseta, con una precipitación anual media menor a los 200 mm y una temperatura media de 13 a 14 °C. Los vientos de la zona son predominantemente de sentido oeste-este, con una velocidad media anual de 13 km h⁻¹ y máxima de 80 km h⁻¹ (Palese *et al.*, 2009). Predominan los suelos de texturas arenosas y arcillosas, comúnmente con carbonato de calcio, muy escasa materia orgánica, pH alcalino y un fuerte déficit hídrico anual. La vegetación corresponde a la provincia fitogeográfica del Monte, predominando la estepa arbustiva media (arbustos de 1 a 2 m de altura), con una

cobertura vegetal total del 20 al 40% (Figura 3). Los principales componentes florísticos son: la jarilla (*Larrea divaricata*), la jarilla macho (*Larrea cuneifolia*), la zampa (*Atriplex lampa*), el alpataco (*Prosopis alpataco*), el molle (*Schinus polygamus*) y el monte negro o uña de gato (*Bougainvillea spinosa*). Por debajo de estos arbustos las especies más comunes son el tomillo (*Acantholippa seriphioides*), el olivillo (*Hyalis argentea*), el coirón amargo, el coirón pluma y la flechilla (*Stipa tenuis*) (Bran *et al.*, 2002).



Figura 3: Suelo y vegetación en la costa norte del embalse Los Barreales.

El embalse forma parte del complejo hidroeléctrico Cerros Colorados, y recibe el agua derivada por el dique Portezuelo Grande, ubicado sobre el cauce del río Neuquén (Figura 4). Este dique envía hacia el curso original un caudal mínimo de $12 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (Figura 5), el cual es utilizado para riego y consumo, mientras que la mayor parte de caudal es derivado hacia el embalse (Figura 6). Durante el año 2017, los caudales entrantes, erogados y derivados al embalse fueron en promedio, de $118 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, $14 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ y $100 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, respectivamente (AIC, 2018). En el extremo este, el dique Loma de la Lata tiene la función de controlar el paso de agua entre el embalse Los Barreales y Mari Menuco (Figura 4).

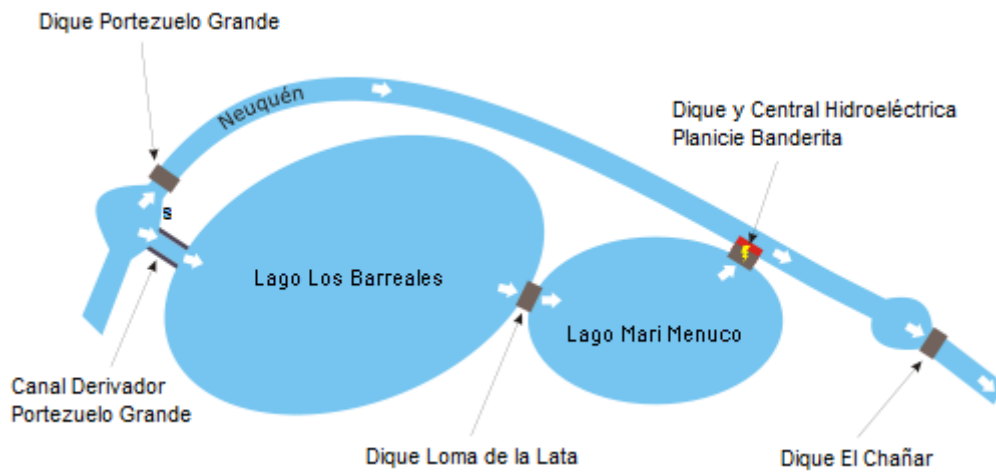


Figura 4: Esquema del complejo hidroeléctrico Cerros Colorados (extraído de <https://upload.wikimedia.org>).



Figura 5: Curso original del río Neuquén aguas abajo del dique Portezuelo Grande.



Figura 6: Entrada del caudal del río Neuquén derivado por el dique Portezuelo grande hacia el embalse Los Barreales.

El embalse Los Barreales presenta un área de 407 km², una profundidad media de 69,1 m y un volumen activo de operación de 3997 hm³. Su cota máxima es de 422 m s.n.m. En la Figura 7 se observan los niveles máximos correspondientes al año 2017, período durante el cual se realizaron los muestreos del presente trabajo, comparados con los del año precedente. El embalse cumple principalmente la función de atenuación de crecidas durante el invierno y durante el verano, como reserva de volumen de agua necesaria para mantener constante el rendimiento de los generadores de la central hidroeléctrica Planicie Banderita (<https://www.duke-energy.com.ar>).

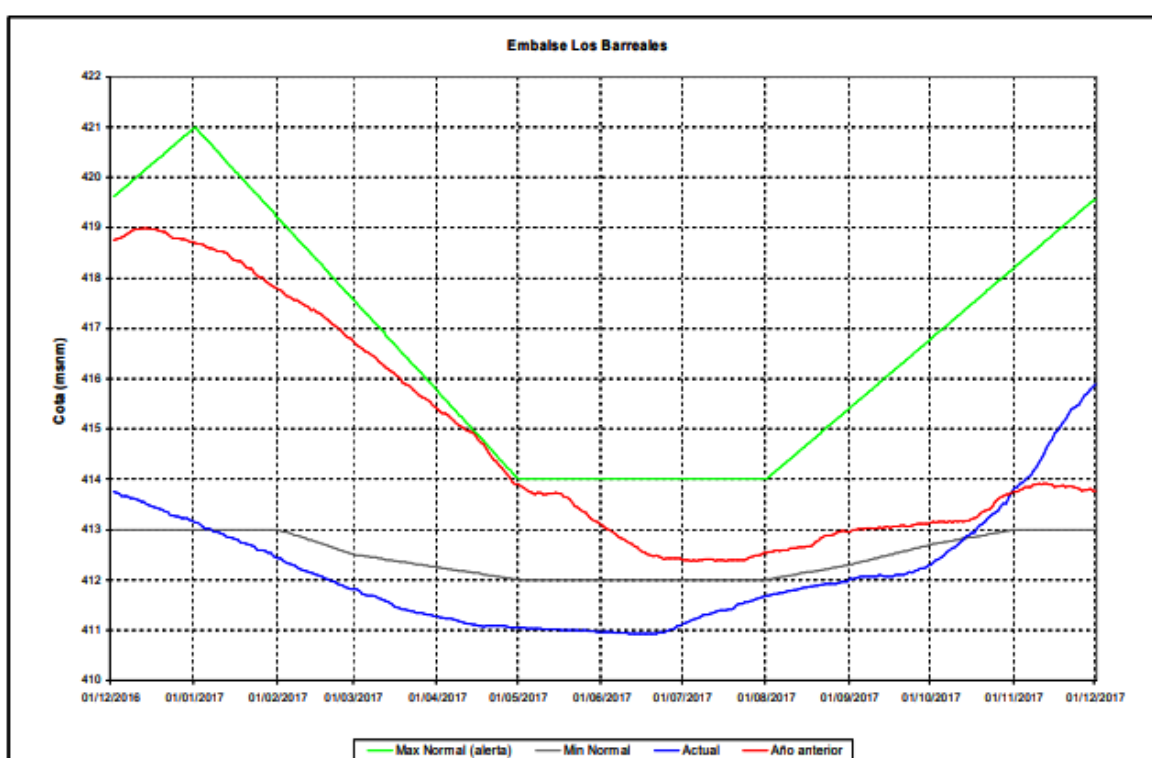


Figura 7: Niveles del embalse en 2016 (rojo), 2017 (azul), máximo normal (verde) y mínimo normal (gris). Informe Operación de Embalses Noviembre 2017. Publicado por Secretaría Operativa y Fiscalización de AIC (www.aic.gov.ar), el 29/12/2017.

4.2. Sitios y fechas de muestreo

Un total de cuatro sitios de muestreo de agua fueron establecidos, uno aguas arriba sobre el río Neuquén (LBC), y tres dentro del embalse Los Barreales, denominados LB1, LB2 y LB3 (Figura 8), y cuyas profundidades fueron de 19 m, 43 m y 39 m, respectivamente. Asimismo, se establecieron cuatro sitios de muestreo en suelos, LBC, LB1, LB2 y LB3, que correspondieron a ubicaciones en

la costa adyacentes a los sitios en el agua con la misma denominación (Figura 8). Las ubicaciones fueron determinadas utilizando GPS (Garming e-TREX). Se realizó una campaña de pre muestreo en diciembre de 2016, con el apoyo de Prefectura Naval Argentina de Villa Mari Menuco, con el objetivo de conocer la zona, navegar el embalse y establecer los sitios de muestreo. Durante el año 2017 se efectuaron muestreos en los meses de febrero, mayo, agosto y noviembre, para llevar a cabo la caracterización fisicoquímica y biológica del ambiente y coleccionar muestras para los bioensayos posteriores. En julio del 2019 se realizó un muestreo adicional, con el objetivo de coleccionar muestras para utilizarse en nuevos bioensayos.

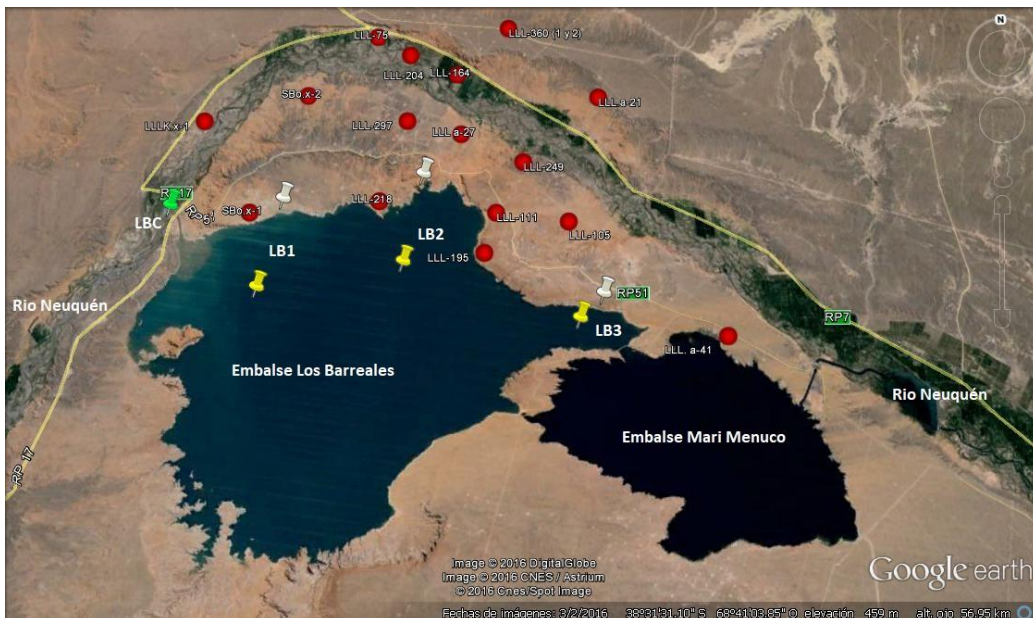


Figura 8: Sitios de muestreo en el río Neuquén y el embalse Los Barreales. De izquierda a derecha: LBC (verde: agua y suelo), LB1, LB2 y LB3 (amarillo: agua; blanco: suelo). Círculos rojos: pozos de extracción.

Capítulo I

*Caracterización del agua, sedimentos y
suelos del embalse Los Barreales*

5.1. Introducción

De acuerdo a Margalef (1983), *los embalses son un híbrido de río y lago, y su estudio se ha de basar en una visión completa de la limnología*. Son cuerpos de agua artificiales de origen antrópico, generados a partir de la interrupción del cauce natural de un río con un destino de multipropósito, como sea la generación de electricidad, riego, suministro de agua potable, para uso ganadero o la regulación de los caudales de los ríos atenuando crecidas, mejorando la navegación o permitiendo el cultivo de peces o la recreación (Kalff, 2002). Los embalses se diferencian de los lagos naturales en que poseen gradientes longitudinales en varios factores ambientales tales como la velocidad del agua, turbidez ocasionada por partículas en suspensión, acumulación de sedimentos, disponibilidad de nutrientes y cantidad de materia orgánica alóctona (Marzolf, 1990; Wetzel, 2001). Este gradiente longitudinal da origen a tres zonas relativamente delimitadas (Figura 9): a) una zona fluvial o cola, b) una zona de transición, y c) una zona con características lacustres. Cada una de estas zonas puede variar en importancia, tamaño y comportamiento, dependiendo básicamente de la hidrología del río y características asociadas como la temperatura del agua, los sitios de afluencia del/los tributarios, y la carga de nutrientes y sedimentos que se aportan al embalse (Thornton *et al.*, 1990) y particularmente del tiempo de residencia del agua (T_w).

Cuando se construye un dique o muro en el curso de un río para la creación de un embalse, se produce un descenso en la velocidad de flujo del río y la deposición gradual de la carga de sedimentos que trae consigo. En primer lugar, se deposita el material más grueso (arena), formando un delta fluvial, mientras que las partículas de menor tamaño (limos y arcillas), con bajas velocidades de sedimentación, son transportadas al interior del embalse para luego formar depósitos en el fondo que pueden llegar hasta el muro de la represa (Morris y Fan, 1998; Kostic y Parker, 2003; Julien, 2010). Los deltas generalmente conforman longitudinalmente tres zonas (Figura 9): a) un depósito de baja pendiente conformado por la carga de fondo y la fracción gruesa de la carga en suspensión (gravas y arenas principalmente) depositadas fluvialmente casi inmediatamente de

forma horizontal (superior), b) un depósito que conforma un frente de pendiente pronunciada (anterior), el cual mediante avalanchas avanza progresivamente hacia aguas más profundas, denominándose punto de intersección entre las pendientes de las áreas superior y anterior como punto de pivote, y c) un depósito de fondo conformado por sedimentos finos (limos y arcillas) (García, 2008). Como consecuencia, las diferencias en el tamaño de partículas de los sedimentos de diferentes sitios dentro de un mismo embalse derivan en diferencias en el intercambio con la columna de agua, tanto de nutrientes como de potenciales contaminantes (Styszko, 2016; Tansel y Rafiuddin, 2016; Monnin *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2018), por lo que es de importancia la caracterización de los mismos en todo el gradiente longitudinal del cuerpo de agua.

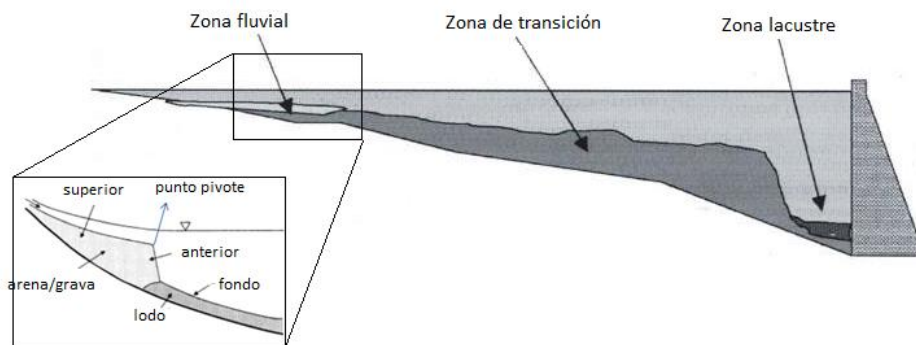


Figura 9: Zonas de un embalse y detalle del delta fluvial. Adaptado de García (2008).

La gestión y el monitoreo de la calidad del agua de un embalse son fundamentales para determinar los usos que se puedan realizar de este recurso, tanto en el propio embalse como aguas abajo del mismo. Un parámetro de importancia en la caracterización y monitoreo de calidad de un cuerpo de agua es su temperatura, más específicamente el perfil vertical de la misma, y su variación estacional (Henderson-Sellers, 1984). Los balances térmicos y procesos de mezcla que se dan a lo largo del año en un lago o embalse se encuentran influenciados por fluctuaciones en la incidencia lumínica solar, las olas internas, entradas y salidas de agua, la energía del viento (Fischer *et al.*, 1979; Imberger y Patterson, 1990) y el Tw. Estos balances derivan en lo que se conoce como

régimen de estratificación, esto es, el patrón de variación de la temperatura en diferentes estratos de la columna de agua a lo largo del año. En cuerpos de agua localizados en ambientes cálidos o templados, existe un período de estratificación en finales de primavera-verano, que finaliza al comenzar el otoño cuando la fuerza eólica adquiere mayor relevancia, generando una mezcla de la columna de agua que persiste hasta el siguiente período de estratificación estival (Figura 10) (Martin y McCutcheon, 1998; Paredes *et al.*, 2013). La clasificación térmica de los cuerpos de agua lénticos depende de la cantidad de períodos de estratificación anuales, así como de la temperatura anual promedio de la columna de agua (Wetzel, 2001), la cual también puede aplicarse a los lagos de embalse.

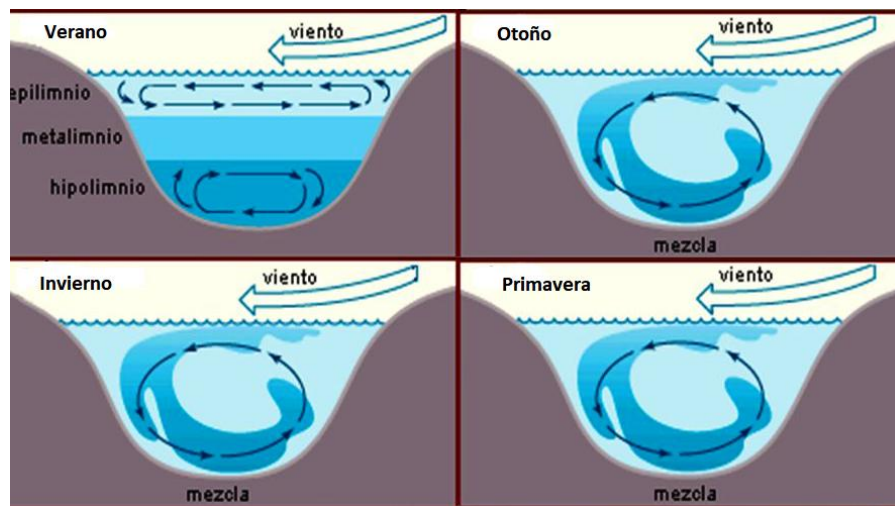


Figura 10: Períodos de estratificación-mezcla de un cuerpo de agua de ambientes templados. Adaptado de Marcano (2009).

Para evaluar y monitorear la calidad del agua de un lago o embalse, también se deben tener en cuenta parámetros físicos (ej. transparencia y temperatura de la columna de agua), químicos (ej. pH, conductividad, oxígeno disuelto y concentraciones de nutrientes tales como P y N) y biológicos (clorofila “a”, abundancia y biomasa algal). Algunos de estos parámetros permiten definir lo que se conoce como el “estado trófico” de un sistema acuático (Wetzel, 2001; Kalff, 2002). Cuando las concentraciones de nutrientes son bajas y la transparencia del agua elevada, nos encontramos frente a un ambiente oligotrófico (OECD 1982; Wetzel, 2001; Kalff, 2002), considerados de buena calidad para

diversos usos por su baja productividad biótica. Contrariamente, si estos nutrientes se encuentran en altas concentraciones, y la transparencia del agua es baja, producto del alto crecimiento del fito y zooplancton, el sistema se clasifica como eutrófico, y la calidad del agua se considera baja e inadecuada para la mayoría de sus usos. Sin embargo, en ambientes donde la turbidez de la columna de agua se ve afectada por factores distintos al crecimiento del fitoplancton, como por ejemplo por una alta carga de sólidos en suspensión, la transparencia podría no resultar adecuado para la categorización trófica del cuerpo de agua (Echaniz y Vignatti, 2009). Al proceso de transición entre un sistema oligotrófico y uno eutrófico se lo denomina eutrofización. En función de estas variables, los lagos y embalses pueden clasificarse en uno de los siguientes niveles de estado trófico: Ultraoligotrófico, Oligotrófico, Mesotrófico, Eutrófico e Hipereutrófico, de menor a mayor grado de eutrofización. Dos de los índices más conocidos para determinar el estado trófico son:

a) Índice de Estado Trófico de Carlson (TSI, Trophic Status Index), de acuerdo a las modificaciones de Aizaki *et al.* (1981). Este índice, utiliza como variables los valores medios anuales de la transparencia, determinada mediante la medición de la profundidad de visión del disco de Secchi (Sec, m), y de las concentraciones de fósforo total (PT, mg/m³) y de clorofila “a” (Chla, mg m⁻³):

$$\text{TSI (Sec)} = 60 - 14,41 \ln \text{Sec}$$

$$\text{TSI (PT)} = 14,42 \ln \text{PT} + 4,14$$

$$\text{TSI (Chla)} = 9,81 \ln \text{Chla} + 30,6$$

$$\text{Media TSI} = (\text{TSI (Sec)} + \text{TSI (PT)} + \text{TSI (Chla)})/3$$

Dónde: Ultraoligotrófico (<20), Oligotrófico (20-40), Mesotrófico (40-60), Eutrófico (60-80) e Hipereutrófico (>80).

b) Indicador OECD (Organización de Cooperación Económica y Desarrollo). Donde se utiliza la media anual de fósforo total (PT, mg/m³), la media anual eufótica de clorofila “a” (Chla, mg m⁻³), el valor máximo anual de clorofila “a” (Chla

max, mg m⁻³) y la profundidad media anual de visión del disco de Secchi (Sec, m), según la tabla 1.

Tabla 3: Clasificación trófica de ambientes acuáticos. Fuente: OECD (1982).

TIPOLOGÍA	PT (mg/m ³)	Chla media (mg/m ³)	Chla máxima (mg/m ³)	Sec (m)
Ultraoligotrófico	≤4	≤1	≤25	≥12
Oligotrófico	≤10	≤2,5	≤8	≥6
Mesotrófico	10-35	2,5-8	8-25	6-3
Eutrófico	35-100	8-25	25-75	3-1,5
Hipereutrófico	≥100	≥25	≥75	≤1,5

Sin embargo, estas clasificaciones tienen ciertas limitaciones en la definición precisa de las condiciones tróficas de un cuerpo de agua. Existe en general cierto grado de superposición, donde algunos ambientes pueden clasificarse en un estado trófico basándose en un parámetro y en otro estado trófico basándose en otro parámetro, mostrando la naturaleza subjetiva de los esquemas de clasificación trófica (Drovandi *et al.*, 2005). La OECD ha intentado superar esta limitación mediante la implementación de una clasificación trófica basada en la distribución de probabilidades para cada nivel trófico en función de los parámetros clorofila “a”, PT y profundidad de visión del disco de Secchi (Figuras 11, 12 y 13), lo que permite establecer el nivel trófico con mayor probabilidad según los tres parámetros analizados.

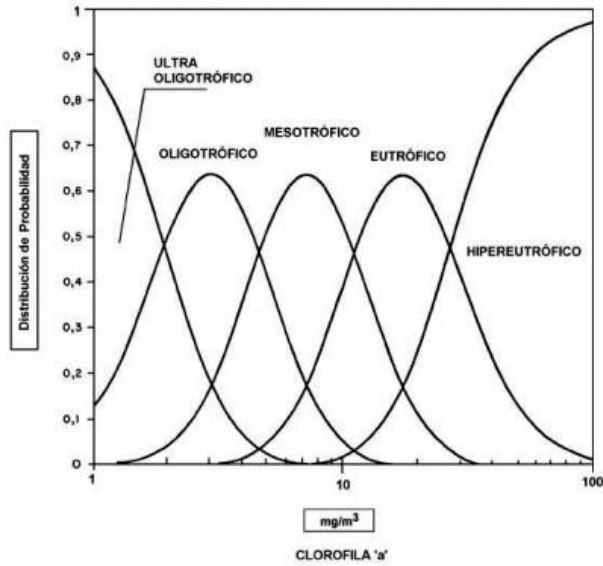


Figura 11: Distribución de probabilidad de nivel trófico en función de la concentración de clorofila "a". Adaptado de Vollenweider y Kerekes (1980).

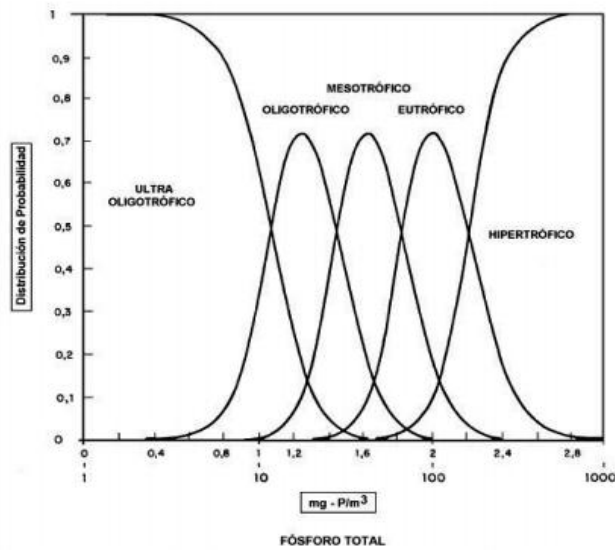


Figura 12: Distribución de probabilidad de nivel trófico en función de la concentración de la concentración de PT media anual. Adaptado de Vollenweider y Kerekes (1980).

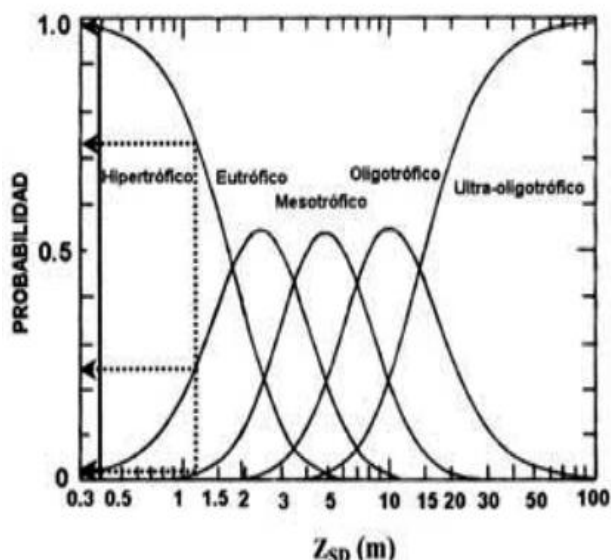


Figura 13: Distribución de probabilidad de nivel trófico en función de la concentración de la profundidad de visión del disco de Secchi media anual (Z_{SD}). Adaptado de Vollenweider y Kerekes (1980).

En Argentina, Quirós (1988) identificó relaciones entre parámetros tróficos que agruparon los ambientes continentales de acuerdo a la mejor correlación entre la clorofila y parámetros que condicionan la productividad. Para el caso de los ambientes de Patagonia, propuso la siguiente ecuación:

$$\ln \text{Chla} = -1,83 - 0,41 \ln \text{ZMEAN} + 1,06 \ln \text{TEMP} + 0,71 \ln \text{TP}$$

Dónde:

Chla: Concentración de clorofila "a" (mg m^{-3});

ZMEAN: Profundidad media de la columna de agua (m);

TEMP: Temperatura del aire ($^{\circ}\text{C}$); y

TP: Concentración de fósforo total (mg m^{-3}).

De esta manera, es importante conocer la concentración de nutrientes y su dinámica en un cuerpo de agua (entradas o "cargas" de nutrientes, salidas y almacenamiento), a efectos de evitar la modificación del nivel trófico y el consecuente descenso de la calidad del agua (OECD, 1982).

La producción de biomasa de fitoplancton de un ambiente acuático, esto es, el crecimiento de la población de organismos autótrofos del plancton, se encuentra limitada, además de por factores físicos y de herbivoría, por las concentraciones de nutrientes tales como N y P (Vollenweider, 1976). En este sentido, es importante conocer la relación entre las fracciones disueltas del nitrógeno y del fósforo, calculadas como nitrógeno inorgánico disuelto:fósforo reactivo soluble (NID:PRS). El fósforo fue considerado durante mucho tiempo el nutriente limitante más importante para el crecimiento algal en lagos, sin embargo, esta conclusión deriva mayormente de estudios en regiones templadas del hemisferio norte. Numerosos estudios han demostrado que en ambientes acuáticos andinos el nutriente limitante es el nitrógeno (Pedrozo *et al.*, 1993; Diaz, 1994; Soto *et al.*, 1994; Temporetti *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2007), donde se encontraron relaciones NID:PRS inferiores a 16:1 (base molar), límite considerado como distinción entre ambientes limitados por nitrógeno, de aquellos limitados por fósforo (Rhee y Gotham, 1980).

A las variaciones en la composición de las especies en función de las fluctuaciones estacionales de variables ambientales que ocurren en el fitoplancton se la denomina sucesión estacional. Reynolds (1988) considera que esta comunidad se estructura en relación con un número limitado de variables tales como la disponibilidad de nutrientes y luz, lo que a su vez también se relaciona a la estratificación de la columna de agua. En el mismo sentido, Harris (1986) postula que la sucesión estacional de especies algales está controlada por la profundidad de la mezcla de la columna de agua, los niveles de P y N durante el verano, y la fluctuación estacional de la luz. Se han desarrollado muchos modelos predictivos de sucesión estacional para el fitoplancton, en los que se evalúan factores biológicos, como la competencia y la herbivoría, factores físicos, como la disponibilidad de luz, y factores químicos, como las concentraciones de nutrientes disponibles (Sommer *et al.*, 1986; Passarge *et al.*, 2006; Rodrigo *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, otro aspecto importante de ser considerado en la caracterización y monitoreo de un embalse son sus sedimentos y los suelos circundantes, ya que estos pueden almacenar diversas sustancias

que pueden ser liberados a la columna de agua tiempo después del proceso de contaminación (Golterman, 2004; Wang *et al.*, 2009) Además, los sedimentos constituyen un eslabón muy significativo en el ciclo de los nutrientes en los ambientes acuáticos (Böstrom *et al.*, 1982; Golterman *et al.*, 1983; Håkanson y Jansson, 1983; Istvánovics *et al.*, 2004; Nürnberg, 2009; Chorus *et al.*, 2020).

La actividad petrolera como la que se está desarrollando en la cuenca del Río Neuquén, agrega una complejidad nueva a los procesos naturales y contaminantes a los embalses de la región, como es el caso del Embalse Los Barreales, objeto de esta Tesis.

En este sentido, los suelos de la cuenca del río Neuquén se encuentran en potencial riesgo de contaminación, dado el número creciente de asentamientos tanto por la explotación petrolera, los frecuentes accidentes que han provocado derrames de hidrocarburos, como el agregado de desarrollo urbano los cuales ambos convergen en una afectación directa al ambiente circundante (Proyecto FAO UfArg017). Entre los contaminantes derivados de esta actividad industrial, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) suponen un alto riesgo ambiental, teniendo en cuenta su alta persistencia en suelos y sedimentos, y su toxicidad en organismos biológicos (IARC, 1983; Upham *et al.*, 1998) e incluso pueden afectar el mismo estado trófico por interacción por ejemplo de los HAPs con la disponibilidad de nutrientes, tanto en la columna de agua como en los sedimentos.

En Patagonia Norte existen estudios de caracterización de embalses, entre ellos algunos ubicados sobre los ríos Limay (Temporetti *et al.*, 2001) y Colorado (Echaniz y Vignatti, 2009). Labollita y Pedrozo (1998) estudiaron distintos embalses de la cuenca del río Negro (ríos Limay y Neuquén), identificando diferentes patrones de control de estado trófico ente los mismos, y observando en particular que la transparencia es fuertemente reguladora del estado trófico del Embalse Los Barreales. En esta zona de la Patagonia existen también algunos estudios relacionados a la presencia de hidrocarburos en agua y sedimento, tanto en la cuenca del río Colorado (COIRCO, 2020) como en la cuenca del río Neuquén. En la cuenca del río Colorado, COIRCO (2018) analizó la presencia de

los 16 HAPs prioritarios mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (EPA 3540 C/ 8270 D), obteniendo valores no detectables en todos los sitios analizados (límite de cuantificación: 0,006 ppm de sedimento seco: ppm_{ss}). En la cuenca del río Neuquén Monza *et al.* (2013) analizaron la presencia de hidrocarburos mediante cromatografía gaseosa acoplada a detector de ionización en llama (Método EPH-04, revision1.1), encontrando en el embalse Los Barreales concentraciones de 2.25 ppm_{ss} de hidrocarburos alifáticos y no detectables para los 16 HAPs prioritarios (límite de detección: 0.023 ± 0.005 ppm_{ss}), sugiriendo un origen petrogénico de los primeros.. Sin embargo, no existe un estudio detallado de las variables fisicoquímicas del embalse, y sus variaciones estacionales. En este contexto, es de gran importancia realizar una caracterización fisicoquímica y biológica del ambiente, con el objetivo de establecer el estado actual del mismo, información esencial para su manejo y monitoreo.

5.2. Materiales y Métodos

Para responder a los objetivos específicos 1 y 2: “*Caracterizar los sedimentos lacustres y suelos susceptibles de contaminación por HAPs*” y “*Caracterizar las asociaciones de especies fitoplanctónicas en el cuerpo de agua seleccionado en relación con la disponibilidad natural de nutrientes*”, se siguió la metodología que se detalla a continuación:

5.2.1. Columna de agua

Obtención de muestras:

Teniendo en cuenta los sitios descritos en la sección 4.2., se colectaron muestras de agua de superficie en el río (LBC), y en cada sitio del embalse se colectaron muestras con botella Van Dorn (3 L) (Figura 14) en superficie, a la mitad de la profundidad máxima de cada sitio, y fondo (LB1:19 mts; LB2: 43 mts; LB3: 39 mts). Las profundidades máximas fueron determinadas mediante una ecosonda Eagle Cuda 128 (Figura 14). Las muestras se conservaron en frío y oscuridad de acuerdo con las recomendaciones realizadas por APHA (1995).



Figura 14: Botella Van Dorn para colección de muestras de agua (izquierda) y ecosonda Eagle Cuda 128 utilizada para determinar profundidades de sitios de muestreo en el embalse (derecha).

Mediciones in situ:

In situ, se obtuvieron perfiles verticales en la columna de agua de temperatura, conductividad eléctrica, potencial redox (ORP), pH, porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (DO%) y concentración de oxígeno disuelto (O_2) mediante una sonda multiparamétrica Esy 6000 (Figura 15). En los casos en los que no fue posible la utilización de la sonda multiparamétrica (condiciones meteorológicas inadecuadas), temperatura, conductividad eléctrica y pH fueron analizados en las muestras colectadas con botella Van Dorn, utilizando equipos Thermo Orion 3 Star conductividad portátil y Thermo Orion 3 Star pH portátil, y calibrando con buffers comerciales (Anedra) de pH 4, 7 y 10. Se determinó transparencia de la columna de agua mediante utilización de disco de Secchi (Figura 15), y luego se estimó el límite de la zona fótica a partir del producto entre la profundidad de visión del disco y el coeficiente de 2,5 propuesto por Ryding y Rast (1992).



Figura 15: Sonda multiparamétrica Esy 6000 (izquierda) y disco de Secchi (derecha).

Análisis de laboratorio:

Para las muestras de agua obtenidas en el sitio LBC, con el objetivo de estimar la carga de sólidos entrantes al embalse, se determinaron los sólidos totales en suspensión (SST), mediante filtrado por filtros de fibra de vidrio de 45 μm de poro y posterior secado en estufa a 104 $^{\circ}\text{C}$. Los sólidos se determinaron por diferencia de peso.

Columna de agua

Nutrientes totales

Se determinaron PT y nitrógeno total (NT) sobre una fracción de las muestras de agua sin filtrar. El PT se analizó mediante digestión con persulfato de potasio y ácido sulfúrico 1:4 y posterior determinación del fósforo reactivo soluble (PRS) (Murphy y Riley, 1962), mientras que el NT se determinó mediante digestión con persulfato de potasio e hidróxido de sodio 1,5 M y posterior determinación de nitratos y nitritos ($\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$), siguiendo las recomendaciones de Grasshoff *et al.* (1983). El PRS se analizó mediante reacción colorimétrica con azul de molibdato y ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962), $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ por reducción en columna de cadmio y formación de complejo diazoico, y N-NH_4^+ por

el método del azul de indofenol (Golterman, 1978; APHA, 1995). El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) se calculó como la suma de $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ y N-NH_4^+ .

Nutrientes disueltos

PRS, $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ y N-NH_4^+ se determinaron sobre una fracción de las muestras de agua filtrada por acetato de celulosa (45 μm de poro), siguiendo la misma metodología detallada en el párrafo anterior.

Material extractable en solventes: exploración del potencial contenido de HAPs

El material extractable en solvente (MES) fue obtenido mediante una extracción líquido-líquido (Método EPA 3550b) mezclando 50 mL de agua del embalse en una ampolla de decantación con 3 mL de solvente (1:1 hexano:acetona). La fase orgánica se filtró a través de filtros de nylon (0.45 μm). Luego, 2 μL del filtrado fueron inyectados en un cromatógrafo gaseoso PerkinElmer Clarus 500 equipado con una columna Agilent HP 5 (30 m x 0.25 mm i.d. con 0.25 μm de espesor de film) y un detector de ionización de llama (Morelli et al., 2005). Se cuantificó la señal del cromatograma que coincidía con el tiempo de retención de los HAPs en comparación con una calibración con un standard de los 16 HAPs contaminantes prioritarios propuestos por USEPA (AccuStandard® PAHmix 2 mg mL⁻¹), con un límite de detección (LOD) de 1 ppm. Esta metodología permite cuantificar la suma de compuestos polares, hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos, en el tiempo de retención de cada HAP con el que se compara. Los resultados por debajo del límite de detección indican que el HAP de comparación no se detectó en la muestra por encima del LOD. Los resultados por encima del LOD indican que el HAP podría estar presente en la muestra y su concentración deberá ser confirmada por otro método. En caso que estuviera presente la concentración máxima posible del compuesto en la muestra sería la cuantificada por este método.

Abundancia algal

Para la caracterización de las asociaciones de especies fitoplanctónicas, se colectaron dos tipos de muestras. Por un lado, se concentraron muestras de agua subsuperficial (aproximadamente 100 L) mediante filtrado por redes Hydro-bios®

de 10 y 50 μm de poro (Figura 16) con el objetivo de eliminar el zooplancton $> 50 \mu\text{m}$. La fracción retenida en la red de 10 μm se almacenó en frascos de plástico de 100 mL con agregado de formol y se transportaron a temperatura ambiente, para ser utilizadas posteriormente en la caracterización de las especies algales. Una vez en el laboratorio, la identificación taxonómica de las especies se realizó bajo microscopio óptico Olympus® BX-51 con aumento de 1000X, y consultando la bibliografía específica para cada grupo algal, y se tomaron microfotografías con cámara fotográfica Olympus® SP-350.



Figura 16: Filtrado de muestras de agua subsuperficial a través de redes Hydro-bios®.

Por otro lado, para realizar recuentos algales se obtuvieron muestras con botella Van Dorn de 3 litros de capacidad en subsuperficie (0,2 m), 2, 6, 10, 18 m y máxima profundidad (LB1:19 m; LB2: 43 m; LB3: 39 m). Las muestras se fijaron con lugol-acético y se conservaron en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez en el laboratorio, el recuento algal se realizó bajo microscopio invertido Leica®, con aumento de 400X, mediante el método de Utermöhl. Dependiendo de la concentración de algas en cada sitio o profundidad, se prepararon cámaras de 5, 10 ó 25 mL, y se dejó reposar un tiempo mínimo de 0,2 h mL^{-1} .

Clorofila “a”

Otra fracción de las muestras de agua (aproximadamente 3 L) colectadas a diferentes profundidades fueron filtradas, en el transcurso del día de muestreo, por

filtros Whatman® GF/F de 0,7 µm de poro, y los filtros se conservaron en oscuridad a -18 °C hasta su procesamiento. La extracción del pigmento se realizó en tubos plásticos tipo Falcon® de 15 mL, utilizando 10 mL de acetona 90%, 30 segundos de agitación manual y 18 hs de reposo en oscuridad a una temperatura de 4 °C. Posteriormente se centrifugó (2000 rpm durante 15 minutos), y se midió densidad óptica de los sobrenadantes a 664 y 750 nm (para descontar el aporte de la turbidez de la muestra), en un espectrofotómetro Metrolab 1700, siguiendo la metodología propuesta por APHA (1995). Se repitieron las mediciones luego de acidificar las muestras con 0,4 ml de HCl 0,1 N. Para estimar la concentración de Clorofila “a” se utilizó la fórmula propuesta por Clesceri *et al.* (1998):

$$\text{Clorofila a } \left(\frac{\text{mg}}{\text{m}^3}\right) = 26,7 \frac{(\text{DO } 664_{\text{antes}} - \text{DO } 665_{\text{después}})V1}{V2 L}$$

Dónde:

V1 = volumen del extracto en ml

V2 = volumen de la muestra filtrado en litros

L = largo del paso de luz en cm

DO 664antes = densidad óptica antes de acidificar

DO 665después = densidad óptica después de acidificar

Diversidad específica

La diversidad específica se calculó en base al índice de Shannon-Weaver (H') (Margalef, 1983), a partir de la siguiente fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Dónde:

S – número total de especies

p_i – proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos

i – número de especie

Cálculo de carga de P

Los datos hidrometeorológicos de la cuenca del río Neuquén durante el año de muestreo (2017) se obtuvieron del anuario hidrológico de la Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro (AIC, 2018). La carga total (X_t) de P aportada al embalse se calculó a partir de la estimación de las cargas relativas de precipitación (X_p), afluentes (X_a) y escorrentía (X_e):

$$X_T = X_e + X_a + X_p$$

Debido a la inexistencia de centros urbanos cercanos al embalse, no se tuvo en cuenta un posible aporte antrópico o de escorrentía urbana de P. Se realizó la estimación del aporte de P por escorrentía (X_e) a partir de los valores propuestos por Rast *et al.* (1983) para áreas rurales (P_e) y la superficie de la cuenca del embalse Los Barreales (S_{LB}):

$$X_e = P_e \times S_C$$

Para la estimación de los aportes de P por deposición atmosférica (X_p) se emplearon el área del embalse (S_{LB}) y los datos de precipitaciones (L: mm de lluvia caída) medidos por AIC (2018), y los valores de PT en agua de lluvia (PT_L) obtenidos por Pedrozo *et al.* (1993):

$$X_p = PT_L \times S_{LB} \times L$$

La carga por afluente (X_a) se realizó multiplicando la concentración promedio anual de PT medida en LBC (PT_{LBC}) por el caudal medio anual (C_m) del río Neuquén en LBC:

$$X_a = PT_{LBC} \times C_m$$

Determinación de estado trófico:

Para determinación del estado trófico del embalse, se tomaron como criterios el índice de Estado Trófico de Carlson (TSI, Trophic Status Index) de

acuerdo a las modificaciones de Aizaki *et al.* (1981), y el indicador de la OECD. Asimismo, se utilizó también la clasificación de la OECD basada en los gráficos de distribución de probabilidades tróficas (Vollenweider y Kerekes, 1980).

5.2.2. Agua intersticial

Obtención de muestras:

Las muestras de agua intersticial de los sedimentos se obtuvieron, en el transcurso del día de muestreo, por centrifugación de las muestras de sedimento (ver sección 5.2.3.) en tubos de plástico tipo Falcon® de 50 mL, a 4000 rpm durante 10 minutos (APHA, 1995). Se separó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta, se almacenó en frascos de vidrio color caramelo de 250 mL, y se conservó a 4 °C hasta su análisis.

Mediciones in situ

In situ, se midieron temperatura, conductividad eléctrica y pH sobre las muestras almacenadas en los frascos de vidrio, utilizando equipos Thermo Orion 3 Star conductividad portátil y Thermo Orion 3 Star pH portátil, y calibrando con buffers comerciales (Anedra) de pH 4, 7 y 10.

Análisis de laboratorio

Nutrientes totales

Se determinaron PT y nitrógeno total (NT) sobre una fracción de las muestras de agua intersticial sin filtrar. El PT se analizó mediante digestión con persulfato de potasio y ácido sulfúrico 1:4 y posterior determinación del fósforo reactivo soluble (PRS) (Murphy y Riley, 1962), mientras que el NT se determinó mediante digestión con persulfato de potasio e hidróxido de sodio 1,5 M y posterior determinación de nitratos y nitritos ($\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$), siguiendo las recomendaciones de Grasshoff *et al.* (1983). El PRS se analizó mediante reacción colorimétrica con azul de molibdato y ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962), $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ por reducción en columna de cadmio y formación de complejo diazoico, y N-NH_4^+ por el método del azul de indofenol (Golterman, 1978; APHA,

1995). El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) se calculó como la suma de N-NO_3^- + N-NO_2^- y N-NH_4^+ .

Nutrientes disueltos

PRS, N-NO_3^- + N-NO_2^- y N-NH_4^+ se determinaron sobre una fracción de las muestras de agua intersticial filtrada por acetato de celulosa (45 μm de poro), siguiendo la misma metodología detallada en el párrafo anterior.

5.2.3. Sedimentos y suelos

Obtención de muestras

Las muestras de sedimentos se colectaron con un corer tipo UWITEC (Figura 17), en cada sitio por triplicado, y se cortaron los 10 cm superiores de cada testigo del corer. Luego de realizar las correspondientes mediciones *in situ*, y de centrifugar parte de los sedimentos para obtención del agua intersticial, todas las muestras se integraron, colocándolas en bolsas de polietileno y refrigeradas a 4 °C para su conservación y posterior análisis (APHA, 1995).



Figura 17: Corer tipo UWITEC (izquierda) y muestras de sedimentos colectadas (derecha).

Las muestras de suelos se obtuvieron con un cilindro de policloruro de vinilo (PVC), previa limpieza de restos vegetales y materia orgánica en descomposición de la superficie del sitio. El cilindro se enterró los primeros 10 cm y el suelo colectado se colocó en bolsas de polietileno y se conservó en oscuridad a 4 °C. La cantidad de suelo obtenido en cada sitio fue de aproximadamente 1 Kg.

Mediciones in situ

Una vez obtenidas las muestras en el campo, y durante el mismo día de muestreo, se analizaron potencial de óxido-reducción (ORP), pH y temperatura en simultáneo mediante utilización de un equipo Orion 920 A. En el caso de los sedimentos, la medición se realizó sumergiendo los electrodos correspondientes directamente en la muestra (Figura 18). Para la medición de estos parámetros en suelos se utilizó una relación suelo:agua de 1:2,5 en tubos plásticos tipo Falcon® de 50 mL, se agitó en shaker durante 5 minutos, se dejó en reposo durante 1 hora, y luego se sumergieron los electrodos en el sobrenadante (EPA-9045D). Se realizó la calibración con buffers comerciales (Anedra) de pH 4, 7 y 10.



Figura 18: Mediciones de ORP, pH y temperatura en el campo, utilizando equipo Orion 920 A.

Análisis de laboratorio

El contenido de agua de los sedimentos y suelos se determinó por gravimetría. Se colocó una submuestra en una cápsula de vidrio en estufa a (105 ± 5) °C durante 24 horas. Posteriormente se enfrió en desecador hasta temperatura ambiente y se pesó. Se colocó nuevamente en estufa durante 1 hora, se enfrió y pesó nuevamente, repitiendo el procedimiento hasta obtener peso constante. La diferencia de peso respecto al sedimento o suelo húmedo se expresó como porcentaje de humedad.

Otras submuestras de sedimentos y suelos fueron secadas a 60 °C en estufa. Posteriormente, se realizaron los siguientes análisis sobre las mismas:

Una fracción de cada muestra (entre 180 y 250 g) se utilizó para el análisis granulométrico, que se llevó a cabo mediante un set de tamices: 2 mm (Newark, ASTM No. 10 USA Standard Series Sieves), 1 mm (Newark, ASTM No. 18 USA Standard Series Sieves) y 0,25 mm (Newark, ASTM No. 60 USA Standard Series Sieves). La fracción retenida en cada tamiz fue pesada y se calculó el porcentaje de las siguientes fracciones: arena gruesa (> 2 mm), arena media (2 - 1 mm), arena fina (1 - 0,25 mm) y arena muy fina (0,25 - 0,05 mm). Sobre la fracción que atravesó el set de tamices, las fracciones de limo (0,05 - 0,002 mm) y arcilla (< 0,002 mm) fueron determinadas por el método del densímetro (Forsythe, 1985).

Otra fracción fue tamizada por malla de 500 µm para eliminar la fracción gruesa menos reactiva. Sobre la fracción tamizada, se analizaron: PT por digestión ácida con H₂SO₄ y H₂O₂ (Carter, 1933) utilizando un digestor Hach Digesdahl® y posterior determinación de PRS (Murphy y Riley, 1962), y carbono total (CT) y nitrógeno total (NT) mediante analizador automático Thermo FlashEA 1112.

El fraccionamiento de P fue realizado de acuerdo con el esquema de Hieltjes y Lijklema (1980) (Figura 19). Alícuotas de 0,1 g de sedimento o suelo seco se colocaron en tubos plásticos tipo Falcon® de 50 mL. Se realizaron cuatro extracciones consecutivas. Las primeras dos, para la extracción del fósforo lábil (P-lábil) o rápidamente biodisponible, se llevaron a cabo con una solución de NH₄Cl 1 M durante 2 hs en oscuridad; al cabo de las cuales se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min. Posteriormente se determinó PRS sobre el sobrenadante (Murphy y Riley, 1962). La tercera extracción, que libera libera el fósforo vinculado a compuestos de hierro y aluminio (P-Fe y P-Al), se realizó utilizando una solución de NaOH 0,1 M, durante 17 hs en oscuridad y luego centrifugando a 2000 rpm durante 15 min, determinando nuevamente PRS en el sobrenadante previamente neutralizado con HCl 1M. La última extracción, del fósforo asociado a compuestos de calcio (P-Ca), se efectuó con una solución de HCl 0,5 M durante 24 hs, al cabo del cual se centrifugó a 2500 rpm durante 20 min, determinándose PRS en el

sobrenadante previamente neutralizado con NaOH 1M. El fósforo orgánico fue calculado como la diferencia entre el PT y la sumatoria de las diferentes fracciones de fósforo extraídas.

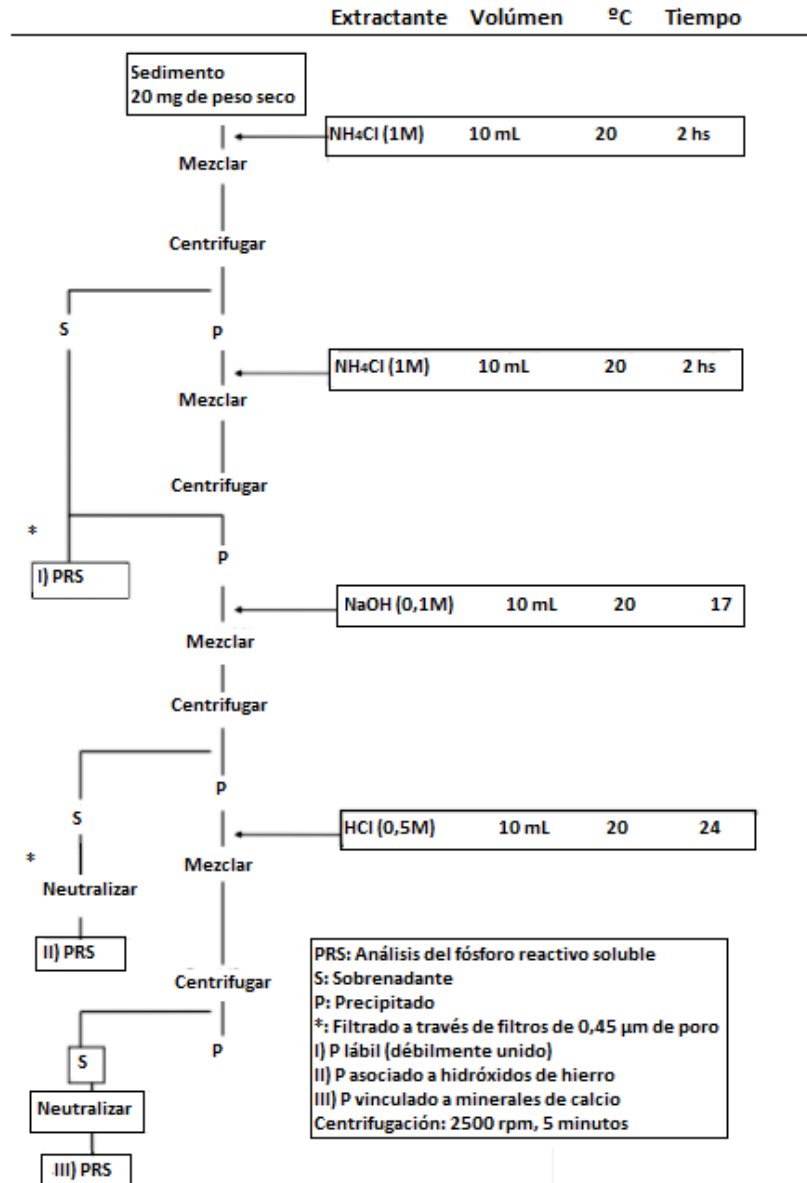


Figura 19: Esquema del fraccionamiento del P en sedimentos y suelos según Hieltjes y Lijklema (1980), tomado de Temporetti (1999).

Para la caracterización geoquímica de sedimentos y suelos se analizó la composición elemental de los mismos (Si, Al, Fe, S, Ca, Mg, Na, K y Ti) sobre muestras de sedimento o suelo seco, mediante microscopía electrónica de barrido con detector de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (SEM-EDS)

(Philips 515-EDAX Genesis 2000). La detección por EDS se llevó a cabo con un detector Octane Pro Silicon Drift Detector (EDAX, Mahawah, NJ, USA) a 30 kV, tamaño de grano de 7 nm, y a una distancia de trabajo de 10 mm. El análisis químico cuantitativo se realizó mediante el software TEAM® EDS System. El análisis se realizó en el Centro Atómico Bariloche.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) de los sedimentos y suelos se determinó según la metodología propuesta por Summer y Miller (1996), en el laboratorio del INTA-EEA Bariloche. Se realizó la extracción sobre 1 g de sedimento seco mediante agregado de 10 mL de NH_4Cl 1 M, lavado con agua destilada y reemplazo del ión adsorbido con KNO_3 1 M. Posteriormente, se realizó la destilación de 10 mL del extracto obtenido con 5 mL de NaOH 1M y 10 mL de agua destilada, se recolectó el destilado en 5 mL de H_3BO_3 1M, y se tituló con solución valorada de HCl .

Para obtención del MES, una submuestra de 1 g de sedimentos o suelos se mezcló en un tubo de policarbonato con 3 mL de solvente (1:1 hexano:acetona) (Banjoo y Nelson, 2005). La extracción se realizó mediante utilización de ultrasonido (Testlab Ultrasonic TB10TA) a 40 kHz y 400 W durante 60 minutos (Luque-García y Luque de Castro, 2003). La mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos (Presvac model DCS-16RV) y la solución se filtró a través de filtros de nylon (0,45 μm de poro). El análisis por CG-FID se realizó de la misma forma anteriormente descrita para las muestras de agua.

5.2.4. Análisis estadísticos

Para estudiar variaciones estacionales y entre distintos sitios de muestreo en los parámetros analizados se utilizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), con un nivel de significancia de 5 %. Las variables de respuesta bajo análisis fueron, en agua: conductividad eléctrica, pH, concentración de nutrientes totales (PT y NT) y disueltos (PR_S , N-NH_4^+ , N-NO_3^- + N-NO_2^-), concentración de clorofila “a” y abundancia algal; y PT en sedimentos y suelos. Las comparaciones entre estaciones se llevaron a cabo utilizando el test de Tukey (Montgomery, 2004) *a posteriori*. Se utilizó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011).

5.3. Resultados

5.3.1. Columna de agua

En la Figura 20 se representan los perfiles verticales de temperatura en la columna de agua, para cada sitio y estación. Se observó que el rango de temperaturas promedio anuales varía desde aproximadamente 9 °C (invierno) a 21 °C (verano), en todos los sitios del embalse. Por otro lado, se observaron descensos de temperatura con el aumento de la profundidad tanto en verano (7 °C en LB2) como en primavera (2 °C en LB1, LB2 y LB3), siendo los puntos de inflexión de las curvas de temperatura (termoclina) a mayor profundidad según avanzamos horizontalmente en el embalse desde LB1 (13 m) a LB3 (30 m). Por el contrario, durante las estaciones de otoño e invierno se observaron perfiles de temperatura homogéneos en todos los sitios a lo largo del eje vertical del embalse.

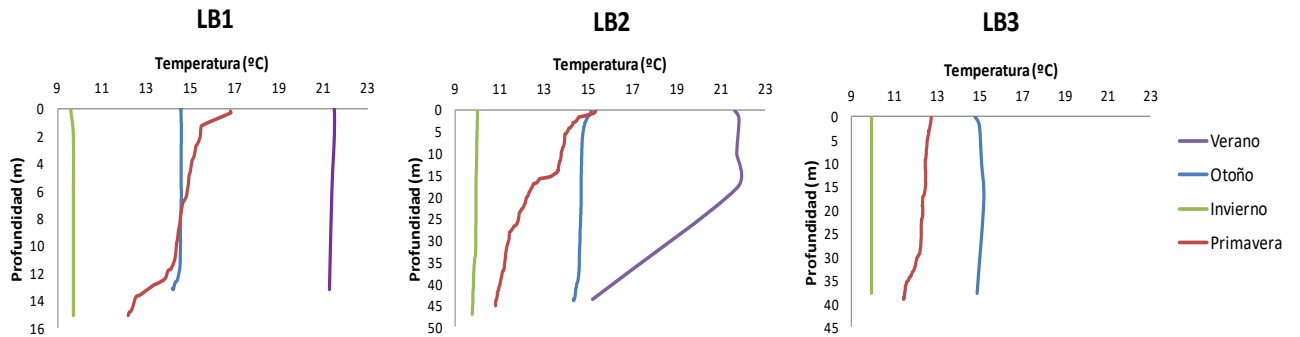


Figura 20: Perfiles verticales estacionales de temperatura para cada sitio del embalse.

Los valores promedio de conductividad eléctrica de todos los sitios estudiados se representan en la Figura 21. Se observó un descenso significativo en los valores de conductividad entre verano y primavera para LB1 y LBC ($p < 0,05$), más marcado en LBC (desde un máximo de $600 \mu\text{S cm}^{-1}$ en verano a un mínimo de $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ en primavera).

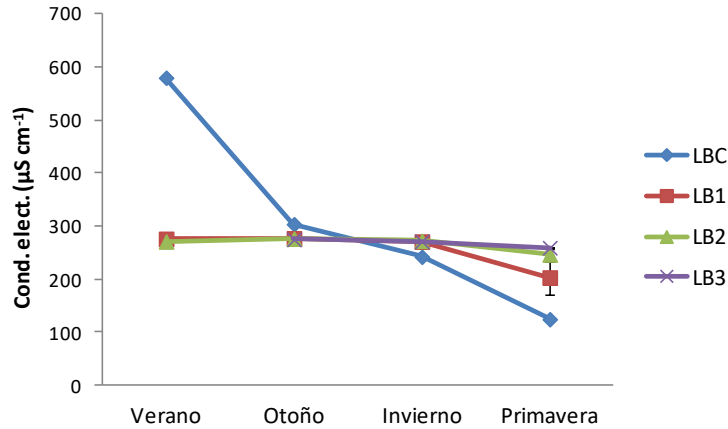


Figura 21: Conductividad eléctrica promedio en la columna de agua para cada sitio y estación del año.

El perfil vertical de conductividad en el embalse se representa en la Figura 22. Durante las estaciones de verano, otoño e invierno se observó homogeneidad en la columna de agua, con valores que oscilaron entre 260 y $280 \mu\text{S cm}^{-1}$, mientras que en primavera se observaron los valores más bajos del año, con gradientes tanto en el eje horizontal como en el vertical, según el sitio evaluado. En LB1, se observaron los menores valores del eje horizontal, que a su vez aumentaron con la profundidad (de $170 \mu\text{S cm}^{-1}$ en superficie a $230 \mu\text{S cm}^{-1}$ en el fondo) con un cambio en los valores registrados a los 8 m de profundidad. En el sitio LB2, el mínimo se encontró entre los 5 y 15 m de profundidad ($225 \mu\text{S cm}^{-1}$), aumentando hacia el fondo (45 m) hasta valores de $265 \mu\text{S cm}^{-1}$. En el sitio LB3 se observaron valores menores: $255 (\pm 5) \mu\text{S cm}^{-1}$ a los observados en las estaciones LB1 y LB2, aunque en este sitio no se observaron variaciones en el eje vertical.

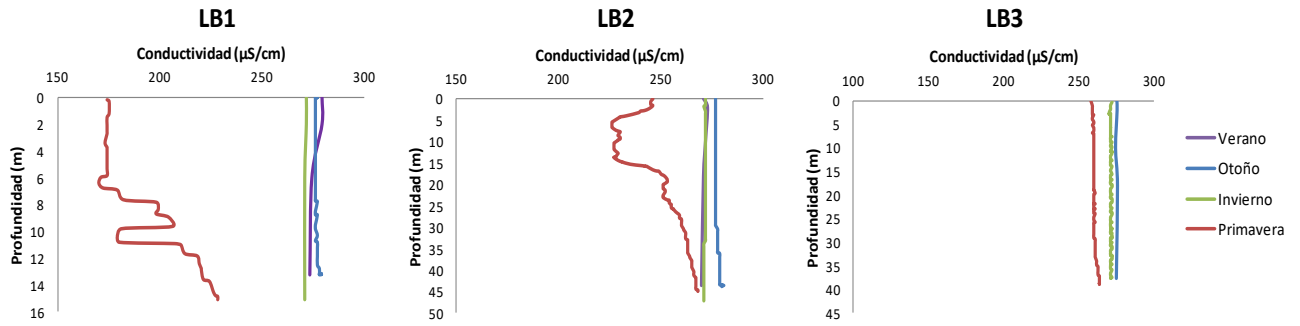


Figura 22: Perfiles verticales estacionales de conductividad para cada sitio del embalse.

En la Figura 23 se representan los perfiles verticales de ORP para cada sitio del embalse, en las estaciones del año en las que la medición con la sonda mutiparamétrica fueron posibles. Se observaron valores homogéneos en el perfil vertical durante las estaciones de otoño e invierno, con valores promedio de +130 mV y +180 mV, respectivamente, mientras que en primavera se observaron aumentos del valor de ORP a mayores profundidades, tanto en LB2 como en LB3, desde +140 mV a +180 mV.

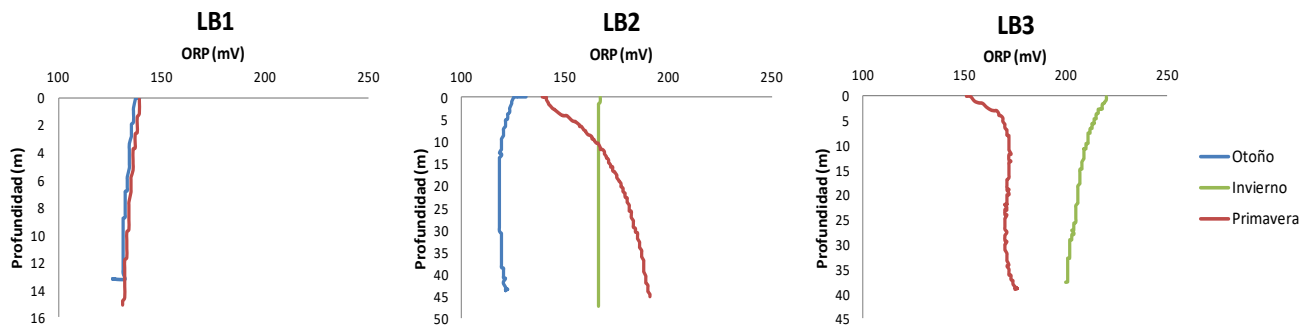


Figura 23: Perfiles de ORP estacionales para los diferentes sitios.

En la Figura 24 se representan los perfiles verticales de saturación de oxígeno disuelto (DO%). En estos casos, se observó saturación cercana al 100 % en todos los sitios, y concentraciones de O_2 promedio que oscilaron entre 11 mg L^{-1} en invierno y 12 mg L^{-1} en primavera. Asimismo, se observó una disminución de un $15 (\pm 5) \%$ en DO% al aumentar la profundidad, en todos los sitios, en primavera.

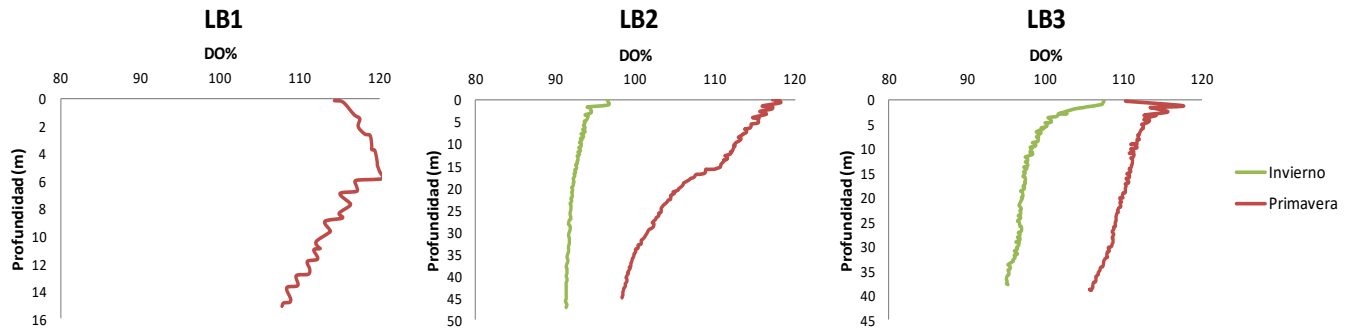


Figura 24: Perfiles verticales estacionales de DO%, para los tres sitios.

La transparencia de la columna de agua presentó valores promedio de 3,3 m a lo largo del año. A su vez, estos valores presentaron variaciones estacionales y a lo largo del eje horizontal del embalse (Figura 25), con valores máximos en verano en LB2 (6 m) y mínimos en primavera en LB1 (0,2 m), que se correspondieron con límites de la zona fótica estimados de 15 y 0,5 m, respectivamente.

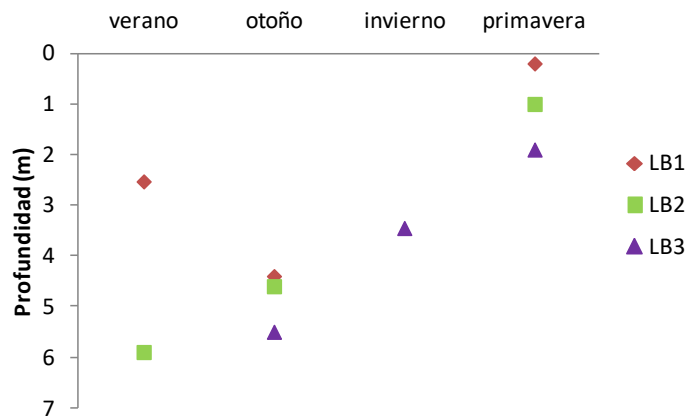


Figura 25: Transparencia de la columna de agua para cada sitio, por estación.

En la Figura 26 se muestran los valores estacionales promedio de pH en los cuatro sitios estudiados. En LBC se observó un mínimo en otoño (7,2), mientras que el resto de las estaciones mostraron un valor de $8,1 \pm 0,1$. Los valores de pH en la columna de agua del embalse no presentaron variaciones estacionales ni verticales ($p > 0,05$), manteniendo un valor de $8,1 \pm 0,1$.

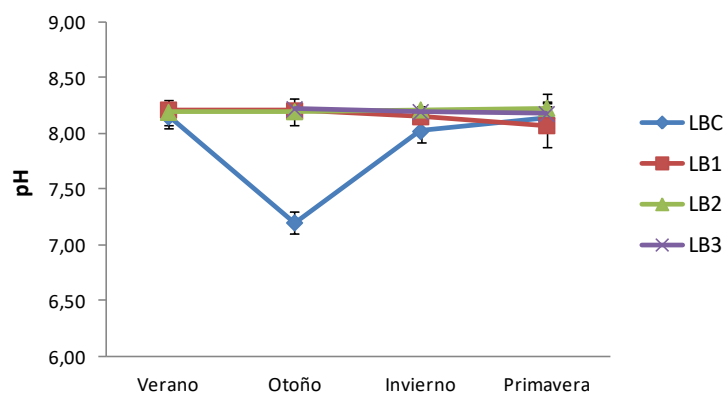


Figura 26: pH en columna de agua para cada sitio y estación del año.

Análisis de laboratorio

En la Figura 27 se representan los valores de SST obtenidos para LBC, los cuales se relacionan con los datos obtenidos por AIC (2018) para el caudal del río Neuquén en ese sitio, precipitaciones estacionales promedio en la zona de monte donde se ubica LBC (Precipitaciones M) y precipitaciones en la zona de alta montaña de la cuenca, aguas arriba de LBC (Precipitaciones AM). Los valores de SST disminuyeron desde el otoño (55 mg L^{-1}) hacia el invierno (12 mg L^{-1}), mostrando luego su máximo en la primavera (185 mg L^{-1}). El comportamiento de los valores de SST hacia el invierno es opuesto al observado para las precipitaciones y el caudal del río, que incrementaron más de 10 veces su valor en otoño. Sin embargo, en la primavera el caudal presentó su máximo anual, al igual que los SST, mientras que las precipitaciones disminuyeron.

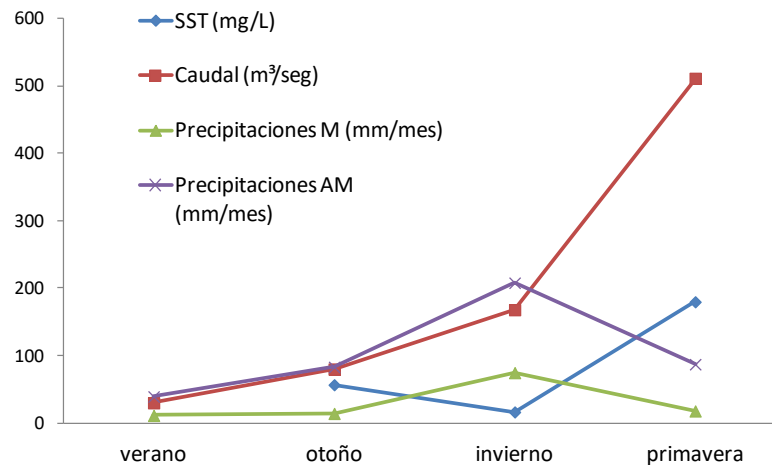


Figura 27: Concentraciones de SST y parámetros hidrometeorológicos de la cuenca del río Neuquén, a lo largo del año 2017.

En la Figura 28 se representan los valores de nutrientes totales y disueltos de LBC, junto con las variables SST y el caudal del río aguas arriba del embalse, en cada estación del año. Se registró un aumento significativo desde el verano a la primavera tanto del PT (26 a $266 \mu\text{g L}^{-1}$) como del NT (144 a $231 \mu\text{g L}^{-1}$) ($p < 0,05$, Tabla 4), de la misma forma que en el caudal del río y la concentración de SST. En este sentido, se observó una relación lineal entre SST y PT a lo largo de las estaciones ($R^2 = 0,98$), mientras que las concentraciones de PRS se mantuvieron en valores menores a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ sin variaciones significativas durante todo el año ($p > 0,05$), independientemente de las variaciones de caudal, SST y PT. Por otro lado, los nutrientes que presentaron mayor concentración en verano, estación de menor caudal, fueron NT ($144 \mu\text{g L}^{-1}$) y N-NH_4^+ ($71 \mu\text{g L}^{-1}$). Las concentraciones de $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ en LBC aumentaron desde valores no detectables ($< 3 \mu\text{g L}^{-1}$) en el período verano-invierno, hasta $30 \mu\text{g L}^{-1}$ en primavera ($p < 0,05$).

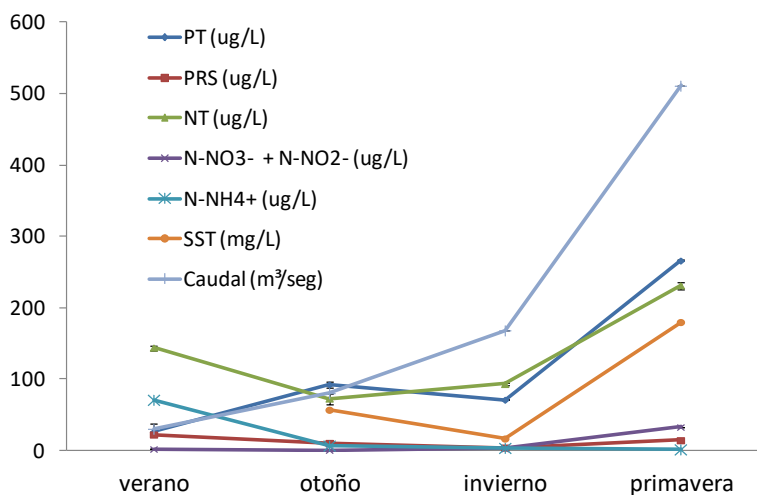


Figura 28: Parámetros fisicoquímicos del río Neuquén aguas arriba del embalse (LBC), a lo largo del año.

Al analizar las concentraciones de nutrientes en el embalse (Tabla 4), se observaron valores de PT decrecientes desde LBC a LB3, siendo estos de 3 a 10 veces superiores en LBC, dependiendo de la estación. Al igual que en LBC, se observó un aumento significativo de este nutriente desde el verano ($11 \mu\text{g L}^{-1}$) a la primavera ($132 \mu\text{g L}^{-1}$) en LB1 ($p < 0,05$), mientras que se mantuvo dentro del mismo orden en LB2: $22 (\pm 11) \mu\text{g L}^{-1}$, y LB3: $28 (\pm 7) \mu\text{g L}^{-1}$, durante todo el año ($p > 0,05$). En el caso del NT, se observó el mismo decrecimiento desde LBC a LB3 registrado para PT, disminuyendo desde $144 \mu\text{g L}^{-1}$ (LBC) a $111 \mu\text{g L}^{-1}$ (LB2) en verano y desde $231 \mu\text{g L}^{-1}$ (LBC) a $120 \mu\text{g L}^{-1}$ (LB3) en primavera ($p < 0,05$). También para NT se registró el máximo anual en primavera, con un promedio para el embalse de $180 (\pm 46) \mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, a diferencia del PT, en otoño se obtuvieron valores de NT menores desde LBC ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) a LB3 ($162 \mu\text{g L}^{-1}$), y en invierno similares en todos los sitios, con un promedio de $94 (\pm 6) \mu\text{g L}^{-1}$.

El PRS no mostró variaciones por sitio ni estacionales ($p > 0,05$), con concentraciones menores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en todos los casos, incluso no detectables ($< 2 \mu\text{g L}^{-1}$) en algunos de ellos (Tabla 4). De la misma forma, las concentraciones de N-NH_4^+ fueron menores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, muchas veces no detectable ($< 5 \mu\text{g L}^{-1}$). Las concentraciones de $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ en el embalse presentaron un valor promedio máximo de $17 (\pm 1) \mu\text{g L}^{-1}$ en la estación de invierno, mayor a lo observado en

verano y otoño ($p < 0,05$), donde variaron entre no detectable ($< 3 \mu\text{g L}^{-1}$) y $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 4: Concentraciones promedio de nutrientes en cada sitio de muestreo, para cada estación del año.

Estación	Nutriente	Sitio			
		LBC	LB1	LB2	LB3
Verano	PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	25,9 \pm 0,1	10,9 \pm 4,0	8,2 \pm 4,1	-
	NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	144 \pm 3,4	117,7 \pm 70,0	110,6 \pm 44,2	-
	PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	22 \pm 2,2	Nd	Nd	-
	N-NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	71 \pm 6,8	7,4 \pm 8,2	11 \pm 5,3	-
	N-NO ₃ ⁻ + N-NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Nd	Nd	Nd	-
Otoño	PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	92,1 \pm 3,9	21,4 \pm 6,6	24,3 \pm 7,3	35,5 \pm 15,5
	NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	73 \pm 8,9	88,2 \pm 5,8	119,7 \pm 28,9	161,9 \pm 59,8
	PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10 \pm 0,1	Nd	3,0 \pm 1,7	8,3 \pm 5,5
	N-NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7 \pm 0,5	Nd	Nd	9 \pm 7,4
	N-NO ₃ ⁻ + N-NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Nd	Nd	7,7 \pm 5,7	Nd
Invierno	PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	70,7 \pm 0,1	19,2 \pm 3,4	20,5 \pm 5,4	23,8 \pm 3,0
	NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	93 \pm 0,2	99,5 \pm 19,0	85,7 \pm 27,2	94,9 \pm 5,5
	PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4 \pm 0,2	3,0 \pm 0,7	4,1 \pm 0,7	Nd
	N-NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3 \pm 0,1	7,1 \pm 1,9	7,7 \pm 2,7	Nd
	N-NO ₃ ⁻ + N-NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Nd	15,3 \pm 0,8	18,0 \pm 2,3	16,6 \pm 1,0
Primavera	PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	265,8 \pm 0,8	131,9 \pm 42,8	34,0 \pm 12,7	23,0 \pm 2,2
	NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	231 \pm 0,1	176,5 \pm 56,7	193,1 \pm 8,6	119,7 \pm 10,3
	PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	14 \pm 0,1	7,4 \pm 3,1	3,7 \pm 1,1	Nd
	N-NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Nd	10,9 \pm 10,3	11,9 \pm 9,4	Nd
	N-NO ₃ ⁻ + N-NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	32 \pm 0,2	14,6 \pm 5,7	5,9 \pm 5,7	3,4 \pm 2,1

Nd: No detectable: PRS (< 2 $\mu\text{g L}^{-1}$), N-NH₄⁺ (< 5 $\mu\text{g L}^{-1}$) y N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻ (< 3 $\mu\text{g L}^{-1}$).

El material extractable en solvente en agua, tanto en LBC como en los sitios del embalse, fue no detectable (< 1 ppm) en todos los casos. Esto indica que los 16 HAPs de referencia fueron no detectables (< 1 ppm).

Clorofila "a"

Las concentraciones de clorofila "a" en los tres sitios del embalse (Figura 29) fueron similares en todas las estaciones, con promedios que mostraron valores 3 veces significativamente superiores en la primavera ($1,9 \text{ mg m}^{-3}$) respecto al verano ($0,6 \text{ mg m}^{-3}$) ($p < 0,05$).

Abundancia algal

En la Figura 29 se representa la abundancia algal promediada de los tres sitios del embalse, con un valor de $1600 (\pm 200) \text{ células mL}^{-1}$ (cél mL^{-1}) en verano, mayor al observado en invierno: $800 (\pm 200) \text{ cél mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), para luego en primavera aumentar hacia valores similares a los observados en verano: $1300 (\pm 200) \text{ cél mL}^{-1}$, sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

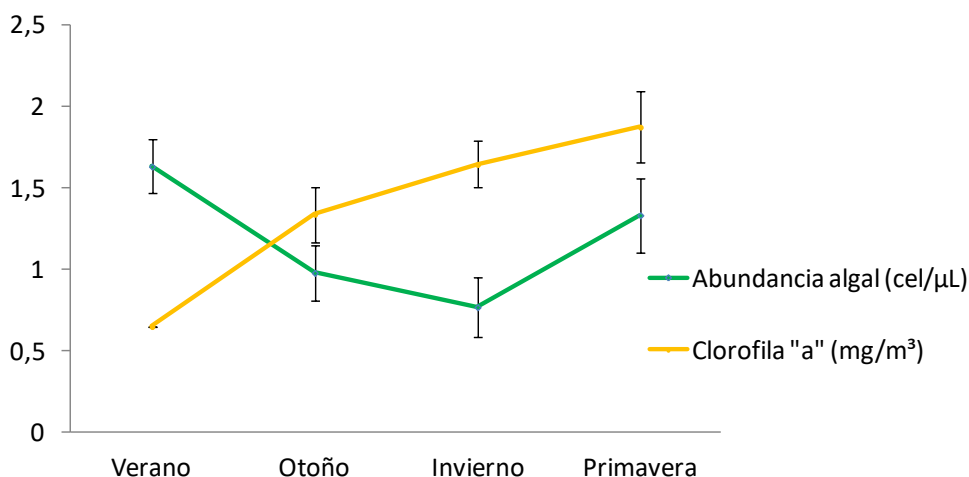


Figura 29: Evolución de la abundancia algal y las concentraciones de clorofila "a" a lo largo del año, como promedio de los tres sitios del embalse.

Diversidad específica

La diversidad específica de los tres sitios del embalse, estimada a través del índice Shanon-Weaver, mostró un comportamiento similar al de las

concentraciones de clorofila “a”, con un valor promedio mínimo de $1,0 \pm 0,2$ en la estación de verano, aumentando hacia otoño y manteniéndose durante las siguientes estaciones en valores de $1,7 \pm 0,1$.

La composición de los grupos algales predominantes en el embalse se muestra en la Figura 30, donde se presentan las 5 clases algales dominantes. En verano, se observó la predominancia de Bacillariophyceae (diatomeas) con un 78 % del total de la abundancia algal, seguidas por clase Cryptophyceae (criptofíceas), con un 17 %, mientras que Cyanophyceae (cianofitas), Chlorophyceae (clorofitas) y Dinophyceae (dinoflagelados) sólo representaron el 3 %, 2 % y 1 %, respectivamente. En las estaciones subsiguientes se observó una disminución en la abundancia de diatomeas, presentando entonces las criptofíceas el mayor porcentaje. En otoño, este porcentaje fue de 57 %, seguido por los de las clorofitas (24 %) y diatomeas (17 %), y sólo con un 2 % y 0,2 las cianofitas y dinoflagelados, respectivamente. En el invierno las criptofitas fueron dominantes (59 %), seguidas por las diatomeas (27 %), y luego por las clorofitas (13 %), mientras que las cianofitas representaron sólo un 1 %. En la primavera se registró un descenso de la abundancia relativa de las criptofitas (50 %) acompañado de un aumento de la de las clorofitas (37 %) y una disminución de las diatomeas (13 %), mientras que las cianofitas representaron sólo un 0,2 % del total de la abundancia.

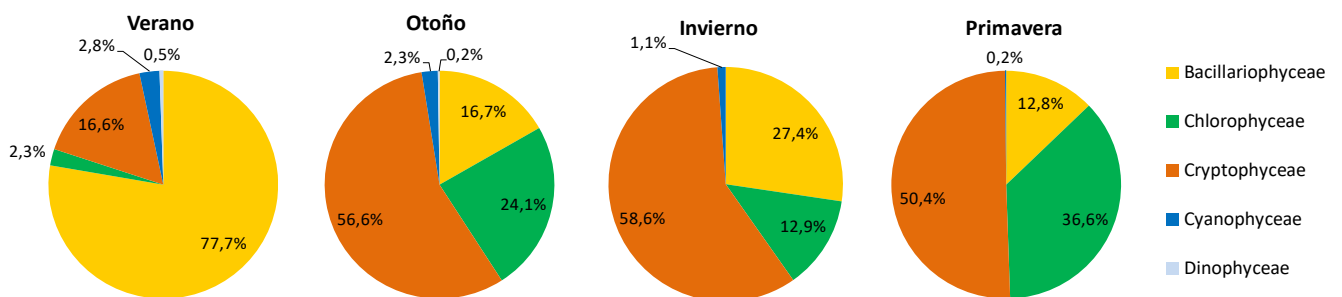


Figura 30: Composición del fitoplancton del embalse, clasificación por grupo algal.

La sucesión estacional del fitoplancton del embalse se muestra en la Figura 31. Las especies más abundantes fueron, en verano: *Cyclotella stelligera* (77 %) y *Plagioselmis lacustris* (17 %); en otoño: *P. lacustris* (57 %), seguida de

Chlamydomonas sp. (23 %) y *C. stelligera* (9 %); en invierno: *P. lacustris* (59 %), seguida de *Monoraphidium* sp., *C. stelligera* y *Aulacoseira granulata* (12 %, 11 % y 10 %, respectivamente); y en primavera: *P. lacustris* (52 %), *Monoraphidium* sp. (36 %) y *A. granulata* (5 %).

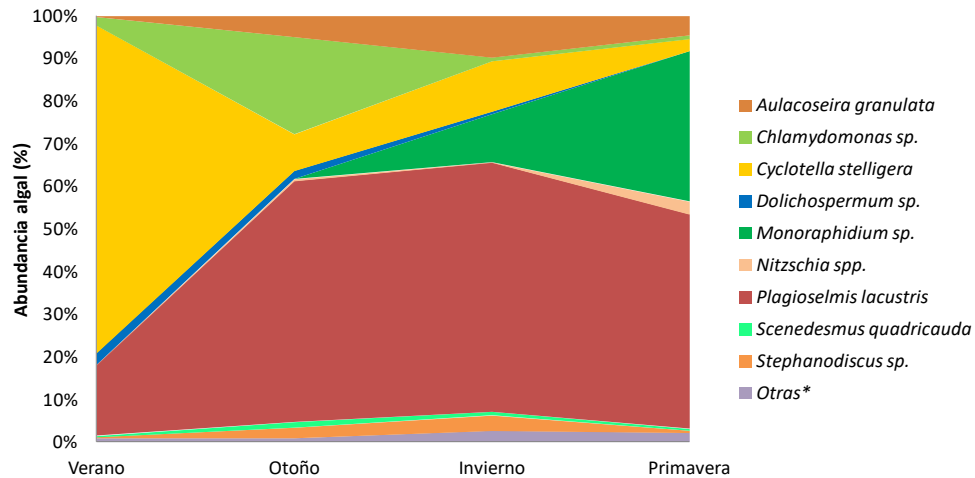


Figura 31: Sucesión estacional de las especies fitoplanctónicas del embalse.

*Otras: *Asterionella* sp., *Ceratium hirundinella*, *Fragilaria crotonensis*, *Gomphonema* sp., *Merismopedia* sp., *Navícula* sp., *Peridinium* sp.

Cálculo de carga de P

La estimación de la carga de P aportada por escorrentía, por el río afluente y por precipitaciones resultó en los siguientes valores:

$$X_e = P_e \times S_C = 0,05 \text{ g P m}^{-2} \text{ año}^{-1} \times 1200 \text{ km}^2 = 60 \text{ ton P año}^{-1}$$

$$X_a = PT_{LBC} \times C_m = 6,22 \cdot 10^{12} \text{ L año}^{-1} \times 113,64 \text{ } \mu\text{g P L}^{-1} = 706,89 \text{ ton P año}^{-1}$$

$$X_p = PT_L \times S_{LB} \times L = 9,3 \text{ } \mu\text{g P L}^{-1} \times 4,58 \text{ L m}^{-3} \times 4,07 \cdot 10^8 \text{ m}^2 = 0,01734 \text{ ton P año}^{-1}$$

La carga total de P fue representada en su mayor parte por el aporte del río Neuquén (~ 92 %), seguido del aporte por escorrentía (~ 8 %) y en último lugar por precipitaciones (0,002 %), obteniéndose:

$$X_T = X_e + X_a + X_p = 766,91 \text{ ton P año}^{-1}$$

Determinación del estado trófico:

Teniendo en cuenta los valores de transparencia (media = 3,3 m; mínima = 0,2 m), concentración media de PT (32 mg m⁻³), concentración de clorofila “a” (media = 1,44 mg m⁻³; máxima = 2,08 mg m⁻³), y concentración de NT (124 mg m⁻³), el embalse se clasifica según los diferentes criterios propuestos de la siguiente forma:

TSI: Media TSI = 43,70 (*Mesotrófico*)

OECD (utilizando la concentración de clorofila “a”): *Oligotrófico*

OECD (utilizando la concentración de PT y la transparencia del agua): *Mesotrófico*.

Mediante extrapolación en los gráficos de distribución de probabilidades de la OECD, se obtuvieron valores de 0,90 para mesotrófico, 0,85 para oligotrófico y 0,08 para hipertrófico.

5.3.2. Agua intersticial

Mediciones in situ

En la Figura 32 se muestran la conductividad eléctrica del agua intersticial para el sitio LBC (LBC-I) en invierno y primavera, y para los sitios del embalse (LB1-I, LB2-I y LB3-I) en otoño, invierno y primavera. El sitio del río (LBC) mostró valores menores a los correspondientes a los sitios del embalse, en invierno y primavera ($p < 0,05$). Entre los sitios del embalse, se observaron mayores conductividades para el sitio LB1: 702 ($\pm 260 \mu\text{S cm}^{-1}$), en comparación con LB2: 458 ($\pm 42 \mu\text{S cm}^{-1}$) y LB3: 299 ($\pm 5 \mu\text{S cm}^{-1}$) ($p < 0,05$). Asimismo, se registró un descenso desde el otoño hacia la primavera en LB1 (955 a 434 $\mu\text{S cm}^{-1}$) y LB2 (486 a 409 $\mu\text{S cm}^{-1}$) ($p < 0,05$), mientras que no existieron variaciones estacionales en LB3 ($p > 0,05$).

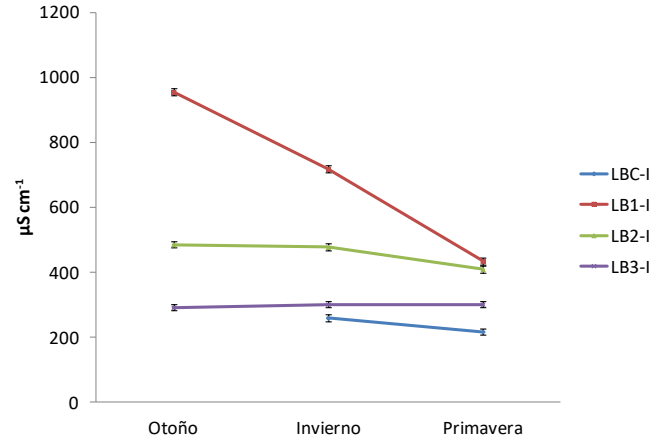


Figura 33: Conductividad eléctrica del agua intersticial en los diferentes sitios de muestreo, para cada estación del año.

Los valores de pH en el agua intersticial, tanto de LBC como de los sitios del embalse, no mostraron variaciones estacionales, con un valor promedio de $7,2 \pm 0,4$, menor al obtenido para la columna de agua ($8,1 \pm 0,3$).

Análisis de laboratorio

Las concentraciones de nutrientes totales y disueltos en las muestras de agua intersticial de muestran en la Tabla 5. Se observó que el PT fue, en todas las estaciones, mayor en el sitio LB3: $2337 (\pm 281) \mu\text{g L}^{-1}$, en comparación con el resto de los sitios de muestreo: $685 (\pm 281) \mu\text{g L}^{-1}$, en promedio entre otoño-primavera ($p < 0,05$). Asimismo, el PRS mostró la misma variación, con un valor de $2005 (\pm 327) \mu\text{g L}^{-1}$ en LB3, y $536 (\pm 268) \mu\text{g L}^{-1}$ para el promedio del resto de los sitios ($p < 0,05$). No se registraron diferencias significativas entre sitios o estaciones para el resto de los nutrientes analizados ($p > 0,05$). Por otro lado, las concentraciones de los nutrientes fueron entre uno y tres órdenes de magnitud superiores a los de la columna de agua, con valores para agua intersticial y columna de agua, respectivamente, de: PT (1072 y $54 \mu\text{g L}^{-1}$); NT (4622 y $127 \mu\text{g L}^{-1}$); PRS (851 y $6 \mu\text{g L}^{-1}$); N-NH_4^+ (1877 y $10 \mu\text{g L}^{-1}$); $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ (91 y $9 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 5: Concentración de nutrientes en agua intersticial para cada sitio de muestreo, para cada estación del año.

Estación	Nutriente	Sitio			
		LBC	LB1	LB2	LB3
Verano	PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	610,5 \pm 21,6	824,1 \pm 64,7	-
	NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	3488,4 \pm 322,4	3049,8 \pm 216,2	-
	PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	486,1 \pm 10,74	789,9 \pm 10,74	-
	N-NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	3129,3 \pm 397,2	2246,7 \pm 113,5	-
	N-NO ₃ ⁻ + N-NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	118,3 \pm 11,2	181,4 \pm 11,2	-
Otoño	PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	526,9 \pm 4,4	514,5 \pm 21,8	835 \pm 4,4	2233,8 \pm 56,6
	NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6649,3 \pm 411,6	3985,1 \pm 126,6	6000 \pm 379,9	6514,9 \pm 286,5
	PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	194,3 \pm 11,4	323,8 \pm 11,5	712,3 \pm 11,4	1845,4 \pm 11,4
	N-NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	559,7 \pm 51,1	3267,7 \pm 1,0	1787,3 \pm 51,1	1011 \pm 25,5
	N-NO ₃ ⁻ + N-NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	16,3 \pm 1,0	34,7 \pm 2,9	22,5 \pm 2,9	98 \pm 5,8
Invierno	PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	200,8 \pm 1,0	676,9 \pm 1,0	1095,7 \pm 1,0	2122,6 \pm 1,0
	NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2580,6 \pm 182,5	3741,9 \pm 182,5	3290,3 \pm 212,9	3978,5 \pm 152,1
	PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	100,6 \pm 1,0	472,1 \pm 1,0	944,2 \pm 10,9	1787,8 \pm 21,9
	N-NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1027,1 \pm 28,5	2819,5 \pm 57,0	2316 \pm 28,5	1852,8 \pm 57,0
	N-NO ₃ ⁻ + N-NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	47,8 \pm 1,0	152,9 \pm 13,5	124,3 \pm 1,0	143,4 \pm 1,0
Primavera	PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	582,2 \pm 60,2	681,6 \pm 40,2	951,4 \pm 100,4	2655,4 \pm 20,1
	NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3376,6 \pm 1,0	5090,9 \pm 220,4	6103,9 \pm 847,0	5610,4 \pm 587,7
	PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	534,2 \pm 43,2	496 \pm 10,8	551,0 \pm 32,4	2380,8 \pm 64,7
	N-NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	636,9 \pm 28,1	1273,7 \pm 28,1	2507,6 \pm 1,0	1850,8 \pm 28,1
	N-NO ₃ ⁻ + N-NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	43,9 \pm 2,5	52,7 \pm 1,0	43,9 \pm 2,5	195,0 \pm 7,5

5.3.3. Sedimentos

Mediciones in situ

Los resultados de ORP se muestran en la Figura 32. En este caso, todos los sitios mostraron un comportamiento similar, con un ascenso significativo desde los potenciales negativos de verano: $-175 (\pm 74)$ mV; a los positivos de invierno: $+204 (\pm 94)$ mV; y un descenso en primavera ($p < 0,05$). En esta última estación, en el sitio LBC y LB1 estos valores fueron positivos: $+90 (\pm 5)$ mV; mientras que en los sitios LB2 y LB3 los fueron negativos: $-80 (\pm 10)$ mV.

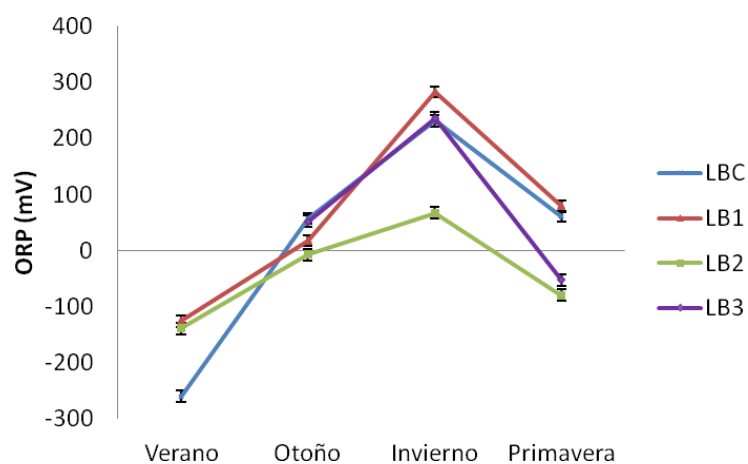


Figura 32: ORP para cada sitio de muestreo de sedimentos, a lo largo del año.

El pH del embalse, en promedio para todos los sitios fue de $7,0 \pm 0,1$, sin variaciones estacionales. Por otro lado, los sedimentos del sitio LBC presentaron un aumento del pH hacia invierno y primavera, desde de $6,9 \pm 0,1$ a $7,6 \pm 0,1$ (Figura 33).

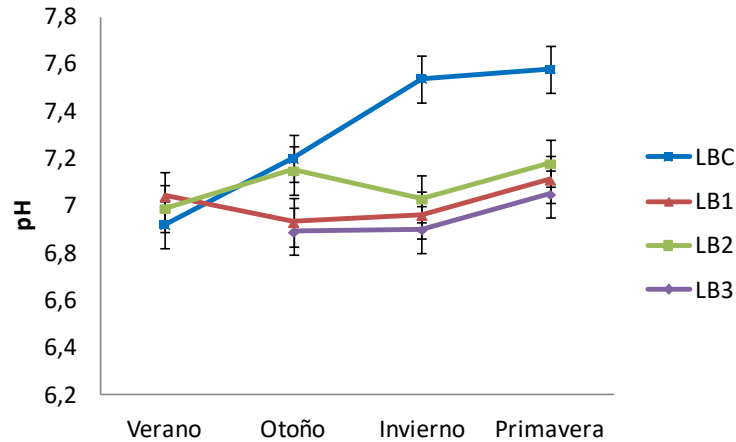


Figura 33: pH de los sedimentos del río (LBC) y embalse (LB1-LB3), para cada estación del año.

Análisis de laboratorio

El porcentaje de humedad de los sedimentos no presentó variaciones estacionales para ningún sitio, obteniéndose un promedio anual para el sitio LBC de 31 (± 5) % y para los sitios del embalse de 52 (± 5) %. Asimismo, al comparar entre los tres sitios del embalse, el porcentaje de humedad fue menor en el sitio LB1: 45 (± 1) %; respecto de los sitios LB2 y LB3: 55 (± 3) %.

En la Tabla 6 se presentan la composición granulométrica porcentual de los sedimentos del río y los tres sitios del embalse. En general, los sedimentos estuvieron dominados por la fracción arena (> 99 %), sin variaciones estacionales. En fracción de arena fue dominante (84 %) la arena muy fina en LBC. En los sedimentos del embalse presentó menores proporciones (50 % en LB1; 26 % en LB2 y 35 % en LB3), con un 19 (± 2) % de arena gruesa, 19 (± 4) % de arena media, y 24 (± 7) % de arena fina. Para todos los sitios muestreados se obtuvieron porcentajes de limo de 0,015 ($\pm 0,006$) % y 0,6 ($\pm 0,03$) % de arcilla.

Tabla 6: Textura de los sedimentos del río (LBC) y embalse (LB1-LB3), promedio anual.

	% Arena Gruesa (> 2 mm)	% Arena Media (2 - 1 mm)	% Arena Fina (1 - 0,25 mm)	% Arena muy fina (0,25 - 0,05 mm)	% Limo (0,05 - 0,002 mm)	% Arcilla (< 0,002 mm)
LBC	1,52	3,34	10,34	84,25	0,02	0,53
LB1	18,45	14,96	16,17	49,87	0,02	0,54
LB2	21,66	22,22	29,61	25,94	0,01	0,55
LB3	17,52	19,41	27,46	35,00	0,01	0,60

La Figura 34 muestra las concentraciones de PT en sedimentos del río y del embalse a lo largo del año. En todos los casos se alcanzaron las mayores

concentraciones hacia la primavera, con valores cercanos a los $1000 \mu\text{g P g}^{-1}_{\text{ss}}$. Por otro lado, se observó un comportamiento estacional similar entre los sitios LBC y LB1, con una disminución significativa en el invierno ($p < 0,05$). Asimismo, el sitio LB1 presentó la concentración más alta en primavera: $922 (\pm 145) \mu\text{g P g}^{-1}_{\text{ss}}$, en comparación con los otros sitios del embalse ($p < 0,05$).

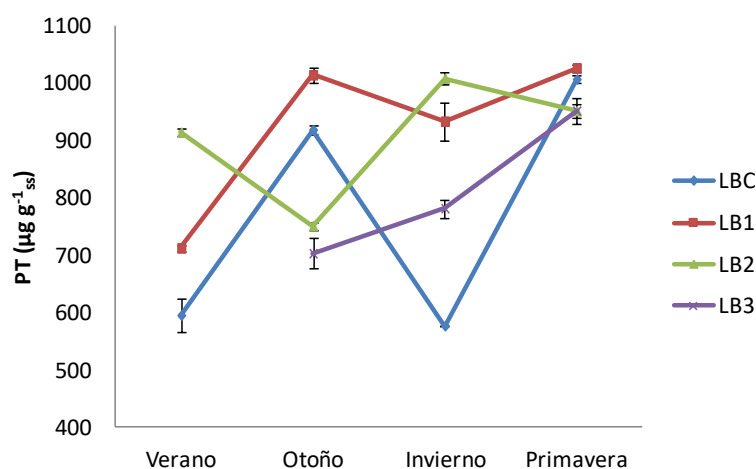


Figura 34: Concentraciones de PT en sedimentos de los distintos sitios, a lo largo del año.

Los porcentajes de CT y NT en los sedimentos se representan en la Figura 35 para las estaciones verano-invierno. El NT osciló entre 0,01 y 0,1 %, mientras que el CT varió entre 0,2 y 1,3 %. Los porcentajes en LBC y LB1 mostraron la misma variación estacional para ambos parámetros, con valores máximos en la estación de otoño.

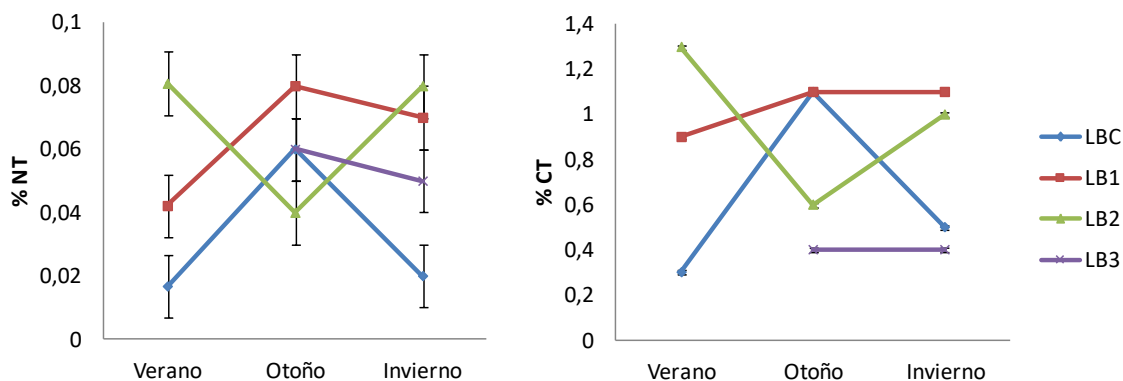


Figura 35: Porcentajes de NT y CT en sedimentos de los diferentes sitios, y su variación estacional.

El fraccionamiento del fósforo en los sedimentos de los sitios del río y del embalse (Figura 36) mostró una predominancia de compuestos ligados al calcio (P-Ca) en todas las estaciones, con un promedio de $62 (\pm 13) \%$, seguidos por los compuestos ligados a la fracción orgánica de los sedimentos (P-orgánico), con un promedio de $31 (\pm 12) \%$. La fracción ligada a oxihidróxidos de hierro y aluminio (P-Fe/Al) representó, en todos los casos, entre un 5 y 10 %, y la fracción de fósforo lábil porcentajes menores al $< 1\%$.

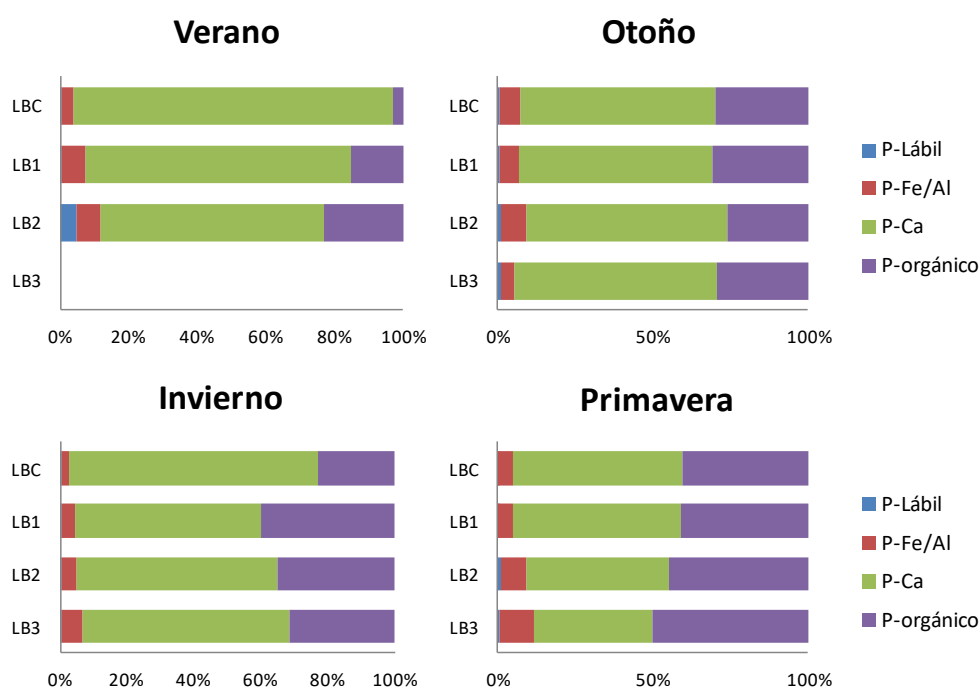


Figura 36: Fraccionamiento del fósforo por estación, para cada sitio.

La composición mineral de los sedimentos del embalse, expresada como porcentaje relativo de óxido de cada elemento, se representa en la Tabla 7. No se registraron variaciones estacionales, así como tampoco entre los sitios muestreados. Se observó una predominancia de SiO_2 : $55 (\pm 2) \%$; seguido de Al_2O_3 : $18 (\pm 0,3) \%$; Fe_2O_3 : $8,1 (\pm 0,7) \%$; y CaO : $7 (\pm 2) \%$; en promedio anual de todos los sitios.

Tabla 7: Composición mineral de los sedimentos, expresada como porcentajes relativos de los óxidos de cada mineral, promedio anual para cada sitio del embalse.

	LB1	LB2	LB3
SiO ₂	53 ± 6	56 ± 2	57 ± 2
Al ₂ O ₃	18,2 ± 0,4	18 ± 2	18,3 ± 0,3
Fe ₂ O ₃	8,9 ± 1,0	7,7 ± 1,1	7,8 ± 1,5
CaO	8,4 ± 5,3	6,9 ± 4,5	5,3 ± 1,0
K ₂ O	3,1 ± 0,3	2,9 ± 0,6	2,7 ± 1,0
MgO	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,2	3,5 ± 1,2
Na ₂ O	2,3 ± 0,5	2,8 ± 0,6	2,7 ± 0,7
F ₂ O	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,4	1,5 ± 0,5
TiO ₂	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,4
SO ₃	0,6 ± 1,2	0,1 ± 0,2	-
P ₂ O ₅	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Cl ₂ O	0,1 ± 0,2	-	-

La Figura 37 muestra los valores de CIC de los sedimentos de cada sitio en las estaciones de verano y otoño. Se observan valores mayores, en el promedio anual, en los sitios del embalse: 2,9 (± 0,4) meq Kg⁻¹_{ss}, respecto al sitio LBC: 1,6 (± 0,9) meq Kg⁻¹_{ss}. Asimismo, no se observó variación entre estas dos estaciones en los sitios del embalse.

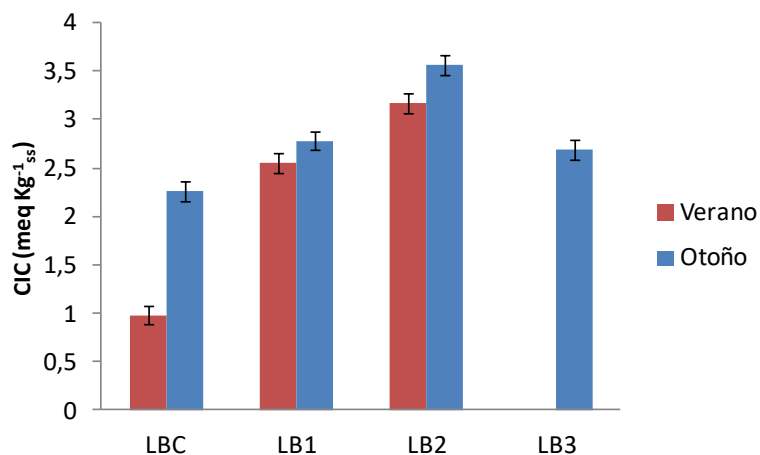


Figura 37: Valores de capacidad de intercambio catiónico (CIC) para cada sitio, en verano y otoño.

En la Tabla 8 se muestran las concentraciones de material extractable en solventes, encontradas en los tiempos de retención (TR) de los respectivos PAHs. Se detectó MES en los TR de los HAPs analizados en al menos uno de los sitios

de muestreo coincidentes con el TR del benzo(a)antraceno (BaA), fenantreno (Fen), acenafteno (Ace), criseno, pireno y fluoreno. La señal obtenida en el análisis por CG-FID para el tiempo de retención del BaA fue la predominante en casi la totalidad de las muestras analizadas, con su cota máxima en el sitio LB2 en otoño ($79 \pm 20 \text{ ppm}_{\text{ss}}$). El MES correspondiente al TR del Fen se identificó en LBC, LB2 y LB3, aunque en todos estos casos los valores determinados estuvieron por debajo del límite de cuantificación de la técnica ($10 \text{ ppm}_{\text{ss}}$). Esto mismo se observó para el MES correspondiente al TR de los otros HAPs analizados, los cuales presentaron valores no cuantificables en alguno de los sitios analizados, siendo las muestras del sitio LB2 las que presentaron las señales de todos los HAPs mencionados.

Tabla 8: Material extractable en solvente (ppm_{ss}) determinado en los TR de los HAPs de referencia en sedimentos para cada sitio de muestreo y estación, expresadas en ppm_{ss} ± ds. nd = no detectable (< 1 ppm_{ss}).

TR de referencia	Verano			Otoño				Invierno				Primavera			
	LBC	LB1	LB2	LBC	LB1	LB2	LB3	LBC	LB1	LB2	LB3	LBC	LB1	LB2	LB3
Naftaleno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acenafteno	nd	nd	nd	12 ± 9	< 10	nd	< 10	< 10	nd	< 10	< 10	< 10	nd	nd	< 10
Acenaftileno	nd	nd	nd	nd	nd	nc	nd	nd	nd	nc	nd	nd	nd	nd	nd
Fluoreno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fenantreno	nd	nd	nd	14 ± 12	< 10	< 10	16 ± 7	< 10	nd	nd	nd	< 10	nd	< 10	< 10
Antraceno	nd	nd	nd	< 10	nd	< 10	< 10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fluoranteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pireno	nd	nd	nd	< 10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	< 10	nd
Benzo(a) antraceno	12 ± 9	28 ± 6	24 ± 4	nc	32 ± 12	79 ± 20	nd	23 ± 10	23 ± 8	25 ± 12	23 ± 12	32 ± 17	33 ± 13	27 ± 16	15 ± 8
Criseno	nd	nd	< 10	nd	nd	nd	24 ± 11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(b) fluoranteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(k) fluoranteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(a) pireno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(g,h,i) perileno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dibenzo(a,h) antraceno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Indeno(1,2,3,c,d) pireno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	< 10

5.3.4. Suelos

Mediciones in situ

Los valores de ORP de los suelos circundantes al río y al embalse, se muestran en la Figura 38. Todos los sitios mostraron un comportamiento similar, con un descenso significativo desde verano: $+90 (\pm 23)$ mV; hacia otoño: $+35 (\pm 23)$ mV; un incremento durante invierno: $+143 (\pm 21)$ mV, y un descenso en primavera: $+54 (\pm 10)$ mV.

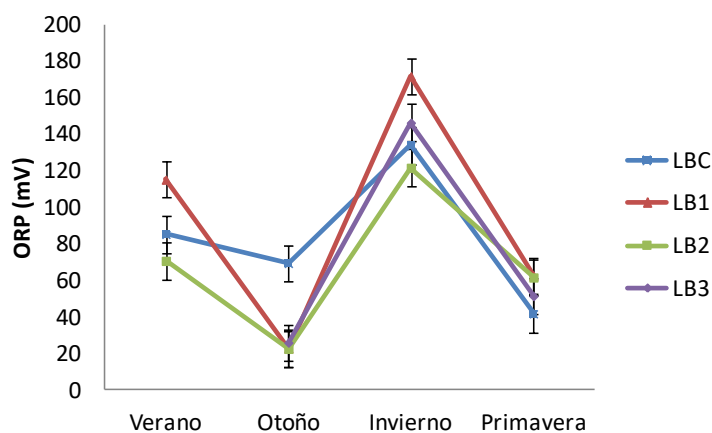


Figura 38: ORP para cada sitio de muestreo de suelos, a lo largo del transcurso del año.

El pH de los suelos presentó un promedio anual de $8,2 \pm 0,4$, teniendo en cuenta los valores de todos los sitios y estaciones.

Análisis de laboratorio

El porcentaje de humedad de los suelos fue, en todos los casos, menor a 10 %, y tuvo una variación estacional similar en todos los sitios (Figura 39), con valores medios que aumentaron desde el verano: $2 (\pm 1)$ % al invierno: $7 (\pm 3)$ %.

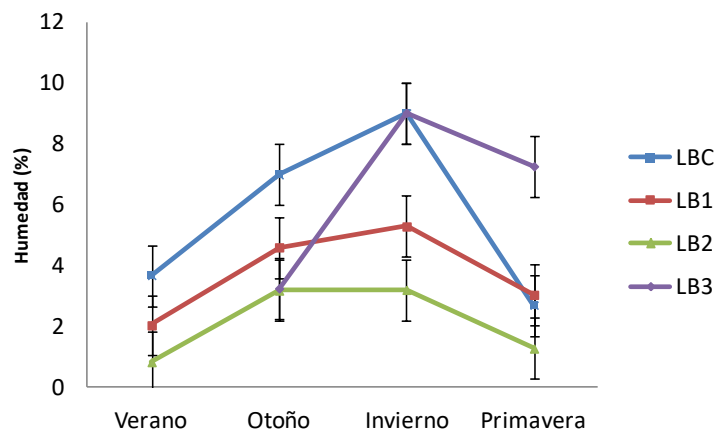


Figura 39: Porcentaje de humedad de los diferentes sitios en cada estación del año.

En la Tabla 9 se presentan los valores porcentuales de la composición granulométrica de los suelos circundantes al río y a los tres sitios del embalse. En general, estuvieron dominados por la fracción arena (> 99 %), sin variaciones estacionales. La fracción arena, a su vez, mostró porcentajes predominantes de 51 (± 14) % de arena muy fina, y 32 (± 10) % de arena fina. Para todos los sitios muestreados se obtuvieron porcentajes de limo de 0,065 ($\pm 0,002$) % y 0,5 ($\pm 0,03$) % de arcilla.

Tabla 9: Textura de los suelos circundantes del río y embalse, promedio anual.

	% Arena Gruesa (> 2 mm)	% Arena Media (2 - 1 mm)	% Arena Fina (1 - 0,25 mm)	% Arena muy fina (0,25 - 0,05 mm)	% Limo (0,05 - 0,002 mm)	% Arcilla (< 0,002 mm)
LBC	9,147	12,387	43,687	34,293	0,008	0,477
LB1	9,026	7,955	25,293	57,206	0,009	0,511
LB2	1,164	13,787	38,519	46,060	0,005	0,466
LB3	5,910	4,644	21,425	67,489	0,004	0,528

Las concentraciones promedio anuales de PT en suelos variaron desde 363 (± 46) $\mu\text{g P g}^{-1}_{\text{ss}}$ en el sitio LB3, a 573 (± 30) $\mu\text{g P g}^{-1}_{\text{ss}}$ en el sitio LB1, con un aumento promedio, para todos los sitios, del 12 (± 6) % entre verano-otoño y primavera (Figura 40).

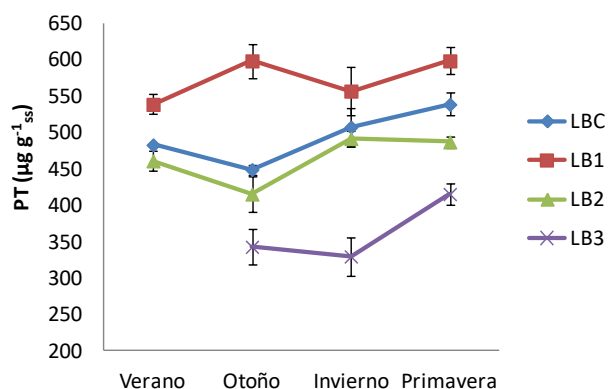


Figura 40: Concentraciones estacionales de PT en suelos.

Los porcentajes de NT y CT no presentaron variaciones estacionales, con promedios para todos los sitios de 0,020 (\pm 0,008) % y 0,6 (\pm 0,3) %, respectivamente.

El fraccionamiento del fósforo en los suelos circundantes a los sitios del río y del embalse (Figura 41) mostró una predominancia de compuestos ligados al calcio (P-Ca) en todas las estaciones, con un promedio de 72 (\pm 12) %, seguidos por los compuestos ligados a la fracción orgánica de los sedimentos (P-orgánico), con un promedio de 21 (\pm 12) %. La fracción de fósforo lábil representó entre 3 y 7 % del PT, y la fracción ligada a oxihidróxidos de hierro y aluminio (P-Fe/Al), en todos los casos, entre un 1 y 5 % del PT.

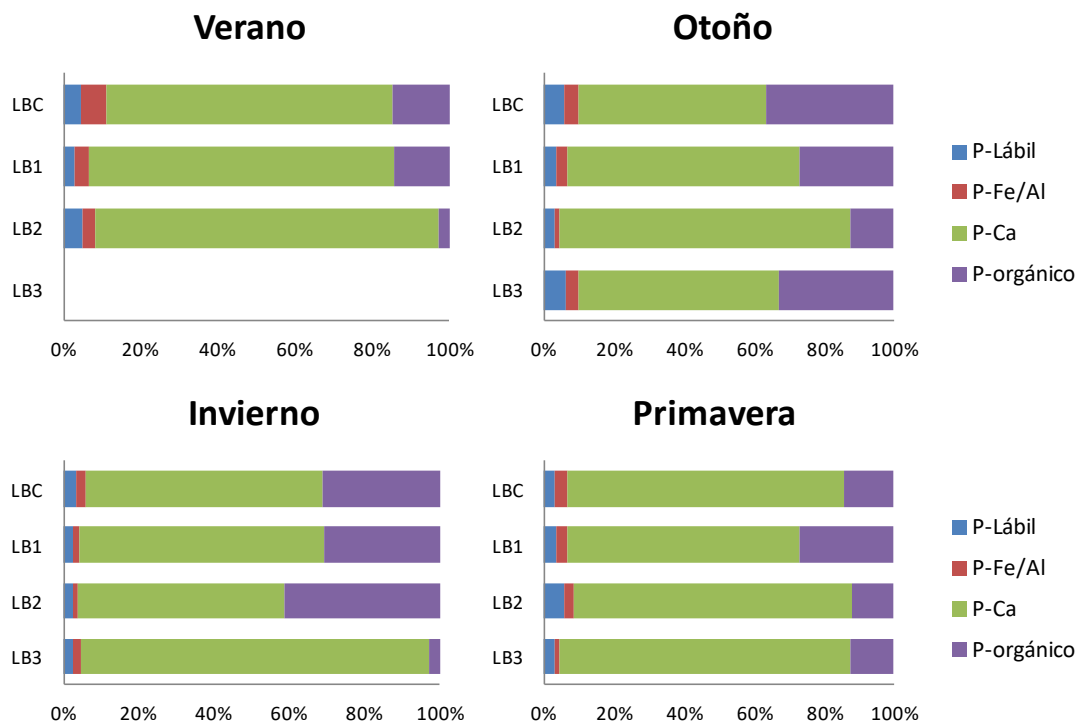


Figura 41: Fracciones de fósforo para cada suelo muestreado, a lo largo del año.

Los valores de CIC de los suelos analizados se muestran en la Figura 42. Se observaron valores de entre 1 meq Kg^{-1} (LB2 y LB3) y 3 meq Kg^{-1} (LBC). Estos valores no presentaron variaciones entre verano y otoño, a excepción de LBC, que presentó un incremento del 20 % respecto de los sitios LB1, LB2 y LB3 ($p < 0,05$).

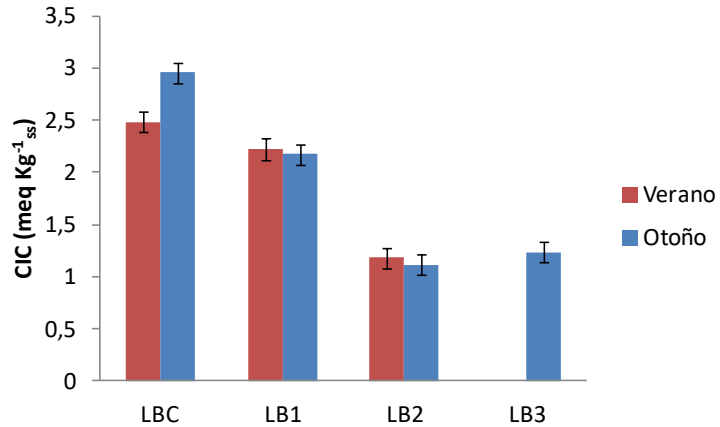


Figura 42: Capacidad de intercambio catiónico (CIC) de los suelos analizados, en verano y otoño.

En la Tabla 10 se muestran las concentraciones de material extractable en solventes (MES), encontradas en los tiempos de retención (TR) de los respectivos HAPs. Las concentraciones de MES correspondientes a los TR del BaA, Ace y Fen se observaron en las muestras de al menos uno de los sitios. Las concentraciones de MES al TR del BaA se detectó en todas las estaciones del año, en todos los sitios, con una cota máxima de 29 (± 11) ppm_{ss}. El MES correspondiente al TR del Ace se identificó en todos los sitios, con valores inferiores al límite de cuantificación de la técnica (10 ppm_{ss}), mientras que el MES correspondiente al TR del Fen presentó valores < 10 ppm_{ss} en los sitios LB1 y LB2, y no detectables en LBC y LB3.

Tabla 10: Material extractable en solvente (ppm_{ss}) determinado en los TR de los HAPs de referencia en suelos para cada sitio de muestreo y estación, expresadas en ppm_{ss} ± ds. nd = no detectable (< 1 ppm_{ss}).

TR de referencia	Verano			Otoño				Invierno				Primavera			
	LBC	LB1	LB2	LBC	LB1	LB2	LB3	LBC	LB1	LB2	LB3	LBC	LB1	LB2	LB3
Naftaleno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acenafteno	nd	<	<	<	nd	nd	<	<	<	<10	<10	<	<	<	<
Acenaftileno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fluoreno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fenantreno	nd	< 10	nd	< 10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Antraceno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fluoranteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pireno	nd	nd	nd	nc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(a)antraceno	15 ± 4	21 ± 3	29 ± 11	17 ± 3	25 ± 9	14 ± 11	19 ± 11	29 ± 11	18 ± 9	19 ± 9	19 ± 10	22 ± 14	27 ± 12	20 ± 11	25 ± 5
Criseno	< 10	nd	< 10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(b)fluoranteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(k)fluoranteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(a)pireno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(g,h,i)perileno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Indeno(1,2,3,c,d)pireno	nd	nd	nd	< 10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

5.4. Discusión

Teniendo en cuenta los rangos de temperaturas anuales, el embalse Los Barreales, es un cuerpo de agua templado. Los perfiles verticales de la columna de agua sugieren un período de estratificación térmica al año, que comienza en la primavera y se acetúa en el verano. En la primavera, los sitios de la cola y zona de transición del embalse presentan una termoclina a aproximadamente 15 m, mientras que en el sitio del muro la temperatura en el perfil de primavera disminuye a 30 m. Esto puede deberse a la presencia de una termoclina inclinada (Kittrell, 1965; Hurley, 1977; Okely y Imberger, 2007), producto de la acción de los fuertes vientos registrados en esta estación (AIC, 2018). Asimismo, los datos de verano mostraron una termoclina más profunda para el centro del embalse (> 18 m). Teniendo en cuenta estos resultados, el embalse se puede clasificar, desde el punto de vista térmico, como un cuerpo de agua templado monomíctico (Wetzel, 2001).

La columna de agua del embalse presenta un pH alcalino, y una conductividad elevada ($170 - 280 \mu\text{S cm}^{-1}$) en comparación a la mayoría de ambientes acuáticos de Patagonia Norte ($22,7 - 104 \mu\text{S cm}^{-1}$) (Pedrozo *et al.*, 1993; Diaz *et al.*, 2007). Estas propiedades fisicoquímicas del agua son características del río Neuquén, principal afluente del embalse, que tiene altas concentraciones salinas, de yeso y calcáreas, derivadas de la roca parental (Leanza *et al.*, 2001; Zanettini *et al.*, 2001). La sedimentación de los sólidos presentes en el río Neuquén, una vez ingresado al embalse, resulta en un marcado descenso de la conductividad del agua. Sin embargo, hacia la primavera, los valores de conductividad del agua del río descienden a valores inferiores a los del agua del embalse. Esta inversión en la relación de las conductividades eléctricas en el agua del río y el embalse podría deberse a un efecto de dilución del agua del río, producida por el aumento del caudal en los meses de deshielo en la parte superior de la cuenca, teniendo en cuenta que el caudal del río presentó un máximo en esta estación del año (AIC, 2018) y en coincidencia con lo observado por Cameron *et al.* (1996) y Olias *et al.* (2004). El aumento de caudal

en primavera también afectó a la conductividad, que disminuyó en la superficie de los sitios de la cola y en la zona de transición del embalse, en comparación con el fondo y el muro del embalse.

La influencia de la sedimentación de los sólidos aportados por el río al entrar al embalse se reflejó en la transparencia de la columna de agua en las diferentes estaciones del año, que aumentó en el eje longitudinal del embalse, desde la cola hacia el muro. Por otro lado, se observó una disminución de la transparencia desde el verano a la primavera, en relación con el aumento de caudal y de los sólidos en suspensión presentes en el río Neuquén. Estos resultados apoyan la idea de una sedimentación progresiva de los sólidos que ingresan al embalse, tal como lo propone Thornton (1990), y como observaron, por ejemplo, Gilvear y Petts (1985) en el embalse Llyn Celyn de Gales, ó Teodoru y Wehrli (2005) en el embalse Iron Gate I, ubicado en la frontera Rumania-Serbia.

Respecto a la variación de los parámetros hidrometeorológicos del río Neuquén en relación con los nutrientes totales, se pueden distinguir dos fases anuales diferenciadas: a) Un aumento de caudal en otoño e invierno respecto al verano, debido al incremento de las precipitaciones en la cuenca de alta montaña en ambas estaciones y en invierno en el monte, se refleja en un descenso de la concentración de sólidos en suspensión del río, tal como observaron Gilvear y Petts (1985); b) Un mayor aumento de caudal hacia la primavera, producto del deshielo en alta montaña (AIC, 2018), trae aparejado un aumento de los sólidos en suspensión hasta su máximo anual. El aporte de nutrientes al embalse por parte del río Neuquén ocurre principalmente en la primavera, hecho que también se ve reflejado en los sitios de la cola y zona de transición del embalse. Esta variación estacional en las concentraciones de NT y PT se relaciona con el aumento del caudal del río y la concentración de SST, de la misma forma que observaron, por ejemplo, Rattan *et al.* (2017) en el Red River, Canadá. Asimismo, el cálculo de la carga de P recibida por el embalse refleja la importancia del aporte del río Neuquén, siendo la principal fuente de P. En comparación a otros ambientes de Patagonia Norte, la carga de P anual del embalse Los Barreales (767 ton P año⁻¹) tuvo un valor mayor a lo estimado por Temporetti *et al.* (2001) para el embalse

Alicura, sobre el río Limay (147 ton P año⁻¹), y menor a lo calculado por Echaniz y Vignatti (2009) para el embalse Casa de Piedra, sobre el río Colorado (5331 ton P año⁻¹).

La abundancia de los grupos algales mostró una predominancia de diatomeas (Bacillariophyceae) en la estación de verano, representadas mayormente por *Cyclotella stelligera*, seguidas en abundancia por las criptofitas (Cryptophyceae), representadas en su totalidad por *P. lacustris*. Esta estación presentó la mayor temperatura del agua anual, con 21 °C en el epilimnion, cuya profundidad (~ 18 m) fue similar al límite de la zona fótica (~ 15 m). Este valor representó el máximo anual de transparencia de la columna de agua, lo cual, sumado a una alta incidencia de radiación solar (8,72 KW h⁻¹ m⁻²: <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>) respecto al resto del año, podría resultar en condiciones inhibitorias de la producción primaria, reflejadas en la disminución de las concentraciones de la clorofila "a" (Döhler, 1984; Gerber y Häder, 1995). Asimismo, esta inhibición de la producción primaria en verano podría estar también influenciada por los mínimos en las concentraciones de PT y NT en esta estación, con valores de 10 y 115 µg L⁻¹, respectivamente, y concentraciones de PRS y DIN no detectable y de 16 µg L⁻¹, respectivamente. En otoño e invierno, se observó un descenso de la temperatura de la columna de agua (15 °C en otoño y 10 °C en invierno), y una mezcla total. La transparencia del agua también disminuyó, con valores promedio del disco de Secchi de 4,5 m (límite zona fótica ~ 11 m). Las concentraciones de PT aumentaron (24 µg L⁻¹), mientras que las de NT, PRS y DIN presentaron valores similares al verano (NT: 95-123 µg L⁻¹; PRS: nd-4 µg L⁻¹; y DIN: 6-16 µg L⁻¹). La incidencia lumínica alcanza su mínimo en el invierno (1,81 KW h⁻¹ m⁻²: <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>). En estas estaciones la abundancia de las diatomeas disminuyó, reflejándose en una caída de la abundancia total y dando lugar a un incremento de la abundancia relativa y diversidad de especies de otros grupos, principalmente clorofitas (Chlorophyceae). Este último grupo estuvo representado principalmente por *Monoraphidium* sp. y *Chlamydomonas* sp. y, en menor proporción, por *Scenedesmus quadricauda*.

Finalmente, hacia la primavera se observó nuevamente una estratificación de la columna de agua (termoclina 14-30 m), con un incremento de la temperatura en el epilimnion (~ 15 °C), y la menor transparencia registrada en el año (límite zona fótica ~ 3 m). Las concentraciones de PT (63 µg L⁻¹) y NT (163 µg L⁻¹) mostraron su máximo anual, y el PRS y DIN fueron de 5 y 15 µg L⁻¹, respectivamente. Esto resultó en un aumento de la abundancia algal y de las concentraciones de clorofila “a”, manteniéndose la composición de especies similar al invierno. Las bajas concentraciones de PRS y DIN originan relaciones N/P bajas, que restringen el desarrollo masivo de cianofitas. Similares resultados fueron encontrados en otros ambientes de la región con relaciones N/P bajas (Diaz *et al.*, 2007). Los valores máximos de clorofila “a” observados en invierno-primavera coinciden con lo observado en el embalse Los Barreales por Labollita y Pedrozo (1998), quienes propusieron que esto se asocia a una mayor biodisponibilidad del TP.

La concentración media anual de clorofila “a” (1,44 mg m⁻³) resultó menor a la estimada a partir de la ecuación propuesta por Quirós (1988) para ambientes Patagónicos (5,87 mg m⁻³). En este sentido, Quirós advirtió que la ecuación no se ajusta a ambientes con menor disponibilidad de luz debido a altas cargas de sólidos en suspensión (Pedrozo F.L., com. pers.). Estos resultados, así como los criterios de predicción trófica empleados, confirman lo observado por Labollita y Pedrozo (1998), quienes propusieron que la alta carga de sólidos en suspensión recibidos por el embalse Los Barreales limita en primera instancia su producción primaria debido a una limitación lumínica, y determina su clasificación trófica a partir de las concentraciones de PT derivadas de este aporte.

El embalse presenta características de baja productividad, propias de un sistema oligotrófico, como se puede observar a partir de la alta saturación de oxígeno, las concentraciones de clorofila “a” y de las fracciones disueltas de los nutrientes. Sin embargo, las concentraciones de PT fueron altas para un sistema oligotrófico, correspondiéndose a las de uno mesotrófico (OECD, 1982). Según lo propuesto por Drovandi *et al.* (2005) para el embalse El Carrizal, esto se debe al aporte del P adsorbido sobre las partículas de sólidos en suspensión provenientes del río. Por otro lado, la baja transparencia del agua puede también derivar en una

concentración de clorofila “a” baja, debido a los menores niveles de luz disponibles para la fotosíntesis de las algas (Drovandi *et al.*, 2005). La clasificación trófica del embalse, a partir de la clasificación de “límite cerrado” de la OECD (1982), varió de mesotrófico a oligotrófico según se consideró como referencia los parámetros de transparencia y PT, o de clorofila “a”, respectivamente. Al realizar la clasificación de acuerdo a los gráficos de distribución de probabilidades de la OECD (Vollenweider y Kerekes, 1980), el embalse se clasificó como mesotrófico, de la misma forma que a partir del índice TSI (Aizaki *et al.*, 1981). Estas clasificaciones indican que se trata de un embalse de bajo estado trófico, cuya transparencia y PT se encuentran fuertemente influenciados por los sólidos en suspensión aportados por el río Neuquén. La relación DIN:PRS (2:1), sugiere que la productividad se encuentra limitada por el N. Esta misma limitación por N se ha encontrado en la mayoría de los ambientes acuáticos continentales de la Patagonia (Pedrozo *et al.*, 1993; Diaz *et al.*, 2007), en contraposición a la limitación por P tradicionalmente generalizada para los ambientes continentales de agua dulce del hemisferio sur (Sze, 1980; Auer *et al.*, 1986).

La determinación del estado trófico, así como de la carga de nutrientes del embalse, son de gran utilidad para evaluar la evolución del ambiente a futuro y, además, fue necesaria para ajustar el área de muestreo para los bioensayos realizados en este trabajo, así como para determinar las condiciones experimentales adecuadas para los mismos.

El agua intersticial presenta, en todos los casos, valores de pH cercanos a la neutralidad e inferiores a los medidos en la columna de agua. Esto se debe a la capacidad amortiguadora de los sedimentos calcáreos del embalse cuyas altas concentraciones de CaCO₃ en el complejo de intercambio limitan el ascenso del pH (Ben-Yaakov *et al.*, 1973). En todos los casos se observaron concentraciones de P y N inferiores a las encontradas en los sedimentos y, a su vez, mayores a las de la columna de agua. El agua intersticial y la interfase agua-sedimento constituyen barreras para el libre intercambio de P entre los sedimentos y la columna de agua. Se observó también que el agua intersticial del sitio del muro del embalse presenta concentraciones de PT y PRS mayores a las del agua

intersticial del resto de los sitios. En general, se encuentra una pequeña proporción (< 1 %) del fósforo comparado con las concentraciones encontradas en el sedimento (Böstrom *et al.*, 1982); pero, aún así, considerablemente más alta (5-20 veces) que las concentraciones registradas en la columna de agua (Håkanson y Jansson, 1983). Este hecho se debería a la existencia de una marcada diferencia en las tasas de transporte que operan en el agua intersticial y de interfase respecto a las que operan en la columna de agua.

Las variaciones estacionales del ORP en los sedimentos del embalse se asociaron a los períodos de estratificación y mezcla de la columna de agua, con una oscilación entre valores negativos en verano y positivos en invierno, como ha sido observado en otras investigaciones (Carr *et al.*, 1965; Chapman *et al.*, 1998; Elçi, 2008). Por otra parte, también influiría la demanda biológica de oxígeno en los sedimentos durante el verano, como observaron Chimney *et al.* (2006). Esto implicaría, por un lado, una mayor oxigenación de la columna de agua en las estaciones de mezcla (otoño e invierno) y, por el otro, en un mayor tenor de oxígeno disuelto en el fondo del embalse en estas estaciones. El pH de los sedimentos del embalse presentó valores cercanos a la neutralidad e inferiores a los de la columna de agua, debido probablemente a sus propiedades amortiguadoras (Ben-Yaakov *et al.*, 1973; Lamas y Salusso, 2014). Este efecto amortiguador también se reflejó en el pH neutro del agua intersticial. Sin embargo, los valores de pH en los sedimentos del río mostraron un aumento en invierno y primavera, posiblemente debido al aporte salino por escorrentías y erosión del suelo en estas estaciones de mayor precipitación y caudal del río. En el caso de los suelos circundantes al río y al embalse, estos presentaron pH alcalino, característico de la roca parental rica en carbonato cálcico (Duarte, 2013). Los valores de ORP en los suelos fueron positivos durante todo el año, según lo esperado para suelos secos (Fiedler *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta que más del 99 % del peso corresponde a fracciones de arena (fina, media y gruesa), tanto los sedimentos como los suelos de todos los sitios analizados se clasifican, según los criterios de la USDA, como arenosos. Los porcentajes de las diferentes fracciones de arena variaron entre los sedimentos

del río y el embalse, predominando en el embalse fracciones de arena más gruesa en comparación con el río donde predominaron las fracciones de arena fina. Esto se debería a una sedimentación secuencial de los sólidos transportados por el río, tal como describen Kostic y Parker (2003). Por otro lado, los sitios del embalse presentaron granulometrías similares entre sí, predominando la fracción de arena gruesa en todos los casos. Estos resultados difieren con lo observado por otros autores, que describen una primera sedimentación de las fracciones más gruesas en los sitios de cola de los embalses, y las más finas hacia el muro de los mismos (Morris y Fan, 1998; Kostic y Parker, 2003; Julien, 2010). El patrón observado en el embalse Los Barreales podría deberse a que la zona fluvial, con depósito de las fracciones más gruesas de arena, se encuentra previa al sitio de muestreo LB1. Otra explicación posible, radicaría en la morfología del embalse Los Barreales, que propiciaría otro tipo de flujo de agua adicional al flujo longitudinal cola-muro, que produciría una homogeneización del material sedimentado.

Los porcentajes de humedad registrados en sedimentos se corresponden con una alta capacidad de retención de agua de aquellos con tamaños de partícula fina (Yalçın-Özdilek *et al.*, 2007), mientras que en los suelos, de tipo aridisoles, las características áridas de la zona de Monte de Neuquén derivan en bajos porcentajes de humedad (Duarte, 2013). La humedad en los suelos presentó un máximo en invierno, época de mayores precipitaciones en la zona (AIC, 2018).

La textura observada para los sedimentos, junto a sus porcentajes CT y NT, corresponden a sustratos pobres en nutrientes y con bajo contenido de materia orgánica, características típicas de los suelos aluviales de tipo aridisoles del área de monte de Neuquén (Leanza *et al.*, 2001; Zanettini *et al.*, 2001) que dieron origen al fondo del embalse. Sin embargo, las concentraciones de PT son comparativamente mayores a las de los suelos circundantes, debido al aporte de sólidos por parte del río Neuquén. Las fracciones de P mostraron un alto porcentaje del mismo ligado al calcio, por las altas cantidades de carbonato cálcico presentes (Leanza *et al.*, 2001; Zanettini *et al.*, 2001). Asimismo, el fósforo orgánico, debido a su origen fluvial, es comparativamente mayor en sedimentos, y a su vez mayor en primavera, la estación de mayor caudal del río afluyente (AIC,

2018). Similares resultados obtuvieron León *et al.* (2017) en los embalses El Nihuíl y El Carrizal, ambientes alcalinos de la provincia de Mendoza. Estos autores, observaron que la mineralogía de los sedimentos reflejaba la riqueza de calcio del sistema, encontrando que los minerales más abundantes, en los dos embalses, fueron los carbonatos y fosfatos de calcio. Los suelos presentaron bajos porcentajes de CT y NT, y bajos valores de CIC, en relación con su textura arenosa y bajo contenido de materia orgánica (Mussini *et. al.*, 1984; FAO, 2020). El fraccionamiento de P mostró, al igual que en el caso de sedimentos, la predominancia de la fracción ligada al calcio. Sin embargo, en este caso la fracción de P-orgánico representó porcentajes menores a los observados en sedimentos, debido al bajo contenido de materia orgánica (Mussini *et. al.*, 1984) y a la ausencia del aporte de la carga de sedimentos del río.

De acuerdo con Imbellone *et al.* (2017), en suelos ricos en carbonato cálcico la geoquímica predominante, en términos de porcentajes de óxidos, está expresada como: $\text{SiO}_2 > \text{Al}_2\text{O}_3 > \text{Fe}_2\text{O}_3 > \text{CaO}$. En este sentido, los resultados obtenidos en los sedimentos y en los suelos en este trabajo confirmaron lo planteado por estos autores.

Material extractable en solventes: exploración del potencial contenido de HAPs

En este trabajo se cuantificó el material extractable en solventes en sedimentos y suelos, que corresponde al conjunto de compuestos polares, hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos capaces de ser extraídos de las muestras analizadas por el solvente utilizado (USEPA, 1999), que eluyen en el mismo tiempo retención que los HAPs de referencia analizados. Es decir, la fracción de lípidos coincidentes con el TR de un determinado HAP, siendo estos lípidos de potencial origen biogénico, petrogénico o pirogénico. Esto implica que en caso de estar presentes los HAPs de referencia su concentración máxima estaría acotada al valor hallado como concentración de MES, aunque en general los HAPs individuales representan una muy baja proporción de la fracción de aceites y grasas o material extractables en solventes, que corresponden a los lípidos totales. La distribución del MES coincidente con los TR de los HAPs

encontrados en suelos y sedimentos permite sospechar la presencia de algunos de los HAPs prioritarios en esas matrices, correspondientes con las propiedades hidrófobas de los mismos (Yunker *et al.*, 2002; Gaspare *et al.*, 2009; Net *et al.*, 2015). Por otro lado, en los suelos se identificaron MES en los TR de los mismos HAPs que en los sedimentos, representados principalmente por los coincidentes con el TR del BaA, Fen y Ace, sospechando de la presencia de estos compuestos. Los valores de MES encontrados, superan las concentraciones de efecto observable límite de los HAP individuales (TEC: BaA = 0,035 ppm_{ss}; Fen = 0,045 ppm_{ss}), y en particular del umbral de mayor efecto aparente BaA (HAET: BaA = 2,55 ppm_{ss}) propuestos por la USEPA (Swartz, 1999). Aunque las concentraciones de MES de un determinado TR no son directamente comparables con el HAPs del mismo TR, los valores hallados justifican realizar un estudio a futuro sobre los sedimentos y suelos a fin de confirmación la presencia y concentración de los HAPs sospechados. Esto se debe a que dada la técnica de medición utilizada (MES) en este trabajo, este método no posee selectividad para estos compuestos. La ausencia de una etapa de limpieza o “clean up” y fraccionamiento de las muestras de sedimentos y suelos, previa a su análisis por CG FID, da lugar a la detección de otros lípidos además de los HAPs provenientes por ejemplo de la materia orgánica propia de la matriz o de hidrocarburos alifáticos que pudieran estar presentes. Por otro lado, los resultados obtenidos en esta Tesis permite afirmar que para aquellos sitios en los que el MES fue no detectado, los HAPs de estudio prioritario en las muestras de sedimentos y suelos analizados no se encontraron presentes en concentraciones superiores al límite de detección (< 1 ppm_{ss}), en las fechas de muestreo. Estos resultados poseen relevancia como valores de referencia respecto la línea de base ambiental en la época del estudio, que permitirá comparar la futura tendencia en la contaminación con HAPs de este relevante cuerpo de agua.

5.5. Conclusiones

El embalse es un cuerpo de agua de tipo monomítico templado, con un período de estratificación estival y un período de mezcla otoño-primavera. Se clasifica tróficamente como mesotrófico, debido principalmente a sus niveles de fósforo total y transparencia, parámetros afectados directamente por el aporte de sólidos del río Neuquén.

La composición del fitoplancton varía estacionalmente, con una predominancia de diatomeas en verano, y de criptofitas y clorofitas el resto del año. El análisis de esta comunidad permitió identificar las especies algales potenciales de ser utilizadas en los posteriores ensayos, y su evolución estacional natural, lo que condujo al establecimiento de la estación de primavera como época de muestreo para los bioensayos. En este sentido, también permitió conocer las condiciones ambientales de nutrientes disueltos, temperatura e intensidad lumínica, entre otros, a replicar en el laboratorio para el cultivo del fitoplancton natural.

Los suelos del ambiente, al igual que los sedimentos del embalse, presentan características calcáreas, típicas de la roca parental de la región, que gobiernan su geoquímica, y que dan al cuerpo de agua un pH alcalino. En este sentido, el fósforo presente en los sedimentos se compone principalmente por su fracción unida al calcio y, en menor medida, por la asociada a la materia orgánica.

Respecto a los compuestos orgánicos, se encontraron valores de MES que permiten sospechar la presencia de HAPs en sedimentos y suelos del embalse, como benzo(a)antraceno y fenantreno. En esta evaluación se obtuvieron las cotas máximas de concentración potenciales en cada sitio analizado, para luego ser consideradas en los bioensayos como concentraciones de base ambientales. Asimismo, esta información permitió seleccionar el sitio de muestreo LB2 en la estación de primavera para estos ensayos, considerando los mayores valores detectados de MES en este sitio. Teniendo en cuenta el monitoreo del ambiente, los resultados obtenidos justifican la realización de futuros estudios que para evaluar el contenido de HAPs y verificar su presencia y concentraciones y, en caso

que las mismas resultaran concentraciones peligrosas, que superen los límites establecidos por la legislación nacional y los estándares de calidad internacionales, se puedan tomar medidas eficientes de remediación.

Capítulo II

**Evaluación de los efectos sobre los nutrientes
y el fitoplancton producidos por la
contaminación artificial con HAPs en suelos y
sedimentos del embalse Los Barreales**

6.1. Introducción

6.1.1. Contaminación con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los hidrocarburos de petróleo son una mezcla compleja y variable de compuestos, entre los que se incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Estos son compuestos hidrófobos, ligeramente solubles en agua, con un alto factor de bioconcentración, para los cuales se han demostrado sus propiedades tóxicas, mutagénicas y cancerígenas (IARC, 1983). Se han identificado aproximadamente 130 HAP, 16 de los cuales (con 2-6 anillos) se caracterizan como contaminantes prioritarios por la USEPA, entre los cuales se encuentran al antraceno (Ant), el pireno (Pir), el fenantreno (Fen) y el benzo(a)antraceno (BaA) (Peluffo, 2016). Estos cuatro compuestos fueron los seleccionados para realizar los bioensayos de este trabajo, teniendo en cuenta que son compuestos habitualmente utilizados como modelos de HAPs, y que dos de ellos representan HAPs de bajo peso molecular (Ant y Fen), y dos HAPs de alto peso molecular (Pir y BaA).

Los HAPs tienden a acumularse en los sedimentos de los cuerpos de agua, y esta tendencia es más fuerte para aquellos HAPs de cuatro o más anillos, es decir, de alto peso molecular (Yunker *et al.*, 2002; Gaspare *et al.*, 2009; Net *et al.*, 2015). Esto se debe a que la afinidad de los HAPs por la fase orgánica es mucho mayor que por la fase acuosa, como se refleja en sus altos coeficientes de partición octanol-agua (K_{ow}), ó el K_{ow} normalizado con el contenido de carbono orgánico de la fase hidrófoba (K_{oc}) (WHO, 2004; Patrolecco *et al.*, 2010; Rabodonirina *et al.*, 2015). Debido a esta capacidad de acumulación, los sedimentos pueden actuar como reservas de contaminantes (Golterman, 2004). Además, los sedimentos desempeñan una función muy importante en los ciclos de los nutrientes de un ambiente acuático, cuando los nutrientes involucrados son esenciales como el P y el N (Håkanson y Jansson, 1983). La recirculación de nutrientes podría ser modificada por los HAPs en los sedimentos, ya sea directamente, por interferencia física (Ujowundu *et al.*, 2011), o indirectamente, por cambios en la actividad bacteriana en los sedimentos (Sun *et al.*, 2012).

6.1.2. El fitoplancton como bioindicador de contaminación

Debido a que la caracterización química de los sedimentos y lixiviados no proporciona información sobre la toxicidad de contaminantes y su biodisponibilidad para los organismos acuáticos, es necesario tener un sistema o modelo adecuado para evaluar estos parámetros (Håkanson y Jansson 1983). En este sentido, el uso de bioindicadores, definidos como cualquier especie o grupo de especies cuya función, población o estado puede revelar el estado cualitativo del medio ambiente, puede señalar de manera directa y precisa las concentraciones críticas de contaminantes específicos (Ptacnik *et al.*, 2008).

El fitoplancton natural de los ambientes ha demostrado ser útil como un indicador de la presencia de contaminantes en la columna de agua y en los sedimentos. Este indicador exhibe para algunas especies una adecuada facilidad para colectarse y mantenerse en cultivos y, además, puede estudiarse en un período relativamente corto, ya que las especies algales tienen tiempos de reproducción cortos (Bellinger y Sigee, 2015). Las técnicas más utilizadas para evaluar la toxicidad potencial de los sedimentos contaminados en los sistemas acuáticos son los bioensayos con fitoplancton en microcosmos (Richardson *et al.*, 2001; Aksmann y Tukaj, 2004; Sibley *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2009; Ramadass *et al.*, 2016). Las variaciones cuantitativas de las poblaciones del fitoplancton son las primeras respuestas a los cambios ambientales, siendo posible observar un aumento o disminución dependiendo del tipo de influencia. Además, también se pueden observar cambios cualitativos en las comunidades fitoplanctónicas. Nuevas especies pueden colonizar el ambiente, mientras que algunas de las especies originales pueden disminuir y ocasionalmente extinguirse (Ptacnik, 2008).

El uso de algas como especies indicadoras de la contaminación por HAPs está bien documentado en diferentes ambientes acuáticos del mundo. En el caso del medio marino, existen estudios como los de Okay *et al.* (2002), que midieron los niveles de toxicidad de Fen en algas marinas; Echeveste *et al.* (2010), que evaluaron el efecto tóxico de HAPs en un cultivo de algas marinas, y Aksmann y

Tukaj (2004), que evaluaron la toxicidad del Fen y Ant en la especie *Scenedesmus armatus*. Entre los estudios de agua dulce se encuentran el de Froehner *et al.* (2012), que utilizaron biofilms naturales como indicadores de la presencia de HAPs, y el de Ramadass *et al.* (2016), que evaluaron la sensibilidad de *Chlorella* sp. a fracciones solubles de aceite mineral.

En Argentina, la mayoría de los estudios sobre el impacto de los derrames de petróleo crudo en ambientes acuáticos se han llevado a cabo principalmente en ambientes marinos: Oliva *et al.* (2016) y Arias *et al.* (2010) estudiaron la acumulación de HAPs en sedimentos y su acumulación en los mejillones nativos en el estuario de Bahía Blanca, Buenos Aires. Casas *et al.* (2010) estudiaron la presencia de HAPs en sedimentos y su efecto tóxico sobre el alga marina *Undaria pinnatifida* en el golfo Nuevo, en la provincia del Chubut mientras que Commendatore *et al.* (2015) estudiaron la presencia de HAPs en sedimentos y biota del Golfo San Jorge. Commendatore *et al.* (2012) estudiaron las fuentes y la distribución de hidrocarburos en los sedimentos marinos en la bahía de Ushuaia, Tierra del Fuego.

Los estudios sobre ambientes de agua dulce son escasos. En Patagonia Norte, Monza (2013) y López Ordieres (2018) estudiaron la presencia de HAPs en agua y sedimentos en la cuenca del río Neuquén, mientras que del Brio (2018) analizó el efecto de la fracción de petróleo disuelta en agua sobre el anfípodo *Hyaella curvispina*. Por otro lado, Alvaro *et al.* (2017) estudiaron la presencia de HAPs en suelo y su bioremediación. Monza *et al.* (2013) analizaron un sitio del embalse Los Barreales, encontrando concentraciones de 2,25 ppm_{ss} de hidrocarburos alifáticos y no detectables para los 16 HAPs prioritarios (límite de detección: 0,023 ± 0,005 ppm_{ss}). Diaz *et al.* (2015) estudiaron tres especies algales acidófilas naturales del lago Caviahue, provincia de Neuquén (*Cyanidium caldarium*, *Keratococcus raphidioides* y *Euglena mutabilis*), identificándolas como posibles bioindicadoras de la contaminación por Fen. El trabajo de estos autores fue el primero sobre el efecto que la presencia de un HAP en el suelo produce sobre especies de fitoplancton autóctono de ambientes acuáticos en la Patagonia. En el embalse Los Barreales, ubicado en la cuenca productora de petróleo más

importante de Argentina, no existen estudios previos sobre la utilización de algas como bioindicadoras del impacto potencial de los hidrocarburos podrían tener sobre los ambientes acuáticos de esta cuenca.

Los bioensayos con organismos acuáticos son ampliamente utilizados para determinar toxicidad de contaminantes, y permiten establecer niveles guía de calidad de agua para la conservación de la vida acuática. En este sentido, se utilizan frecuentemente especies de peces como *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinodon variegatus* y *Danio rerio*, crustáceos planctónicos como *Daphnia magna* y *Cerodaphnia dubia*, dípteros como *Chironomus tentans*, anfípodos como *Hyalella azteca* o mejillones como *Mytilus galloprovincialis* (Hoffman, 2002; Liu *et al.*, 2006; Vidal-Liñán *et al.*, 2010). En el caso del fitoplancton, existen especies utilizadas mundialmente para la realización de ensayos de toxicidad de diversos contaminantes, entre ellas el alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, la diatomea marina *Skeletonema costatum* y la cianobacteria *Anabaena flos-aquae* (USEPA, 2012; Carusso *et al.*, 2018). Sin embargo, la posibilidad de desarrollar bioensayos de toxicidad con especies autóctonas permitiría una mejor aproximación al efecto de un determinado contaminante sobre las comunidades autóctonas y, por lo tanto, el establecimiento de niveles umbrales o guía específicos para dicha sustancia. En este sentido, son de gran importancia los datos de toxicidad provenientes de bioensayos monoespecíficos que reproduzcan, en el laboratorio, las condiciones del ambiente en estudio (Menone *et al.*, 2020).

6.2. Materiales y Métodos

Para responder a los objetivos específicos planteados: 3) “*Evaluar la respuesta de sedimentos, de los suelos y el fitoplancton a dosis crecientes de contaminación por HAPs*”; y 4) “*Investigar el uso de las algas nativas del cuerpo de agua estudiado como bioindicadoras de contaminación (HAPs) de suelos y de sedimentos lacustres*”, se realizaron las siguientes actividades:

6.2.1. Colección y procesamiento de muestras

En noviembre de 2017, se colectaron muestras de agua, sedimentos y fitoplancton en el sitio LB2 (ver sección 4.2., Figura 6). Se tomaron muestras de agua en subsuperficie, 2, 6, 18 y 43 m (fondo), usando una botella Van Dorn y se conservaron de acuerdo con los métodos estándar de APHA (1995). Los sedimentos se recogieron con un corer tipo UWITEC, por triplicado. Los primeros 10 cm de cada testigo fueron utilizados para los bioensayos, conservándose en refrigeración de acuerdo con las recomendaciones de APHA (1995). Las muestras de suelos se obtuvieron con un cilindro de policloruro de vinilo (PVC), previa limpieza de restos vegetales y materia orgánica en descomposición de la superficie del sitio. El cilindro se enterró hasta los 10 cm y el suelo colectado se colocó en bolsas plásticas, conservándose del mismo modo que los sedimentos. La cantidad de suelo colectado en cada sitio fue de aproximadamente de 1 Kg. Una vez en el laboratorio, los sedimentos y suelos se secaron en estufa a 60 °C, se enfriaron en desecador y se pesaron, repitiendo el proceso de secado hasta obtención de peso constante. Una vez secos, se procesaron en mortero, y se conservaron en lugar seco en oscuridad, para luego ser utilizados en los bioensayos.

6.2.2. Ensayo 1: Incubaciones de sedimentos y suelos contaminados con diferentes HAPs

6.2.2.1. Realización del ensayo

Para evaluar las variaciones en el flujo de nutrientes desde o hacia los sedimentos/suelos como resultado de la contaminación por HAPs, en febrero de 2018, se incubaron muestras de sedimentos/suelos contaminadas artificialmente con cuatro HAPs diferentes con agua del embalse filtrada a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de poro. Las cotas máximas para los HAPs obtenidas en los sedimentos/suelos del sitio LB2 (Capítulo I, sección 5.3.2.) a partir de los resultados de material extractable en solvente para cada tiempo de retención (TR) (sedimentos: TR Ant = no detectable (nd); TR Pir = < 10 ppm_{SS}; TR Fen = < 10 ppm_{SS}; TR BaA = 27 ppm_{SS}, y suelos: TR Ant = nd; TR Pir = nd; TR Fen = nd; TR

BaA = 20 ppm_{ss}) se utilizaron como valores basales. Las concentraciones ensayadas fueron: basal (control), 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm_{ss} de Fen, Ant, Pir ó BaA. Los HAPs se incorporaron a los sedimentos/suelos mediante previa disolución de los mismos en acetona, mezcla de la solución con los sedimentos (10 min de agitación, Figura 43), y posterior evaporación completa del solvente, de acuerdo con Kulik *et al.* (2006). Una alícuota equivalente de acetona sin HAPs se adicionó al control. Los sedimentos/suelos contaminados (3 g) se incubaron estáticamente en frascos de vidrio de 250 mL, por triplicado, con 150 mL de agua del embalse filtrada (0,45 µm de poro), a 25 °C durante 2 días. Luego de este tiempo, se analizó pH en el sobrenadante de cada sistema (Thermo Orion 3 Star pH portátil), y se colectaron muestras para determinar las concentraciones de N y P en la fase acuosa (APHA 1995). Se determinaron los nutrientes totales (PT y NT) sobre la fracción sin filtrar y los nutrientes disueltos (PRS, N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻ y N-NH₄⁺) sobre la fracción filtrada por filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm de poro, siguiendo las metodologías de análisis de nutrientes descritas en el Capítulo I (sección 5.2.1.).



Figura 43: Incorporación de los HAPs a los sedimentos/suelos.

6.2.2.2. Isotermas de fijación de fósforo en los sedimentos

Se llevaron a cabo ensayos con el objetivo de analizar las isotermas de fijación de P de los sedimentos contaminados utilizados en 6.2.2.1., teniendo en cuenta aquellos HAPs y concentraciones que mostraron efectos significativos sobre los nutrientes en solución. Para ello se incubaron muestras de

aproximadamente 0,2 g de sedimentos contaminados con Fen (1000 ppm_{ss}), BaA (1000 ppm_{ss}) ó sin agregado de HAPs (control), con 10 mL de soluciones de diferentes concentraciones de fosfato (PO₄⁻², 0-10000 µg L⁻¹), durante 48 hs en oscuridad y a temperatura constante (20 °C), determinándose posteriormente el PRS en solución (APHA, 1995). Los resultados fueron graficados en función de las ecuaciones que responden a las isothermas de Freundlich:

$$P_o + P_{ads} = K \times P_{dis}^b$$

Dónde:

K y **b** son constantes y **b** varía entre 0 y 1.

P_o: Corresponde a la concentración inicial de fósforo en el sedimento.

P_{ads}: Corresponde al fósforo fijado al sedimento.

P_{dis}: Corresponde a la concentración de fósforo remanente en solución.

y la ecuación de Langmuir:

$$\frac{P_{dis}}{(P_o + P_{ads})} = \frac{1}{(K \times P_{m\acute{a}x}) + \left[\left(\frac{1}{P_{m\acute{a}x}} \right) \times P_{dis} \right]}$$

Dónde:

P_{máx}: Representa la capacidad de fijación máxima de fósforo por parte del sedimento.

K: Constante que vincula, según Olsen y Watanabe (1957), a la energía de unión del fósforo con el sedimento.

6.2.2.3. Determinación de capacidad de intercambio catiónico (CIC) de los sedimentos contaminados

Con el fin de evaluar el efecto de la contaminación con HAPs sobre la CIC de los sedimentos, se determinó la misma sobre una fracción de los sedimentos contaminados en la sección 6.2.2.1. Se utilizaron muestras compuestas en las que

se mezclaron todas las concentraciones ensayadas (desde 50 a 1000 ppm_{ss}) de cada HAP, y se determinó la CIC según la metodología propuesta por Summer y Miller (1996) y descripta en el Capítulo I (sección 5.2.3.). Los análisis se llevaron a cabo en el INTA-EEA Bariloche.

6.2.3. *Ensayo 2: Bioensayo con el ensamble algal natural y fenantreno*

Entre los HAPs utilizados en este trabajo, se seleccionó Fen para el ensayo 2 debido a que, por un lado, ha sido ampliamente utilizado como compuesto modelo ya que se encuentra en altas concentraciones en muestras ambientales contaminadas con HAPs (Amorim *et al.*, 2011; Dailianis *et al.*, 2014), y por otro, debido a que presenta toxicidad para diversos organismos acuáticos (Zhang *et al.*, 2014; Diaz *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018).

6.2.3.1. *Obtención del inóculo de algas nativas*

Se obtuvieron muestras de fitoplancton nativo del embalse utilizando redes de plancton Hydro-Bios® de 10 y 50 µm, filtrando aproximadamente 100 L de agua subsuperficial, y conservando la fracción remanente entre ambas redes, según la metodología descripta en el Capítulo I (sección 5.2.1.). Una vez en el laboratorio, estas muestras se incubaron en medio de cultivo Hill (1970) modificado (Anexo II), con fotoperíodo de 12 horas ($\sim 50 \mu\text{mol de fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en una cámara de incubación Neoline® a 25 °C de temperatura media, durante dos meses. Las incubaciones se llevaron a cabo en Erlenmeyer de 250 mL a los cuales se les incorporó un sistema de mangueras conectadas a una bomba de aire para mantenerlas en constante agitación y aireación (Figura 44).



Figura 44: Incubación de muestras de fitoplancton nativo del embalse.

6.2.3.2. Realización del bioensayo

Se utilizaron muestras del cultivo de fitoplancton obtenido en 6.2.3.1, las cuales se diluyeron hasta una concentración final de 10^5 cél mL⁻¹. Para ello se tomaron aproximadamente 5 mL del cultivo y se diluyeron con agua del embalse filtrada a través de un filtro de membrana de 0,45 μ m de poro (realizando los cálculos de volúmenes de acuerdo al recuento algal realizado el día del ensayo). El bioensayo consistió en incubar estas muestras (9 réplicas) con sedimentos contaminados con concentraciones crecientes de Fen: 250, 500 ó 1000 ppm_{SS} ó basal (control). Los sedimentos secos obtenidos en 6.2.1. (0,5 g) se mezclaron con 20 mL de agua del embalse filtrada y se dejó estabilizar durante 24 horas en una cámara de incubación Neoline® a 25 °C, después de lo cual se añadieron 5 mL del inóculo algal. La incubación se realizó en frascos Nunclon® de 50 mL (Figura 45), con fotoperíodo de 12 horas ($\sim 50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en las mismas condiciones de estabilización, sin agitación. El tiempo de incubación fue de 14 días. A los días 0, 7 y 14 se colectó un tercio de los frascos (3 réplicas por día, por cada concentración de Fen). El contenido de los frascos se homogeneizó mediante agitación suave durante 30 seg, y se pipetearon 5 mL de muestra preservándose con lugol-acético para luego realizar el recuento de las algas bajo microscopio invertido Leica®, utilizando la técnica de Utermöhl descrita en el Capítulo I, sección 5.2.1. (Wetzel y Likens, 1991). Para la determinación de

clorofila “a”, se filtraron 10 mL de la muestra homogeneizada a través de filtros de fibra de vidrio (GF/F). Los filtros se conservaron a -18 °C en oscuridad, y luego se incubaron con acetona al 90%, a 4 °C en oscuridad, durante 18 hs. Posteriormente se determinó la concentración de clorofila “a” del extracto por fluorimetría en un fluorómetro Turner Designs 10-AU, de acuerdo con la metodología propuesta por APHA (1995).



Figura 45: Preparación de sistemas del bioensayo 2.

6.2.4. Aislamiento de *Scenedesmus quadricauda*

De acuerdo con su alta abundancia relativa en el tratamiento control, y con su respuesta sensible a los diferentes tratamientos con Fen en el ensayo 2 (6.2.3.2.), se seleccionó a *Scenedesmus quadricauda* (Turpin; Brébisson) como un indicador potencial de contaminación por HAPs. La especie se aisló utilizando una técnica de dilución en serie (Hoshaw y Rosowsky, 1973; Andersen, 2005), realizando 24 diluciones 1:10 en una placa multipocillos de 24 unidades, colocando 1 mL de muestra y 1 mL de medio de cultivo en cada uno. Se utilizó un medio de cultivo modificado de Hill (1970) (Anexo II), y los cultivos de las diferentes diluciones se incubaron en una cámara Neoline® en las mismas condiciones descritas para el ensayo 2 (sección 6.2.3.2). El monitoreo del cultivo se realizó semanalmente, durante dos meses, utilizando un microscopio invertido Leica®, hasta obtener un cultivo uni-algal de *S. quadricauda* (Figura 46).



Figura 46: Cultivo uni-algal de *Scenedesmus quadricauda*.

6.2.5. Ensayo 3: Bioensayo con *S. quadricauda* y diferentes HAPs en sedimentos/suelos

6.2.5.1. Realización del bioensayo

Sedimentos

Con el objetivo de evaluar la respuesta de las algas a las dosis crecientes de HAPs en sedimentos, se llevó a cabo un bioensayo utilizando el cultivo monoespecífico de *S. quadricauda* obtenido en 6.2.4. y sedimentos contaminados con diferentes HAPs. Los sedimentos fueron contaminados con Ant, Pir, Fen ó BaA, y las concentraciones finales luego de la contaminación fueron: 50, 100, 250, 500 ó 1000 ppm_{ss} de HAPs y un control (basal), utilizando la misma metodología descrita para el ensayo 1 (sección 6.2.2.). El bioensayo consistió en la incubación de 0,5 g de sedimentos en 20 mL de agua del embalse filtrada a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de poro y, previa estabilización de 24 hs, con un agregado de 5 mL de inóculo algal (concentración final: 10⁴ cél mL⁻¹), realizando 9 réplicas por cada concentración de HAP. La incubación se realizó en frascos

Nunclon® de 50 mL, con fotoperíodo de 12 horas ($\sim 50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en una cámara de incubación Neoline® a 25°C, sin agitación, cambiando de lugar los frascos periódicamente. El tiempo de incubación fue de 7 días. A los días 0, 2 y 7 se colectaron diferentes series de frascos (3 réplicas cada día), se homogeneizaron, y de cada frasco se obtuvo una alícuota de 5 mL para determinar abundancia algal y una de 10 mL para determinar concentración de clorofila “a”. Ambas muestras se procesaron siguiendo la misma metodología que en el bioensayo 2 (sección 6.2.3.).

Suelos

Considerando los resultados obtenidos para el bioensayo con sedimentos, se realizó el bioensayo con suelos, siguiendo la misma metodología descrita en el párrafo anterior, y utilizando las siguientes concentraciones de HAPs: 250, 500, 1000 ppm_{ss} ó basal (control). Los tiempos de colección de muestras para análisis de abundancia algal y clorofila “a” fueron a 0 y 7 días de incubación.

6.2.5.2. Estimación del coeficiente de partición de los HAPs

Para evaluar la biodisponibilidad de los HAPs cuando los sedimentos/suelos forman parte del sistema (ensayo 2), se estimó el fraccionamiento de HAPs entre el sedimento y las células algales utilizando un modelo matemático adaptado de los propuestos por los siguientes autores. En primer lugar, de acuerdo con Smedes *et al.* (2013), cuando además de sedimentos/suelos existe una segunda fase hidrófoba (polímero) los HAPs se distribuyen entre ambas de acuerdo a la siguiente relación:

$$\frac{N_p}{N_{s,0}} = \frac{m_p K_p}{m_s K_{sw} + m_p K_p} \quad (1)$$

Dónde:

N_p : es la cantidad de HAP en el polímero (g);

$N_{s,0}$: es la cantidad inicial de HAP en los sedimentos/suelos (g);

m_p : es la masa de polímero;

m_s : es la masa de sedimento/suelo (g);

K_{pw} (L Kg⁻¹): es el coeficiente de partición polímero-agua; y

K_{sw} (L Kg⁻¹): es el coeficiente de partición sedimento/suelo-agua.

La fase de agua no está incluida en el denominador porque su capacidad de asociación con los HAPs es insignificante en comparación con los otros compartimentos (Smedes *et al.*, 2013). En segundo lugar, en los ensayos de esta tesis la segunda fase hidrofóbica estaría representada por células algales. En este sentido, y de acuerdo con Hung *et al.* (2014), la distribución de HAPs entre la fase acuosa y las células algales está dominada por el coeficiente de reparto entre lípidos y agua (K_{tw} : coeficiente de reparto de trioleína-agua (2)), dado que la influencia de proteínas o carbohidratos en la adsorción de compuestos hidrófobos es insignificante en comparación con la de los lípidos de su superficie. La relación lineal entre K_{tw} y el coeficiente de partición algas-agua normalizado con el contenido de lípidos del alga ($K_{aw/lípido}$) se calculó a partir de las ecuaciones (2) y (3) (Hung *et al.*, 2014):

$$\log K_{tw} = 1,12 (\pm 0,03) \log K_{ow} - 0,64 (\pm 0,24) \quad (2)$$

$$\log K_{aw/lípido} = 0,983 (\pm 0,014) \log K_{tw} + 0,134 (\pm 0,061) \quad (3)$$

Dónde:

K_{ow} : es el coeficiente de partición octanol-agua de cada HAP (Tabla 11);

K_{aw} : es el coeficiente de partición entre la superficie algal y el agua, calculado mediante la normalización con el contenido de lípidos de las algas (f_l) ($K_{aw} = K_{aw/lípido} \cdot f_l$), utilizando para ello el valor obtenido por Hung *et al.* (2014) para *Chlorella sorokiniana* ($f_l = 0,136$), suponiendo un contenido de lípidos igual al del alga verde evaluada en este trabajo, *S. quadricauda*, teniendo en cuenta sus similares características.

Al reemplazar K_p con K_{aw} en la ecuación (1), se obtiene la ecuación (4), que permite estimar la relación entre la cantidad de HAP en las fases de algas y sedimentos:

$$\frac{N_a}{N_{s,0}} = \frac{m_a K_{aw}}{m_s K_{sw} + m_a K_{aw}} \quad (4)$$

Dónde:

N_a es la cantidad de HAP en las algas (g);

m_a es la masa (Kg) de las algas, calculada a partir del biovolumen de *S. quadricauda* (estimado según Hillebrand *et al.*, 1999) y su abundancia en el cultivo inicial utilizado para el bioensayo.

K_{sw} es el coeficiente de reparto sedimento-agua, calculado a partir del coeficiente de partición carbono orgánico-agua (K_{oc}) de cada HAP, obtenido por normalización con la fracción de carbono orgánico de los sedimentos/suelos (f_{oc}) ($K_{sw} = K_{oc} \cdot f_{oc}$) (Karickhoff *et al.*, 1978). f_{oc} se consideró como 0,26, considerando el valor obtenido por Mussini *et al.* (1984) para suelos cercanos al embalse Los Barreales.

6.2.6 Ensayo 4: Bioensayo con *S. quadricauda* y agua contaminada con diferentes HAPs

Para evaluar el efecto neto de los HAPs sobre las algas (sin la influencia de la interacción HAPs-sedimentos/suelos) se realizó un bioensayo con el cultivo mono-específico de *S. quadricauda* y diferentes HAPs agregados al agua. Las mismas cantidades absolutas de Ant, Pir, Fen ó BaA utilizadas en el ensayo 3 (0 – 1000 ppm_{ss}) se colocaron en tubos de vidrio de 50 mL (Figura 47), previa disolución en acetona y posterior evaporación completa del solvente. La fase acuosa consistió en 20 mL del mismo medio de cultivo utilizado para el aislamiento de *S. quadricauda* en el ensayo 2, y 5 mL de inóculo algal (concentración final: 10⁴ cél mL⁻¹). La incubación se realizó en una cámara Neoline® a 25 °C, con fotoperíodo de 12 horas, sin agitación. El tiempo de incubación fue de 7 días. El día 7 se tomó una alícuota de cada frasco para determinar la abundancia algal. Las muestras se fijaron con solución de lugol-acético y posteriormente se realizó el recuento bajo microscopio invertido.



Figura 47: Sistemas del bioensayo 4.

6.2.7. *Ensayo 5: Bioensayo con S. quadricauda y petróleo crudo en sedimentos* (Actividad realizada en las instalaciones del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Mérida, México)

Con el objetivo de evaluar la respuesta de las algas a las dosis crecientes del petróleo crudo en sedimentos del embalse, se llevó a cabo un bioensayo utilizando el cultivo uni-algal comercial de *S. quadricauda* (CIB 54, Laboratorio Microalgas-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), La Paz, México) y sedimentos secos del embalse Los Barreales previamente contaminados con diferentes cantidades de petróleo crudo de tipo ligero (Anexo III) de la empresa Petróleos Mexicanos (PEMEX). Las concentraciones ensayadas fueron de: 250, 500 y 1000 ppm_{ss} de petróleo y un control (sin el agregado del mismo). La contaminación se realizó mediante disolución del petróleo en acetona, incorporación a los sedimentos (30 min de agitación) y posterior evaporación completa del solvente, de acuerdo con Kulik *et al.* (2006). Una alícuota equivalente de acetona sin petróleo se adicionó al control. El cultivo de *S. quadricauda* se incubó en medio de Hill modificado (1970) (Anexo II), con fotoperíodo de 12 horas ($\sim 50 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en una cámara de incubación Precision 2 (Thermo Scientific®) a 25 °C, con agitación constante mediante aireación (Figura 48), durante 14 días, con el objetivo de incrementar la biomasa algal. El bioensayo

consistió en incubar 3 g de sedimentos con 120 mL de medio de cultivo Hill (1970) modificado (Anexo II) con un reposo de 24 hs y posteriormente agregar 30 mL de inóculo algal (concentración final: 10^4 cél mL⁻¹, Figura 49). La incubación se realizó en viales con septum de 150 mL (Figura 50), en medio de Hill (1970) modificado (Anexo II), con fotoperíodo de 12 horas ($\sim 50 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en una cámara de incubación Precision 2 (Thermo Scientific®) a 25 °C, durante 7 días, sin agitación. El tiempo de incubación fue de 7 días. A los 0, 2 y 7 días, se midieron, en el sobrenadante de los sistemas, el pH, ORP y la concentración de oxígeno disuelto (O₂) mediante utilización de un electrodo específico Oxygen PreSens®. Además, se tomaron de cada frasco dos alícuotas, una de 2 mL para determinar abundancia algal y otra de 10 mL para determinar la concentración de clorofila “a”. Los recuentos algales (Figura 51) se realizaron bajo microscopio invertido (Olympus® CKX41), y las concentraciones de clorofila “a” se analizaron sobre extractos en acetona 90 % mediante espectrofotometría UV-Visible (Shimadzu® UV-1800), acoplada a software UV Probe 2.42 para análisis de espectros.



Figura 48: Incubación del cultivo comercial de *S. quadricauda*.

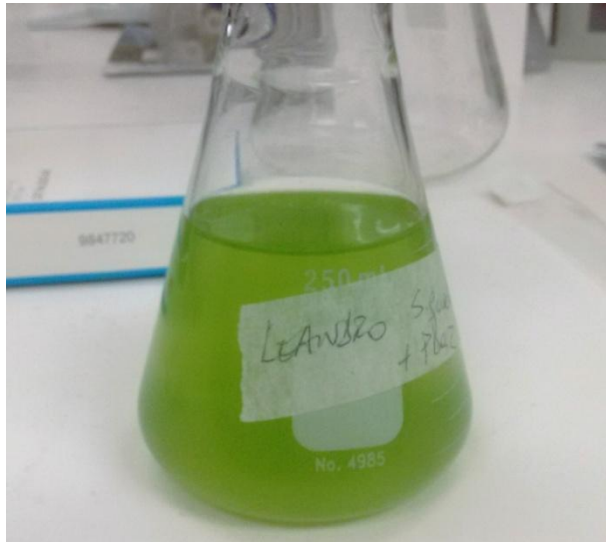


Figura 49: Cultivo de *S. quadricauda* utilizado en el bioensayo 5.



Figura 50: Viales de incubación, bioensayo 5.



Figura 51: Microfotografía (aumento 400X) de muestra de sedimentos obtenidos del bioensayo 5 para recuentos de *S. quadricauda* (en el centro de la imagen).

6.2.8. Análisis estadísticos

Para estudiar el efecto de los tratamientos en todos los bioensayos, exceptuando el ensayo 2 (sección 6.2.3.), se utilizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), con un nivel de significancia de 5 %. Las variables de respuesta bajo análisis fueron las concentraciones de PRS y N-NH₄⁺ (ensayo 1, sección 6.2.2.), abundancia de *S. quadricauda* y concentración de clorofila “a” (ensayos 3, 4 y 5, secciones 6.2.5., 6.2.6. y 6.2.7., respectivamente). Para el ensayo 2 (6.2.3.), se utilizó un ANOVA de diseño de bloques aleatorios (nivel de significancia del 5 %) para determinar efectos entre el control y los tratamientos, con el objetivo de eliminar problemas metodológicos (diferencias en la intensidad de la luz recibida por cada sistema). Las variables bajo análisis fueron la abundancia algal y la concentración de clorofila “a”. Las comparaciones entre tratamientos y control de todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando el test de Tukey (Montgomery, 2004) *a posteriori*. Se utilizó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011). Se estimó la Concentración Letal 50 en los días 2 y 7 (LC50-2d y LC50-7d, respectivamente) para *S. quadricauda*, mediante el método de interpolación lineal en una gráfica de porcentaje de inhibición del crecimiento algal versus concentración de HAP sedimento/suelo (USEPA, 2002) y análisis Probit (Akçay, 2013).

6.3. Resultados

6.3.1. Ensayo 1: Incubaciones de sedimentos y suelos contaminados con diferentes HAPs

A continuación se describen los resultados obtenidos en el ensayo incubando muestras de sedimentos/suelos contaminadas artificialmente con HAPs y agua del embalse filtrada:

Sedimentos

El pH de la fase acuosa mostró una disminución ($p < 0,05$) luego de 2 días de incubación para los tratamientos con HAPs: 7,83 ($\pm 0,03$), en relación con el valor del control sin agregado de los mismos: 8,00 ($\pm 0,02$).

Las concentraciones de PT, NT y $N-NO_3^- + N-NO_2^-$ en solución, luego del ensayo, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con el control.

Las concentraciones de PRS en la fase acuosa, luego de la incubación con sedimentos contaminados con diferentes HAPs (Figura 52), mostraron variaciones respecto al control, dependiendo del tipo de HAP. Se compararon los promedios de concentración de PRS para las diferentes concentraciones ensayadas para cada HAP y el control. El tratamiento con Ant no mostró efectos significativos sobre la concentración de PRS, en comparación con el tratamiento control, mientras que la liberación de PRS a la columna de agua mostró una disminución para los tratamientos con 1000 ppm_{ss} de Pir, 1000 ppm_{ss} de Fen, y 50 y 500 ppm_{ss} de BaA ($p < 0,05$).

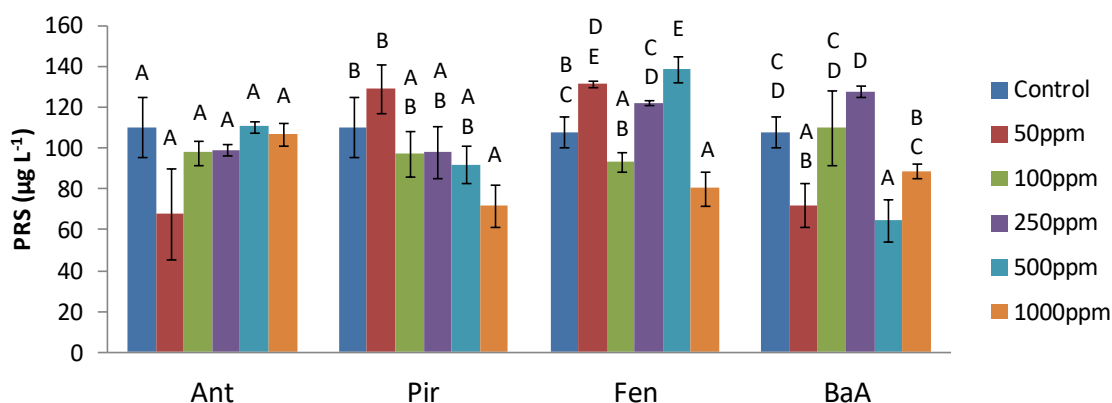


Figura 52: PRS en solución luego de 2 días, en el ensayo 1 con sedimentos contaminados con diferentes concentraciones (control - 1000 ppm_{ss}) de antraceno (Ant), pireno (Pir), fenantreno (Fen) ó benzo(a)antraceno (BaA). Las medias con una letra en común no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

En la Figura 53 se representan las concentraciones de $N-NH_4^+$ en solución luego del ensayo con los diferentes HAPs en sedimentos. Las medias se compararon, para cada HAP, entre sus diferentes concentraciones. No se observaron efectos significativos en los sistemas con Ant, sin embargo, en los tratamientos con los otros HAPs, se observó una disminución en la concentración de $N-NH_4^+$ para los ensayos con 1000 ppm_{ss} de Pir, 1000 ppm_{ss} de Fen, y 50, 250 y 1000 ppm_{ss} de BaA ($p < 0,05$).

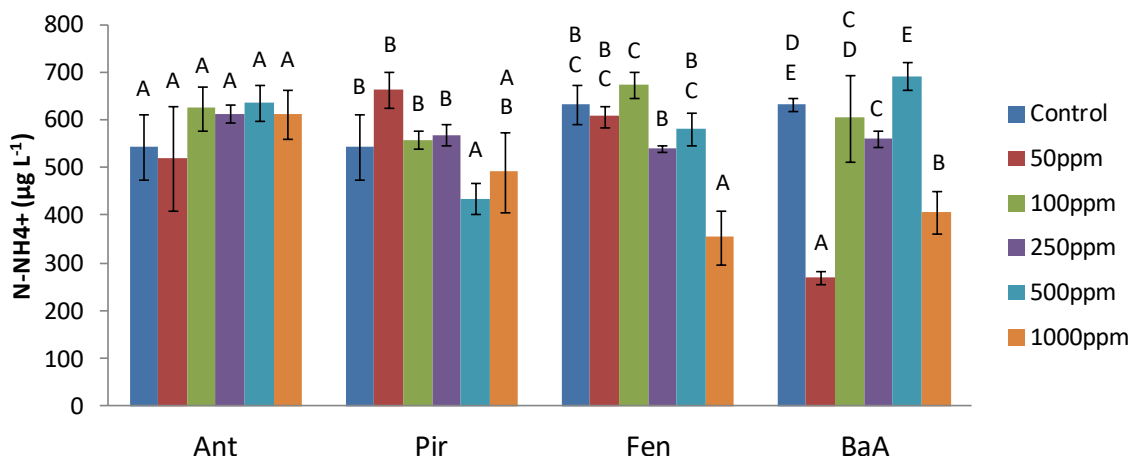


Figura 53: N-NH₄⁺ en solución luego de 2 días, en el ensayo 1 con sedimentos contaminados con diferentes concentraciones (control - 1000 ppm_{ss}) de antraceno (Ant), pireno (Pir), fenantreno (Fen) ó benzo(a)antraceno (BaA). Las medias con una letra en común no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

Suelos

En el caso del ensayo con suelos contaminados, se observaron valores promedio de $14,6 \pm (4,2) \mu\text{g L}^{-1}$ de PRS y $9,3 (\pm 3,9) \mu\text{g L}^{-1}$ de N-NH₄⁺, sin diferencias significativas entre controles y tratamientos en ambos casos ($p > 0,05$).

6.3.1.1. Isotermas de fijación de fósforo en los sedimentos

La Figura 54 muestra los resultados de las incubaciones de los sedimentos, contaminados con Fen ó BaA, con soluciones de concentraciones crecientes de P, graficados en función de las isotermas de Freundlich y Langmuir. La correlación entre el $P_o + P_{ads}$ y el P_{dis} , una vez alcanzado el equilibrio, fue de 0,82, 0,92 y 0,91 para el control, Fen y BaA, respectivamente, ajustándose ambos parámetros a la isoterma de Freundlich, y de 0,99 en todos los casos para las isotermas de Langmuir. A partir de las ecuaciones obtenidas para cada isoterma, se estimó la fijación máxima de P de cada sedimento ($P_{m\acute{a}x}$), resultando ésta de $1290 (\pm 7) \mu\text{g g}^{-1}$ (Freundlich) y $1422 (\pm 12) \mu\text{g g}^{-1}$ (Langmuir) y sin diferencias significativas entre el control y los tratamientos con Fen ó BaA ($p > 0,05$). Los porcentajes de retención fueron de $21,7 (\pm 0,6) \%$ (Freundlich) y $28,7 (\pm 0,6) \%$ (Langmuir), y la constante de energía de unión del fósforo con el sedimento (K) de 0,0043.

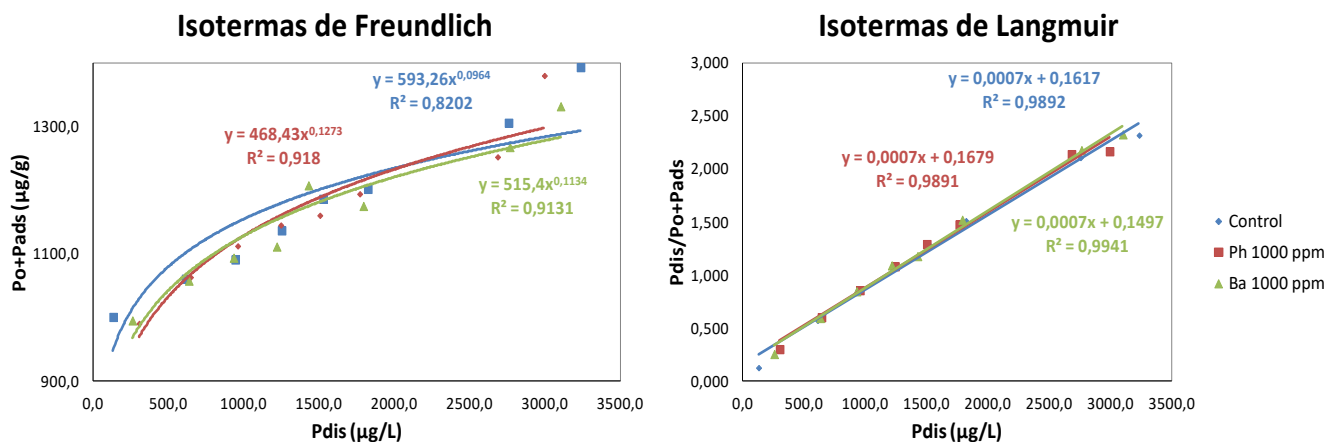


Figura 54: Isothermas de Freundlich (izquierda) y Langmuir (derecha) para la fijación de fósforo en los sedimentos contaminados en el ensayo 1 con Fen y BaA (1000 ppm_{ss}) y sedimentos sin agregado de HAP (Control). Las ecuaciones corresponden a las curvas de las isothermas: azul = control, rojo = Fen 1000 ppm_{ss} y verde = BaA 1000 ppm_{ss}.

6.3.1.2. Determinación de capacidad de intercambio catiónico (CIC) de los sedimentos contaminados

Los valores de CIC para los sedimentos contaminados con cada uno de los HAPs no presentaron diferencias significativas con los valores analizados en sedimentos sin agregado de HAPs (control) ($p > 0,05$), con un valor promedio de $220 (\pm 30) \text{ meq Kg}^{-1}_{\text{ss}}$.

6.3.2. Ensayo 2: Bioensayo con ensamble algal natural y fenantreno

A continuación se detallan los resultados obtenidos luego del ensayo incubando un ensamble algal natural del embalse Los Barreales con sedimentos contaminados con fenantreno.

El cultivo inicial de fitoplancton nativo utilizado en el ensayo 2 estuvo conformado por: *S. quadricauda* (49,0 %), *Monoraphidium* sp. (22,9 %), *Chlorella* sp. (6,6 %) y *Selenastrum* sp. (1,4 %), así como también cianofitas (*Oscillatoria* sp., 17,0 %) y diatomeas (*Nitzschia* sp., 3,0 %).

Sedimentos

Las abundancias algales obtenidas en el bioensayo 2 se representan en la Figura 55 (panel izquierdo). Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los tratamientos con 500 y 1000 ppm_{ss} de Fen, en comparación con el control, después de 7 días de incubación. Sin embargo, no ocurrió lo mismo después de 14 días ($p > 0,05$). En la Figura 55 (panel derecho) se representan las concentraciones de clorofila "a", que mostraron la misma tendencia que la abundancia algal, con una disminución en el día 7 de incubación para todos los agregados de Fen, respecto al control ($p < 0,05$), y sin diferencias entre ningún tratamiento luego de 14 días ($p > 0,05$). En ambos casos las medias se compararon, para cada día de incubación, entre las diferentes concentraciones de Fen.

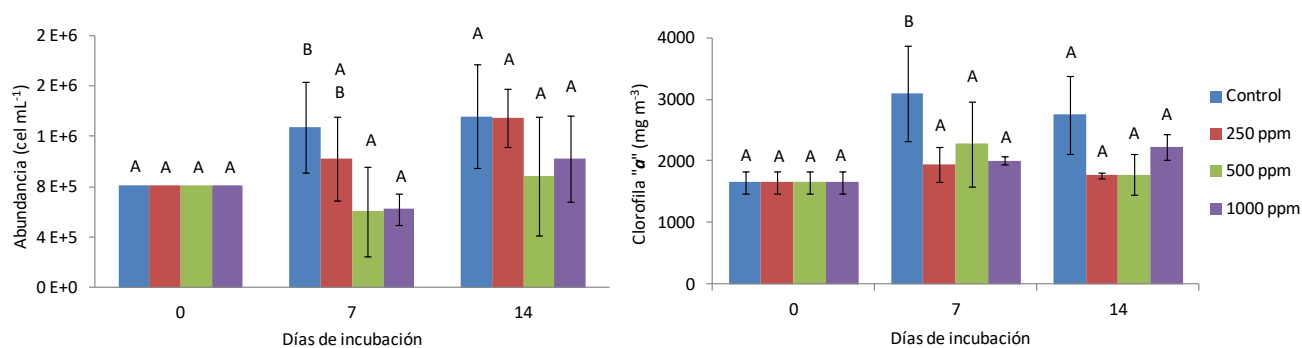


Figura 55: Abundancia algal (izquierda) y clorofila "a" (derecha) en el ensayo 2, para cada concentración de Fen en sedimentos, a diferentes días de incubación. Las medias con una letra en común no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Dentro del grupo de especies algales que conformaron el cultivo utilizado en el ensayo 2, *S. quadricauda* resultó la única especie que: sensible a la contaminación con Fen en los sedimentos, su abundancia disminuyó en los tratamientos con 500 y 1000 ppm_{ss} ($p < 0,05$) en relación al control, luego de 2 días (Figura 56). Cabe mencionar que las abundancias relativas en el control a los 7 y 14 días de incubación resultaron mayores a la observada en el día 0 ($p < 0,05$).

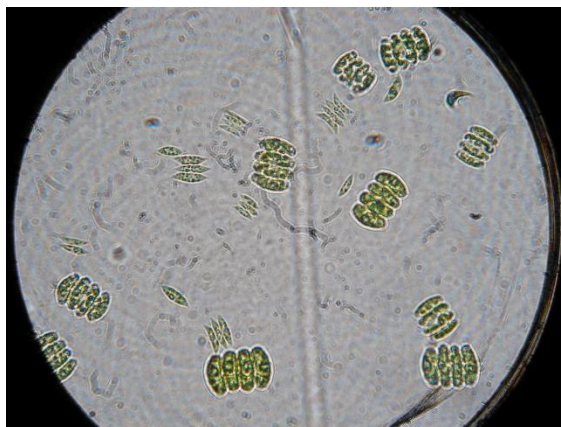


Figura 56: Microfotografía (400X) de *Scenedesmus quadricauda*.

Las abundancias de *S. quadricauda* en los días 0, 7 y 14 luego de los ensayos con diferentes agregados de Fen en sedimentos están representadas en la Figura 57. Las medias se compararon, para cada período de incubación, entre las diferentes concentraciones de Fen. La abundancia total de *S. quadricauda* disminuyó significativamente respecto al control en los tratamientos con 500 y 1000 ppm_{SS} ($p < 0.05$). Se estimó la LC50-7d para *S. quadricauda* a partir de la relación entre la abundancia algal y la concentración de Fen, resultando en 258 ppm_{SS} de Fen.

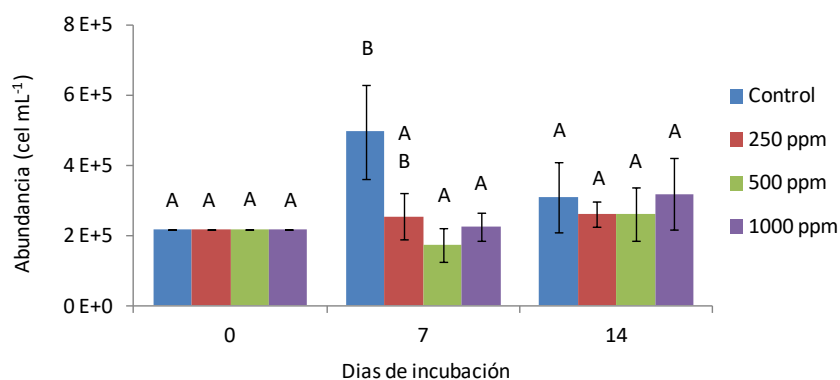


Figura 57: Abundancia de *S. quadricauda* en el ensayo 2, a diferentes tiempos de incubación. Las medias se compararon, para cada día de incubación, entre las diferentes concentraciones de Fen en sedimentos. Las medias con una letra en común no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.3.3. Ensayo 3: Bioensayo con *S. quadricauda* y diferentes HAPs en sedimentos/suelos

En este ensayo se buscó evaluar la respuesta de *S. quadricauda* a la contaminación en sedimentos y suelos con diferentes HAPs.

Sedimentos

Los valores de abundancia de *S. quadricauda* resultantes de los tratamientos con concentraciones crecientes de diferentes HAPs en sedimentos se muestran en la Figura 58. Las medias se compararon, para cada día de incubación, entre las diferentes concentraciones de cada HAP. Los tratamientos con Ant no presentaron diferencias significativas con el control ($p > 0,05$). Sin embargo, sí se observaron variaciones en los tratamientos con Pir el día 7 (1000 ppm_{ss}), Fen el día 2 (1000 ppm_{ss}) y el día 7 (desde 250 ppm_{ss}), y BaA los días 2 y 7 para todas las concentraciones ensayadas ($p < 0,05$). Se registró un comportamiento similar al analizar la concentración de clorofila "a". Luego de 2 días se observó una disminución significativa para 1000 ppm_{ss} de Pir: 14,3 ($\pm 2,5$) mg m⁻³, 1000 ppm_{ss} de Fen: 18,4 ($\pm 4,4$) mg m⁻³, y desde 50 ppm_{ss} de BaA: 1,5 ($\pm 1,2$) mg m⁻³, en comparación con el control: 30,4 ($\pm 0,8$) mg m⁻³ ($p < 0,05$). A los 7 días, los ensayos con 1000 ppm_{ss} de Pir: 111,6 ($\pm 44,7$) mg m⁻³, desde 500 ppm_{ss} de Fen: 30,0 ($\pm 18,0$) mg m⁻³ y desde 50 ppm_{ss} de BaA: 1,1 ($\pm 0,1$) mg m⁻³ mostraron concentraciones de clorofila "a" menores al control: 231,4 ($\pm 22,2$) mg m⁻³ ($p < 0,05$). Las LC50-2 y LC50-7 se estimaron para los tratamientos con HAPs que presentaron una reducción en la abundancia algal de al menos 50 % en comparación con los valores del control, resultando para Fen 365 y 263 ppm_{ss}, respectivamente, y para BaA < 50 ppm_{ss} para ambas concentraciones (Anexo IV).

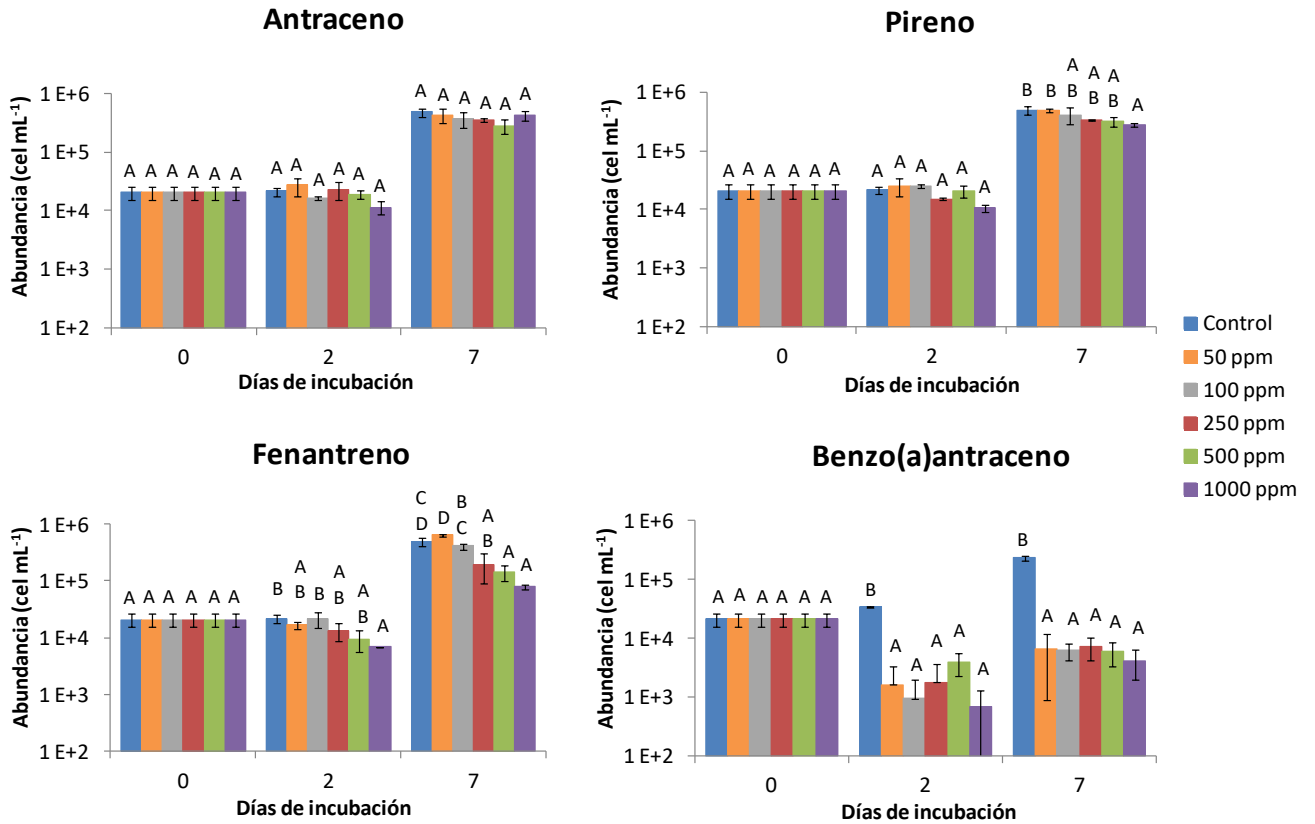


Figura 58: Abundancia de *S. quadricauda* en el ensayo 3, para los diferentes tratamientos con HAPs en sedimentos, a diferentes tiempos de incubación. Las medias con una letra en común no presentaron variaciones significativas ($p > 0,05$).

Suelos

La abundancia de *S. quadricauda* luego del ensayo con suelos contaminados con diferentes HAPs se presenta en la Figura 59. Las medias se compararon, para cada día de incubación, entre las diferentes concentraciones de cada HAP. Se observó una disminución ($p < 0,05$) en las abundancias sólo en el caso de los tratamientos con Fen, para todas sus concentraciones (250 - 1000 ppm_{ss}), en relación con el control (Figura 59). Sin embargo, aunque no resultó estadísticamente significativa, Pir mostró una tendencia similar para dosis de 500 y 1000 ppm_{ss}. Por otro lado, las concentraciones de clorofila “a”, al finalizar este ensayo, no presentaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control, para ninguno de los HAPs agregados a los suelos ($p > 0,05$).

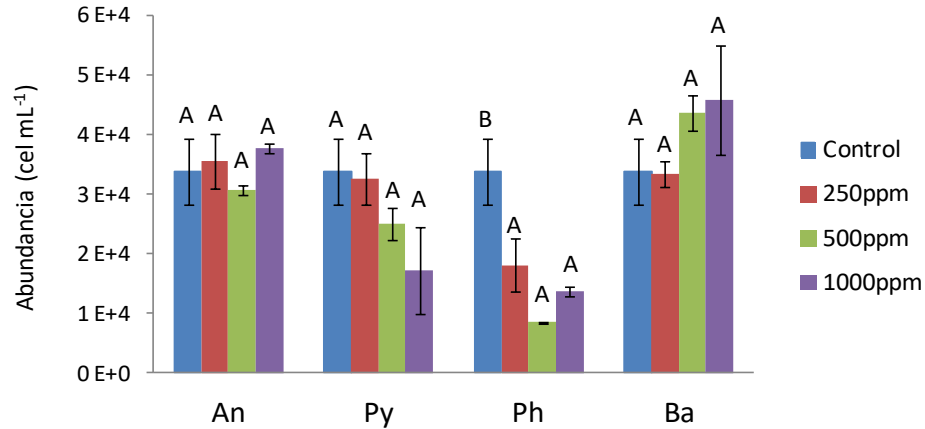


Figura 59: Abundancia de *S. quadricauda* en el ensayo 3 con suelos contaminados con diferentes concentraciones (control - 1000 ppm_{ss}) de antraceno (Ant), pireno (Pir), fenantreno (Fen) ó benzo(a)antraceno (BaA). Las medias con una letra en común no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.3.3.1. Estimación del coeficiente de partición de los HAPs

Las fracciones de HAPs asociados a la fase algal, en relación con el total inicialmente presente en los sedimentos/suelos del **ensayo 3**, se muestran en la Tabla 11, junto con los diferentes parámetros fisicoquímicos correspondientes a los HAPs, y en la Tabla 12 los valores estimados que fueron utilizados para el cálculo del coeficiente de partición. Estos coeficientes fueron similares para todos los HAPs ensayados, y oscilaron entre el 44 % (Ant) y 52 % (BaA) de la concentración total inicial de HAP. Estos valores fueron similares en los sedimentos y en los suelos, posiblemente debido a que ambos sustratos presentaron el mismo porcentaje de CT (Capítulo I, sección 5.3.2.).

Tabla 11: Parámetros fisicoquímicos de los HAPs utilizados en este trabajo (Antraceno (Ant), Pireno (Pir), Fenantreno (Fen) y Benzo(a)antraceno (BaA)), y los coeficientes de partición estimados para el ensayo 3 (N_a/N_s).

HAP	$\log K_{ow}^a$	S (mg.L ⁻¹) ^(a)	$\log K_{oc}^{(b)}$	$\log K_{sw}$	$\log K_{tw}^{(c)}$	$\log K_{aw/lipid}^{(d)}$	$\log K_{aw}$	m_a (g)	m_s (g)	N_a/N_s
Ant	4,54	0,045	4,33	2,03	4,44	4,50	3,63	0,01	0,50	0,44
Pir	5,18	0,132	4,97	2,67	5,16	5,21	4,33	0,01	0,50	0,48
Fen	4,57	1,100	4,36	2,06	4,48	4,54	3,66	0,01	0,50	0,45
BaA	5,91	0,011	5,70	3,40	5,98	6,01	5,14	0,01	0,50	0,52

^(a) Mackay *et al.* (1998); ^(b) Karickhoff *et al.* (1979); ^(c) a partir de ecuación (2); ^(d) a partir de ecuación (3).

Tabla 12: Parámetros estimados para el cálculo del coeficiente de partición.

Parámetro	Valor/fórmula
Coefficiente de partición superficie algal : agua (K_{aw})	$K_{aw/lipido} \cdot f_l^{(1)}$
Fracción de lípidos en célula algal (f_l)	0,136 ⁽¹⁾
Coefficiente de partición sedimentos : agua (K_{sw})	$K_{oc} \cdot f_{oc}^{(2)}$
Fracción de carbono orgánico en sedimentos (f_{oc})	0,26 ⁽³⁾

(1) Hung *et al.* (2014) para *Chlorella sorokiniana*.

(2) Karickhoff *et al.* (1978)

(3) Mussini *et al.* (1984)

6.3.4. Ensayo 4: Bioensayo con *S. quadricauda* y agua contaminada con diferentes HAPs

El ensayo 4 se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la respuesta de *S. quadricauda* a la contaminación por HAPs en agua, sin la presencia de sedimentos o suelos.

Como resultado del bioensayo con agua contaminada con HAPs, se observó, para todas las concentraciones de los HAPs utilizados, una disminución significativa de la abundancia de *S. quadricauda* ($p < 0,05$) de aproximadamente un 50 % en relación con el control. Los valores de la abundancia algal en los sistemas con agregado de HAPs (promedio entre los ensayos con distintas concentraciones de cada HAP) fue de $6,6 \cdot 10^4$ ($\pm 1,6 \cdot 10^4$) cél mL⁻¹ (Ant), $7,9 \cdot 10^4$ ($\pm 1,3 \cdot 10^4$) cél mL⁻¹ (Pir), $6,1 \cdot 10^4$ ($\pm 1 \cdot 10^4$) cél mL⁻¹ (Fen) y $7,3 \cdot 10^4$ ($\pm 1,9 \cdot 10^4$) cél mL⁻¹

(BaA), mientras que el control sin agregado de HAPs mostró una abundancia algal de $1,5 \cdot 10^5 (\pm 2,5 \cdot 10^4)$ cél μL^{-1} .

6.3.5. Ensayo 5: Bioensayo con *S. quadricauda* y petróleo crudo en sedimentos

A continuación se describen los resultados obtenidos luego del ensayo con *S. quadricauda* y sedimentos contaminados con petróleo crudo.

El pH de la fase acuosa de los sistemas del bioensayo 5, luego de 2 días de incubación, presentó una disminución significativa ($p < 0,05$) en los tratamientos ($8,0 \pm 0,1$) respecto al control ($8,4 \pm 0,1$) y al valor inicial al día 0 ($8,5 \pm 0,1$). Sin embargo, al cabo de 7 días de incubación, no se observaron diferencias entre tratamientos y control ($p > 0,05$), con un promedio de $8,0 \pm 0,1$. Una tendencia similar se observó en el caso de los valores de ORP en el sobrenadante, que mostraron una disminución ($p < 0,05$), luego de 2 días, para los tratamientos: $-54 (\pm 7)$ mV, respecto al control: $-74 (\pm 5)$ mV, y al valor inicial al día 0: $-84 (\pm 7)$ mV, y sin diferencias entre control y tratamientos luego de 7 días ($p > 0,05$), con un promedio de $-50 (\pm 3)$ mV. Las concentraciones de oxígeno disuelto no difirieron entre el control y los tratamientos a lo largo del ensayo ($p > 0,05$), con valores de $238 (\pm 5)$ y $358 (\pm 19)$ mmol L^{-1} de O_2 a los 2 y 7 días de incubación, respectivamente.

La abundancia de *S. quadricauda* en las incubaciones con sedimentos contaminados con petróleo mostró valores menores al control para todas las concentraciones ensayadas (250-1000 ppm_{ss}) ($p < 0,05$), luego de 2 días de incubación. Mientras que, al cabo de los 7 días de ensayo, sólo el tratamiento con 1000 ppm_{ss} de petróleo presenató diferencias significativas de abundancia respecto del control ($p < 0,05$) (Figura 60). Por otro lado, las concentraciones de clorofila "a" no mostraron diferencias ($p > 0,05$) entre control y tratamientos a los 2 días de incubación, mientras que luego de 7 días de ensayo todos los tratamientos presentaron valores menores ($p < 0,05$) a los observados en el control (Figura 60). Las medias se compararon, para cada día de incubación, entre las diferentes concentraciones de petróleo.

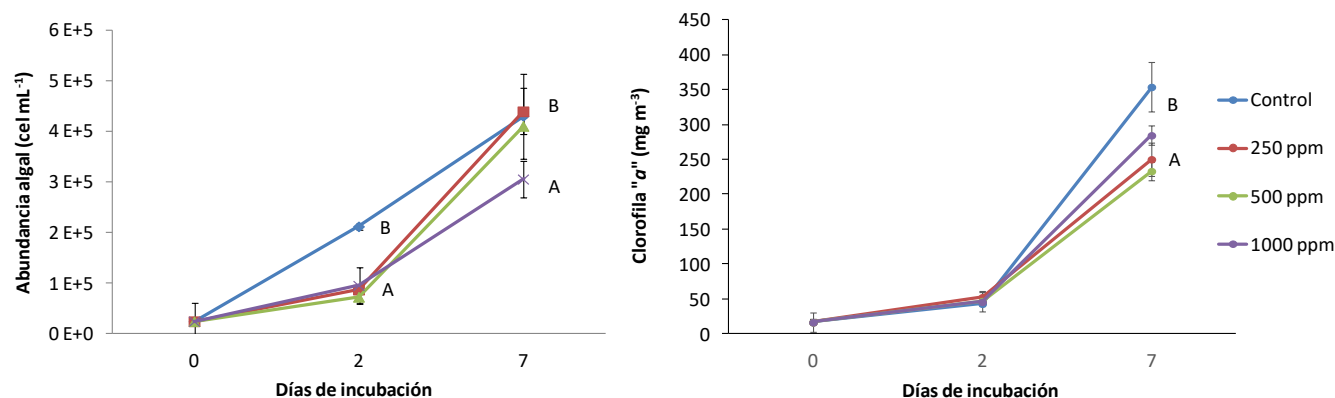


Figura 60: Abundancia de *S. quadricauda* (izquierda) y concentración de clorofila "a" (derecha) en el bioensayo 5, para las diferentes concentraciones de petróleo en sedimentos a diferentes tiempos de incubación. Las medias con diferente letra presentan diferencias ($p < 0,05$). Los tratamientos sin letras no presentan variaciones significativas entre ninguna de sus concentraciones ensayadas ($p > 0,05$).

6.4. Discusión

La contaminación por HAPs en sedimentos produjo un descenso del pH de la fase acuosa de los sistemas, como fue observado para el caso de los sedimentos contaminados con petróleo crudo (bioensayo 5). Este comportamiento del pH ha sido mencionado en trabajos previos sobre contaminación con HAPs, por ejemplo por Amezcua–Allieri *et al.* (2005) en suelos contaminados con Fen. Por otro lado, la contaminación con tres de los cuatro HAPs utilizados en esta tesis también condujo a una menor disponibilidad de nutrientes en solución (PRS y/o $N-NH_4^+$). En este sentido, las isotermas de fijación de P analizadas para los sedimentos del embalse Los Barreales contaminados con Fen y BaA no difirieron en la capacidad de fijación, respecto al control, por lo que se rechazó la hipótesis de variación de fijación de este nutriente por modificaciones en la capacidad de adsorción de los sedimentos. Asimismo, los sedimentos contaminados tampoco presentaron un incremento de la CIC que pudiera afectar la retención de nutrientes. Una posible explicación para las variaciones observadas en el PRS y el $N-NH_4^+$ estaría relacionada con la actividad de la comunidad bacteriana. En sitios contaminados, donde los niveles de carbono orgánico son a menudo mayores a los de un sedimento sin contaminar, debido a la naturaleza de los HAPs, los

nutrientes disponibles (N / P) pueden agotarse rápidamente debido a la utilización por parte de las bacterias (Breedveld y Sparrevik, 2000).

En el caso del ensayo realizado con suelos contaminados, las concentraciones de PRS y $N-NH_4^+$ en solución fueron del orden de 10 y 100 veces inferiores a las observadas en los ensayos con sedimentos, respectivamente. Tampoco se observó el mismo efecto de los HAPs sobre la disponibilidad de estos nutrientes descrita en los ensayos con sedimentos. Estas menores concentraciones en solución en los ensayos con suelos responderían al menor contenido inicial de nutrientes de los mismos, en comparación a los sedimentos del embalse, con porcentajes promedio de PT y NT 2 y 5 veces superiores a los suelos, respectivamente (Capítulo I, sección 5.3.2.).

El efecto negativo del Fen sobre el fitoplancton nativo del embalse se observó principalmente en la abundancia de *S. quadricauda* (especie dominante en el ensamble fitoplanctónico nativo utilizado en los ensayos), la cual disminuyó alrededor del 60 % respecto al control. En este sentido, investigaciones previas han demostrado que varias especies de este género son sensibles a la contaminación por HAPs (Zachleder y Tukaj, 1993; Aksmann y Tukaj, 2004). Por otro lado, la desaparición de los efectos negativos del Fen sobre la abundancia algal, luego de 14 días de incubación, sugiere que el tiempo de incubación total aplicado resultó demasiado extendido. En este sentido, Nyholm *et al.* (1989) y USEPA (2012) sugirieron tiempos promedios de 72 y máximos de 96 hs para este tipo de ensayos (en condiciones de crecimiento exponencial), dado que una mayor duración conlleva a una disminución en la toxicidad aparente. Esto respondería a que un incremento de la biomasa algal limitaría la disponibilidad dióxido de carbono y/o luz, afectaría el pH y la detoxificación por degradación o adsorción de los contaminantes a las membranas biológicas (Nyholm *et al.*, 1989). Teniendo en cuenta estos aspectos, se decidió realizar los ensayos posteriores con *S. quadricauda* en incubaciones de 7 días con una medición intermedia a los 2 días.

Los tratamientos con Ant en sedimentos no mostraron efectos sobre *S. quadricauda*, mientras que, el agregado de Pir afectó negativamente sobre su

abundancia, aunque sólo a la concentración más alta ensayada (1000 ppm_{ss}). La contaminación de sedimentos con BaA tuvo un efecto negativo más acentuado sobre la abundancia de algas y sobre la clorofila "a" que el resto de los HAPs ensayados. Este HAP afectó la abundancia algal a la concentración más baja utilizada (50 ppm_{ss}). Asimismo, el efecto del BaA fue significativo al día 2 de incubación, para todas las concentraciones evaluadas, a la vez que su cinética de toxicidad fue más rápida que la de los otros HAPs analizados. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores que indicaron que el Ba es uno de los HAPs más tóxicos para las algas (Bastian y Toetz, 1982; Nagpal, 1993; WHO, 2004). Los niveles de toxicidad encontrados en la literatura para Fen, Ant y Pir varían ampliamente, dependiendo de las condiciones del bioensayo y las especies utilizadas (Milleman *et al.*, 1984; Gala y Giesy, 1994; Okay, 2002; Aksmann y Tukaj, 2004; Echeveste *et al.*, 2010). Las variaciones de efecto sobre el fitoplancton de los HAPs utilizados pueden explicarse por las diferencias estructurales en sus moléculas, tanto por el número de anillos aromáticos como por su complejidad estructural. La toxicidad aumenta con el número de anillos (Millemann *et al.*, 1984; Nagpal, 1993; WHO, 2004; Engraff *et al.*, 2011; Seiler *et al.*, 2014), resultando que los compuestos con cuatro anillos (Pir y BaA) son más tóxicos que aquellos con tres (Ant y Fen), y también con estructuras menos lineales, con "regiones de bahía" (Fen y BaA) (Boström *et al.*, 2002). *S. quadricauda* mostró la misma respuesta a la contaminación por Fen, tanto como parte del ensamble de fitoplancton nativo (ensayo 2) como en el ensayo con cultivos monoespecíficos (ensayo 3), con un LC50-7d promedio estimado de 260 (± 2) ppm_{ss}, en ambos casos.

Los coeficientes de partición estimados en el bioensayo 3 mostraron un claro efecto de los sedimentos/suelos sobre la disponibilidad de los HAPs, a pesar de que los sedimentos/suelos presentan menor afinidad por los HAPs que las células algales ($K_{sw} < K_{aw}$, Tabla 11). Esto probablemente se debió a que en estos ensayos los sedimentos/suelos presentaron una masa cincuenta veces mayor que la algal. Además, Smedes *et al.* (2013) encontraron que existe una fracción del total de HAPs en los sedimentos (al menos del 50 %) que es "inaccesible", es

decir, no está disponible para su liberación. Teniendo esto en cuenta, las concentraciones de HAPs en la superficie algal en el ensayo 3 resultarían aún menores a las estimadas, apoyando aún más la idea de retención de los HAPs por parte de los sedimentos/suelos en este ensayo. Los resultados expuestos son una primera aproximación al coeficiente de partición, estimado a partir de datos obtenidos por otros autores (Tabla 12), aunque podría determinarse experimentalmente para estos sistemas en el futuro.

Este efecto observado sobre el fitoplancton en ensayos con sedimentos/suelos contaminados contrastó con el mayor efecto negativo de todos los HAPs sobre la abundancia de *S. quadricauda* en el ensayo 4 con agua contaminada. Esto se debería a un fraccionamiento diferencial de los HAPs hacia la superficie de las algas, debido a la baja solubilidad en agua de los mismos (Tabla 11). En el ensayo 3, cuando la biodisponibilidad de HAPs fue menor, los efectos negativos diferenciales entre los HAPs estudiados parecieron depender principalmente de la toxicidad de los mismos, mientras que en el bioensayo 4, con una mayor biodisponibilidad de HAPs para las células algales, los cuatro hidrocarburos utilizados mostraron el mismo efecto nocivo sobre *S. quadricauda*. En el caso del ensayo realizado con suelos contaminados, se observó un efecto menor de los HAPs sobre el crecimiento algal menor en comparación con los ensayos con sedimentos contaminados. Sólo los suelos contaminados con Fen afectaron el crecimiento de *S. quadricauda*.

Los resultados mostraron que las disminuciones de la abundancia algal en los ensayos 2 y 3 fueron producto de la acción directa de los HAPs, y no con un efecto indirecto a través de variaciones en los nutrientes del agua. Estas observaciones se corresponden con lo demostrado por Del Vento y Dachs (2002) y Aksmann y Tukaj (2004). En el ensayo 4 se observó una influencia negativa de la contaminación por HAPs sobre la abundancia algal para todos los HAPs utilizados, y en concentraciones más bajas que las que aquellos que mostraron efectos nocivos en los bioensayos con sedimentos (ensayos 2 y 3). Este efecto menor en los bioensayos con sedimentos contaminados se debe a que la adsorción de los HAPs en los sedimentos reduce su biodisponibilidad (Adams *et al.*, 1985; Swartz

et al., 1989). Esta reducción se reflejó en los porcentajes de HAPs disponibles para la adsorción sobre las algas, estimados en el ensayo 3 mediante el cálculo del índice de partición.

El bioensayo realizado con sedimentos contaminados con petróleo crudo mostró, al igual que en el caso de sedimentos con HAPs (ensayo 1), un descenso del pH de la fase acuosa luego de dos días de incubación. Una tendencia similar se observó en el caso del ORP que, de acuerdo con Alba (2011), se debería también a la obstrucción de intercambio de iones entre sedimentos y solución acuosa. Asimismo, se observó un efecto negativo sobre el crecimiento de *S. quadricauda*, evidenciado en primer lugar (al día 2 de incubación) en su abundancia, mientras que sobre la concentración de clorofila “a” se registró luego de 7 días de incubación. Estas diferencias en la respuesta de distintos parámetros de crecimiento o estado fisiológico algal, ha sido observado previamente en otros trabajos (O’Brien y Dixon, 1976; El-Dib *et al.*, 2001). Estos autores encontraron que el efecto sobre las microalgas es dependiente tanto de la especie en estudio como de la composición del crudo, ya que la respuesta fisiológica algal puede variar incluso en el mismo ensayo debido a adaptaciones de las algas, así como también a la desaparición de compuestos volátiles, teniendo en cuenta que el petróleo es una mezcla compleja de sustancias con diferentes toxicidades (IAPG, 2001).

En este sentido, Zambrano y Carballeira (1999) proponen que el mejor indicador del estrés debido a la exposición a hidrocarburos de petróleo es la tasa de fotosíntesis. En relación con las fracciones del petróleo, varios autores han demostrado que las fracciones volátiles y solubles del mismo presentan una toxicidad aguda sobre el fitoplancton, observándose efectos negativos en la etapa de crecimiento exponencial (promedio 72 hs). Kauss y Hutchinson (1970) observaron que el crecimiento de *Chlorella vulgaris* se vió afectado en las primeras 72 hs de exposición a agua contaminada con petróleo, aunque posteriormente se produjo una recuperación de la comunidad a valores similares a los del control. Otros autores evaluaron el efecto de la fracción soluble del petróleo sobre el crecimiento de varias especies algales: por ejemplo, Siron *et al.* (1991)

encontraron que concentraciones de entre 0,2 y 15,3 ppm de la fracción soluble del petróleo en agua (ppm_a) afectaron el crecimiento de las especies *Phaeodactylum tricornutum* y *Dunaliella tertiolecta*, mientras que Lei *et al.* (2002) demostraron que el crecimiento de *Gymnodinium* sp., *Nitzschia closterium*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella vulgaris* y *Platymonas subcordiformis* fue afectado por concentraciones de hidrocarburos mayores a 1,05 ppm_a . En el caso de hidrocarburos presentes en la matriz de suelo, Megharaj *et al.* (2000) mostraron que *Chlorococcum* sp. y *Scenedesmus* sp. fueron sensibles a concentraciones de hidrocarburos totales superiores a 5000 ppm_{ss} .

Considerando la composición del petróleo crudo utilizado en el ensayo 5 (Anexo III), las cantidades de HAPs presentes en los sedimentos contaminados fueron 100 veces menores a las utilizadas en los bioensayos con HAPs (ensayos 2 y 3). Sin embargo, es necesario considerar la toxicidad intrínseca de la gran cantidad de compuestos presentes en la compleja mezcla de petróleo, al comparar los efectos tóxicos de los sedimentos de ambos ensayos (IAPG, 2001).

6.5. Conclusiones

La contaminación por HAPs en los sedimentos del embalse de Los Barreales disminuyó la liberación de nutrientes a la columna de agua y el crecimiento del alga nativa *S. quadricauda* en concentraciones de 1000 ppm_{ss} en el caso del Pir, 250 ppm_{ss} para el Fen, y al menos 50 ppm_{ss} para el BaA. Por otro lado, la contaminación con petróleo crudo sobre los mismos sedimentos presentó efectos negativos sobre el crecimiento algal, a concentraciones desde 250 ppm_{ss} . Asimismo, *S. quadricauda* fue sensible a la contaminación de los suelos del embalse con concentraciones mínimas de 250 ppm_{ss} de Fen.

Estos resultados indican que los bioensayos con especies de algas autóctonas del embalse son útiles para detectar el efecto de la contaminación por HAPs en los sedimentos y suelos, y constituyen el primer enfoque para crear una herramienta de monitoreo para evaluar el efecto de los derrames de petróleo en la cuenca hidrográfica de Vaca Muerta. En este sentido, las condiciones experimentales de este trabajo correspondieron a concentraciones de HAPs muy

elevadas para un ambiente natural, representando niveles que se podrían encontrar en sitios crónicamente afectados por la actividad petrolera.

Capítulo III

Evaluación de los efectos de diferentes estrategias de remediación química *in situ*, utilización de algas nativas del embalse

Los Barreales como indicadores de efectividad de remediación

7.1. Introducción

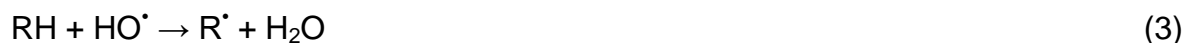
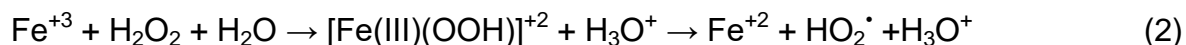
7.1.1. Remediación química *in situ* (ISCO)

Las estrategias de remediación representan un campo de investigación muy importante en materia de restauración de sitios afectados (Aprill y Sims, 1990; Baud-Grasset *et al.*, 1993; Bennett, 1995; Germida *et al.*, 2002; Gerhardt *et al.*, 2009). Una de las tecnologías más aceptadas para el tratamiento de sitios contaminados con HAPs es la bioremediación, aunque presenta ciertas limitaciones en la degradación de compuestos complejos aromáticos. Sin embargo, las tecnologías de oxidación química se han convertido en una alternativa promisoría para el tratamiento de suelos contaminados con HAPs, debido a su alta eficiencia de eliminación del contaminante en un tiempo relativamente corto. Además, permiten su combinación con técnicas de biorremediación para lograr una completa recuperación del suelo (de Souza e Silva *et al.*, 2009).

Los procesos de oxidación química *in situ* (ISCO, por su sigla en inglés) consisten en la inyección de oxidantes tanto en suelos como en el agua subterránea de la zona contaminada. Las técnicas de ISCO han sido aplicadas tanto en suelos, mediante una suspensión de la fase sólida en el oxidante líquido ó “slurry” (Oprea *et al.*, 2009), así como también en aguas subterráneas mediante el bombeo y tratamiento (pump and treat) ó la inyección de oxidantes (Ordóñez Suarez, 2001; Baciocchi *et al.*, 2014). En el caso de sedimentos, la tecnología de remediación se ha aplicado en sedimentos de canales y ríos mediante previa extracción de los mismos (Bursztyn Fuentes *et al.*, 2018; Usman *et al.*, 2018), aunque su utilización en grandes cuerpos de agua no ha sido desarrollada hasta el momento. Se han utilizado diferentes formas de oxidantes para ISCO, algunos de ellos con resultados muy alentadores, por ejemplo, el reactivo de Fenton: peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e ión ferroso (Fe^{+2}), el ión persulfato ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) y el ión permanganato (MnO_4^-) (Huling y Pivetz, 2006).

7.1.1.1. Reactivo de Fenton (FN)

Los procesos FN han sido ampliamente estudiados como métodos de remediación. Esta técnica emplea sales de hierro para descomponer el peróxido de hidrógeno generando especies de oxígeno altamente reactivas (radical hidroxilo, OH[•]) que atacan la materia orgánica de manera no específica. La producción de OH[•] ocurre principalmente mediante la oxidación de Fe⁺² por el peróxido de hidrógeno de acuerdo con la reacción (1). Aunque la reacción general implicada en el proceso de mineralización puede ser bastante compleja y otras especies químicas tales como el FeO podrían contribuir al proceso de oxidación, está ampliamente aceptado que la oxidación de los sustratos orgánicos (R) en los sistemas FN está acoplada con la generación de OH[•] mediante la descomposición catalítica de H₂O₂ en medio ácido (pH ~ 3), según las reacciones (1) a (5) (Nichela *et al.*, 2010):



El pH del medio de la reacción es importante en la disponibilidad tanto del Fe⁺² como Fe⁺³, que necesitan condiciones ácidas para estar disponibles como activantes y no precipitar. Debido a que tanto Fe⁺² como Fe⁺³ se encuentran involucrados en el ciclo catalítico, cualquiera de las dos especies puede utilizarse para iniciar la reacción FN. La ventaja de este método es que permite trabajar con el Fe presente en los suelos y los productos de los reactivos Fenton no son nocivos para el ambiente. La estrategia más frecuentemente utilizada en sistemas FN, para incrementar sustancialmente la velocidad de reacción global y mejorar considerablemente la eficiencia de mineralización, es el uso de radiación, proceso conocido en la bibliografía como foto-Fenton. La mejora de la reacción es mayormente debida a la fotólisis de complejos Fe⁺³, como acuocomplejos y

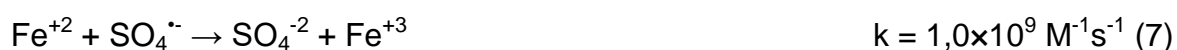
complejos con ligandos orgánicos, los cuales se disocian en el estado excitado para producir Fe^{+2} y un ligando oxidado (Nichela *et al.*, 2010).

Los agentes quelantes son generalmente compuestos orgánicos que poseen la capacidad de unirse al hierro en solución y, por lo tanto, mantenerlo en su forma disuelta. Al unirse a Fe^{+2} ó Fe^{+3} , estos agentes mantienen su capacidad de catalizar la descomposición del H_2O_2 a pH neutro, a diferencia del medio ácido de la ecuación (1), llevando a cabo lo que se denomina reacción Fenton modificada (Nam *et al.*, 2001). Estos agentes quelantes han sido utilizados para permitir la remediación *in situ* en muchos suelos de diferente pH natural. Además, se han ensayado diferentes tipos, entre los que se destacan las ciclodextrinas, el ácido etilendiamintetraacético (EDTA), el catecol, los ácidos gálico, cítrico, oxálico, málico, citrato de sodio y otros ácidos aminopoliácéticos (Nam *et al.*, 2001; Gryzenia *et al.*, 2009; Veignie *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2012; Usman *et al.*, 2016).

7.1.1.2. Ión persulfato ó persulfato de potasio (PS)

El PS es un oxidante sobre el que se han realizado varias investigaciones acerca de su aplicación (Huling y Pivetz, 2006; Tsitonaki *et al.*, 2008). Este compuesto es lo suficientemente estable para no reaccionar con la materia orgánica del suelo y no estar implicado de manera significativa en las reacciones de sorción. Estas propiedades lo convierten en un oxidante atractivo ya que persiste durante semanas en las capas subterráneas del suelo, puede ser inyectado en altas concentraciones, transportado a través de medios porosos y es capaz de desplazarse por difusión o por diferencia de densidad hacia materiales de baja permeabilidad (Huling y Pivetz, 2006). El PS requiere de la activación por calor (Mora *et al.*, 2009), por fotólisis UV (Rosso *et al.*, 1999), o por agregado de iones metálicos (Anipsitakis y Dionysiou, 2004), lo que permite regular la degradación de contaminantes en espacio y tiempo. En todos los casos, la activación del PS conduce a la formación del radical sulfato ($\text{SO}_4^{\bullet-}$) y otros intermediarios reactivos. El radical sulfato presenta un elevado potencial de reducción ($E^0 = 2,6 \text{ V}$), y reacciona rápidamente con compuestos orgánicos e inorgánicos (Tsitonaki *et al.*, 2008; Usman *et al.*, 2012).

Dentro de los metales utilizados para la activación del PS, el más utilizado ha sido el Fe^{+2} , el cual reacciona con el PS según la ecuación (6) (Kolthoff y Miller, 1951). El exceso de Fe^{+2} en el medio puede reaccionar con el radical sulfato (Liang *et al.* 2004), como puede verse en la reacción (7) (Neta *et al.*, 1988). Otras formas de terminación de la reacción por radicales libres pueden verse en las reacciones (8) y (9) (Herrmann *et al.*, 1995). El pH del medio de la reacción es importante en la disponibilidad tanto del Fe^{+2} como Fe^{+3} , que necesitan condiciones ácidas para estar disponibles como activantes y no precipitar. Al igual que lo explicado anteriormente para la reacción FN, cuando se utiliza PS el pH del medio es importante para evitar la precipitación de óxidos de Fe^{+2} y Fe^{+3} . La incorporación de agentes quelantes al medio de reacción permite realizar la misma a un pH cercano a la neutralidad (Liang *et al.*, 2009).

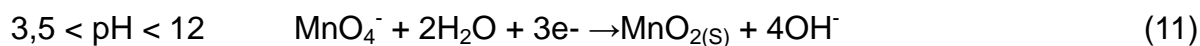
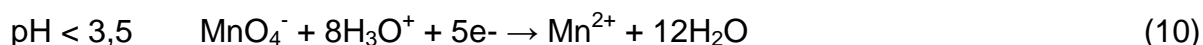


Los productos finales de reacción son los iones sulfato (SO_4^{-2}) e ión hidronio (H_3O^+). El sulfato es prácticamente inerte y no se considera un contaminante hasta concentraciones que superen los 400 mg L^{-1} (Código Alimentario Argentino, 2004), mientras que la producción de H_3O^+ produce un descenso del pH (Liang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Waldemer *et al.*, 2007).

7.1.1.3. Ión permanganato ó permanganato de potasio (PM)

La oxidación mediante PM, ha sido utilizada con éxito, para una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos como cianuros, sulfuros y compuestos que producen malos olores, alquenos, orgánicos clorados, fenoles, pesticidas, HAPs, ácidos orgánicos y metil-ter-butil eter (MTBE), en efluentes, aguas subterráneas y suelos. La estequiometría y la cinética de la oxidación de PM en sitios contaminados pueden ser muy complejas, al igual que numerosas reacciones en las que puede participar el manganeso debido a sus múltiples

estados de valencias y formas minerales. Las reacciones de oxidación primaria son las siguientes:



Una ventaja de la utilización de este oxidante es que persiste en suelos y aguas subterráneas siendo, además, de bajo costo, fácil y seguro de usar comparado con el peróxido de hidrógeno. Por otro lado, la demanda natural de oxidante (NOD) es en general muy alta (de Souza e Silva *et al.*, 2009) y suele tener un efecto negativo sobre la fertilidad del suelo tratado ya que degrada la materia orgánica natural e incrementa la precipitación de MnO_2 (Sirguy *et al.*, 2008).

7.1.1.4. Efectos sobre la comunidad bacteriana

Los efectos de los agentes utilizados en la oxidación química *in situ* en microorganismos del suelo y agua subterránea pueden ser muy diversos dependiendo del oxidante aplicado y de los microorganismos expuestos. Sahl y Munakata-Marr (2006) indicaron que los radicales hidroxilos generados por uso de FN contribuyen a la mutagénesis, muerte celular, destrucción del ADN y daños en las proteínas y lípidos que forman las membranas celulares. Por otro lado, el agregado de oxidantes puede modificar el pH del sedimento o suelo, lo cual tiene un impacto directo sobre el crecimiento microbiano si la capacidad amortiguadora del sustrato no es suficiente (Sutton *et al.*, 2011). En este sentido, estudios previos han demostrado que el uso tanto de PS (en condiciones de pH 2) como de PM (en condiciones de pH 9) influye de manera negativa en los microorganismos autóctonos del suelo (Liang *et al.*, 2012; Peluffo, 2016). Sin embargo, la aplicación de concentraciones moderadas de oxidante podría disminuir este efecto nocivo. Peluffo (2016), por ejemplo, observó que la utilización de concentraciones moderadas de PS (< 8,61 g PS Kg⁻¹ de suelo seco) se asoció a un efecto estimulante en los microorganismos autóctonos.

7.1.2. *Fitoplancton como bioindicador*

El fitoplancton natural de un ambiente acuático puede ser útil como indicador biológico de la eficiencia del tratamiento de degradación de un contaminante (Zhao *et al.*, 2020). Si el proceso de remediación es eficaz, se espera que este se degrade a niveles no tóxicos para el fitoplancton, permitiendo así el desarrollo de este bioindicador, tal como lo haría en un sitio no afectado. A la inversa, si el tratamiento de remediación no es eficaz, el producto residual tóxico dará lugar a la reducción de la biomasa del indicador.

De esta manera, es de suma importancia contar con una o más especies algales que permitan evaluar de manera rápida y sencilla el impacto de los HAPs sobre los ambientes acuáticos y los suelos circundantes, así como también la eficiencia en la remediación de estos sitios.

7.2. Materiales y métodos

Para responder al objetivo específico 5, “*Verificar la utilización de algas nativas del embalse como indicadoras biológicas efectividad de remediación de sedimentos y suelos contaminados por HAPs*”, se realizaron las siguientes actividades:

7.2.1. *Remediación de sedimentos y suelos*

Se utilizaron las muestras de sedimentos y suelos obtenidas en el Capítulo II (sección 6.2.1.). Las mismas se tamizaron por un tamiz de 2 mm (Newark, ASTM N° 10 USA Standard Series Sieves) a fin de homogeneizar el tamaño de partícula de sedimentos y suelos. Se prepararon reactores batch (Figura 61) con 15 g de sedimento o suelo (previamente contaminados con Fen (500 y 1000 ppm_{ss}) ó BaA (125 y 250 ppm_{ss}) de acuerdo con la metodología detallada en la sección 6.2.2.1), a los cuales se le agregaron 30 mL de agua bidestilada. Las concentraciones de Fen y BaA utilizadas, tanto en sedimentos como en suelos, se seleccionaron de acuerdo con aquellas concentraciones que produjeron un efecto significativo sobre el crecimiento de *S. quadricauda* en el Capítulo II (sección 6.3.3.).



Figura 61: Reactores batch con sedimentos o suelos contaminados con HAPs y con agregado de los diferentes oxidantes.

Luego se agregó el oxidante ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ó KMnO_4). Para determinar la cantidad de oxidante a utilizar se calculó el valor correspondiente a una dosis, que es el mínimo teórico (estequiometría) que se necesita para llevar a cada HAP a CO_2 y H_2O (para 1 mol de Fen: 33, 33 y 22 moles de H_2O_2 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ó KMnO_4 , respectivamente y; para 1 mol de BaA: 42, 42 y 28 moles de H_2O_2 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ó KMnO_4 , respectivamente). En cada ensayo se hizo esta cuantificación para cada oxidante a partir de la concentración inicial de cada HAP y los valores listados en la Tabla 13. El PS y el H_2O_2 fueron activados mediante agregado de Fe^{+2} , utilizando las relaciones PS/Fe^{+2} y $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+2}$ propuestas por Peluffo (2016). Las cantidades utilizadas de oxidante y activador para cada tratamiento se resumen en la Tabla 13. Para los sistemas control se utilizaron sedimentos y suelos del embalse sin agregado de HAPs, con valores de material extractable en solvente (MES) para los TR de Fen y BaA (obtenidos en el Capítulo I, secciones 5.3.3. y 5.3.4.) de < 10 y 27 ppm de sedimento seco (ppm_{ss}) y nd y 20 ppm de suelo seco (ppm_{ss}), respectivamente. Cada ensayo se realizó por triplicado, los reactores se protegieron de la luz, y se colocaron en una incubadora a una temperatura constante de 20 °C durante 7 días.

Tabla 13: Cantidades de oxidante y activador utilizados en cada tratamiento (g por reactor).

		H ₂ O ₂ (gr)	PM (gr)	PS (gr)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (gr)	EDTA (gr)		
Sedimentos	Control (basal)	FN	0,0473	-	-	0,16	0,09	
		PS	-	-	0,375	0,32	0,17	
		PM	-	0,146	-	-	-	
	Fen 500 ppm	FN	0,0473	-	-	0,16	0,09	
		PS	-	-	0,375	0,16	0,09	
		PM	-	0,146	-	-	-	
	Fen 1000 ppm	FN	0,0945	-	-	0,08	0,04	
		PS	-	-	0,75	0,08	0,04	
		PM	-	0,293	-	-	-	
	BaA 125 ppm	FN	0,012	-	-	0,01	0,006	
		PS	-	-	0,09	0,01	0,006	
		PM	-	0,037	-	-	-	
	BaA 250 ppm	FN	0,023	-	-	0,02	0,011	
		PS	-	-	0,19	0,02	0,011	
		PM	-	0,074	-	-	-	
	Suelos	Control (basal)	FN	0,0473	-	-	0,16	0,09
			PS	-	-	0,375	0,16	0,09
			PM	-	0,146	-	-	-
Fen 500 ppm		FN	0,0473	-	-	0,16	0,09	
		PS	-	-	0,375	0,16	0,09	
		PM	-	0,146	-	-	-	
Fen 1000 ppm		FN	0,0945	-	-	0,08	0,04	
		PS	-	-	0,75	0,08	0,04	
		PM	-	0,293	-	-	-	
BaA 500 ppm		FN	0,048	-	-	0,04	0,024	
		PS	-	-	0,36	0,04	0,024	
		PM	-	0,148	-	-	-	
BaA 1000 ppm		FN	0,092	-	-	0,08	0,044	
		PS	-	-	0,76	0,08	0,044	
		PM	-	0,296	-	-	-	

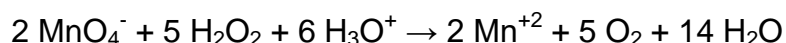
pH

Se realizaron medidas de pH en el sobrenadante de cada reactor, transcurridos los 7 días, mediante un equipo ORION 920A, provisto de un electrodo ORION Thermo 9106BNWP con compensación automática de temperatura.

Oxidante residual

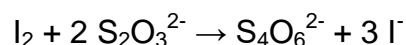
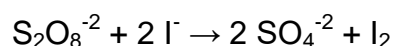
Se evaluó la concentración de oxidante residual en el sobrenadante a los 3 y 7 días de incubación:

FN (determinación de H₂O₂): El oxidante residual se determinó por valoración redox con permanganato de potasio, según la siguiente reacción:



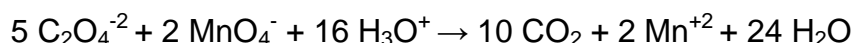
Para ello se colocaron en un tubo de 100 mL, 1 mL de muestra perteneciente a los sistemas estudiados con 50 mL de una solución 10 % ácido sulfúrico. Se valoró con una solución de permanganato de potasio 0,1 M.

PS: El oxidante residual se valoró mediante una iodometría por retorno titulando el iodo producido con Na₂S₂O₃·5H₂O (Pardo *et al.*, 2016), según las reacciones:



Para la valoración se colocaron en un tubo de 100 mL, 4 g de yoduro de potasio, 0,2 g de bicarbonato de sodio, 40 mL de agua bidestilada y 0,3 mL de la fase acuosa de la muestra. Se mezcló en un agitador durante 15 minutos, pasado este tiempo se le agregó 1 mL de ácido acético 6 N y se procedió a titular.

PM (MnO₄⁻): El oxidante residual se valoró mediante reacción con ácido oxálico 0,0084 M, según la reacción:



A partir de las concentraciones obtenidas se calculó el porcentaje de oxidante residual (%OR):

$$\%OR = \frac{\text{Conc.de oxidante residual}}{\text{Conc.de oxidante inicial}} \times 100$$

Material extractable en solvente

Cada uno de los sistemas de los reactores batch utilizados en los ensayos de remediación (sección 7.2.1.) fue liofilizado (Liofilizador Biobase® BKFD10) y conservado en refrigeración (-20 °C) para el posterior análisis de MES. Para la cuantificación del MES, se mezcló una submuestra de 1 g de sedimento/suelo en un tubo de policarbonato con 4 mL de una mezcla de solventes (1:1

hexano:acetona) (Banjoo y Nelson, 2005). La extracción se realizó mediante utilización de ultrasonido (Testlab Ultrasonic TB10TA) a 40 kHz y 400 W durante 60 minutos (Luque-García y Luque de Castro, 2003). Luego se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos (Presvac® model DCS-16RV) y la solución se filtró a través de filtros de nylon (0,45 µm de poro). Luego, 2 µL del filtrado fueron inyectados en un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado con una columna Agilent HP 5 (30 m x 0,25 mm i.d. con 0,25 µm de espesor de film) y un detector de ionización de llama, utilizando la rampa de temperatura propuesta por Morelli et al. (2005). Se cuantificó la señal del cromatograma que coincidía con el tiempo de retención de los HAPs en comparación con una calibración con un standard de los 16 HAPs contaminantes prioritarios propuestos por USEPA (AccuStandard® PAHmix 2 mg mL⁻¹), con un límite de detección de 1 ppm. A pesar de que el método utilizado para este análisis determina MES, considerando las concentraciones iniciales de los HAPs adicionadas en los ensayos (125, 250, 500 ó 1000 ppm_{ss}), y el nivel de base de MES en los suelos y sedimentos (que no supera el valor de <10 ppm_{ss} para el TR de Fen y 27 ppm_{ss} para el TR de BaA), esta determinación representará una cercana estimación de la concentración real de los HAPs en los experimentos realizados. Se asume por ello, en los resultados y discusión de este Capítulo, que los resultados de MES determinados en los experimentos corresponden a las concentraciones reales de los HAPs, despreciando la interferencia de la matriz respecto al aporte de otros lípidos que puedan co-eluir en los respectivos TR de HAPs que se analizan (ver respectivos cromatogramas en el Anexo V).

A partir de los valores obtenidos, y en relación con la cantidad de Fen y BaA iniciales de cada tratamiento, se calculó el porcentaje de degradación de HAPs (%DH):

$$\%DH = \frac{\text{Conc. de HAP residual}}{\text{Conc. de HAP inicial}} \times 100$$

Recuentos de bacterias heterótrofas cultivables (BH)

Para el recuento de Bacterias Heterótrofas, se prepararon otros reactores en las mismas condiciones que los anteriores (tiempo de incubación, temperatura, oxidante), de los cuales se obtuvieron muestras de suelos ó sedimentos para realizar el recuento de BH. Se utilizaron 22 g de sedimentos (55% de humedad) ó 21 g de suelo (52% de humedad), equivalente a 10 g de sedimento/suelo seco, de una muestra compuesta por las diferentes concentraciones de cada tratamiento contaminante (basal, Fen ó BaA), resuspendiéndose, cada una, en 90 mL de solución fisiológica previamente esterilizada en un autoclave. Se agitó durante 30 minutos a (24 ± 2) °C. Se dejó decantar durante 10 minutos y se prepararon diluciones seriadas 1/10 en tubos Eppendorf® con solución fisiológica. Se sembraron por duplicado 100 μ L de cada una de las diluciones en placas con medio de cultivo R2A (Anexo II). Se distribuyó la muestra cuidadosamente utilizando una espátula de Drigalsky. Se incubaron las muestras a (24 ± 2) °C durante 7 días. Pasado ese tiempo se realizó el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Figura 62). Las placas tomadas como válidas fueron aquellas que presentan entre 30 y 300 UFC. Se calculó el logaritmo de UFC mL⁻¹ de muestra (Reasoner y Geldreich, 1985).

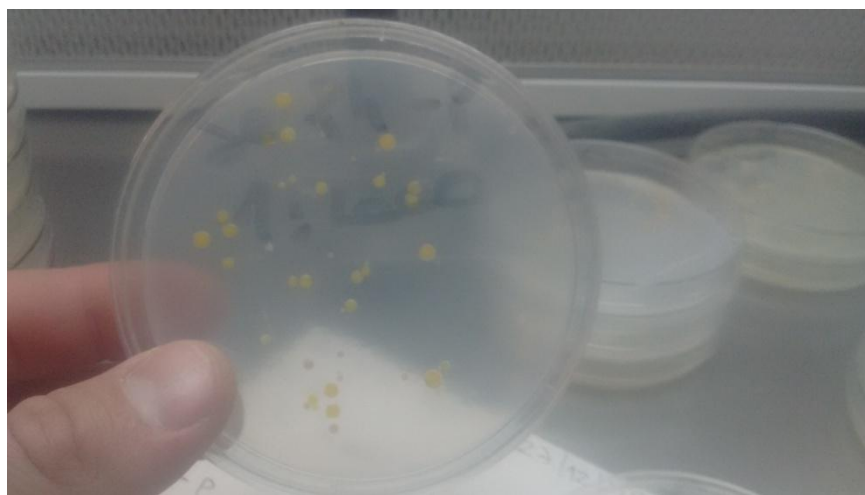


Figura 62: Recuento de UFC de BH en medio R2A.

7.2.2. Bioensayos con sedimentos/suelos remediados y *S. quadricauda*

Se realizaron bioensayos con el cultivo monoespecífico de *S. quadricauda* obtenido como se describió en el Capítulo II (sección 6.2.4.) y los sedimentos ó suelos obtenidos en el ensayo de remediación (sección 7.2.1.). Se utilizó una muestra de 1,1 g de sedimentos ó 1,05 g de suelos húmedos, considerando la humedad de estos (55 % y 52 %, respectivamente), que representan cantidades de sustrato equivalentes a las empleadas en los bioensayos de contaminación (Capítulo II, secciones 6.2.3., 6.2.5. y 6.2.7.). Los sedimentos/suelos se mezclaron con 20 mL de agua del embalse filtrada a través de un filtro de membrana de 0,45 μm de poro, y se dejaron reposar durante 24 horas, después de lo cual se añadieron 5 mL de inóculo algal (concentración final: 10^5 cél mL^{-1}). La incubación se realizó en frascos Nunclon® de 50 mL, con fotoperíodo de 12 horas ($\sim 50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en una cámara de incubación Neoline® a 25 °C de temperatura promedio. El tiempo de incubación fue de 7 días. A los días 0 y 7 se tomó de cada frasco una alícuota de 5 mL para determinar la abundancia algal y una alícuota de 10 mL para determinar la concentración de clorofila “a”. La abundancia algal y la concentración de clorofila “a” se determinaron siguiendo la misma metodología descrita en el Capítulo II, sección 6.2.3.2. para los bioensayos de contaminación.

7.2.3. Análisis estadísticos

Para determinar diferencias significativas entre tratamientos en las actividades 7.2.1 y 7.2.2 se utilizaron Análisis de Varianza (ANOVA) de tipo factorial, con un 5% de significación. Las variables bajo análisis fueron pH, %OR, %DH y BH (\log_{10}) (sección 7.2.1), y abundancia algal y clorofila “a” (sección 7.2.2), previa transformación potencial de Box Cox sobre las últimas dos variables. Los factores analizados fueron tipo y concentración de HAP y tratamiento oxidante (FN, PS ó PM). A posteriori se realizaron comparaciones entre pares utilizando el método de Tukey (Montgomery, 2004). Para los test de ANOVA y Tukey, se utilizó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011). Finalmente, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), teniendo en cuenta todas las

variables respuesta analizadas (secciones 7.2.1 y 7.2.2) mediante el software XLSTAT 2020.3.1.1000.

7.3. Resultados

7.3.1. Remediación de sedimentos y suelos

Sedimentos

pH

El pH de la fase acuosa resultó modificado en función del oxidante utilizado, independientemente del HAP presente en los sedimentos ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre el pH de los ensayos con FN ($7,0 \pm 0,1$) y el control ($7,1 \pm 0,1$). Por otro lado, los tratamientos con PS produjeron un descenso del pH ($6,7 \pm 0,2$), mientras que el agregado de PM originó un incremento del mismo ($7,5 \pm 0,2$) en relación al control ($p < 0,05$).

Oxidante residual

Las concentraciones de oxidantes residuales, analizadas como %OR, mostraron diferencias significativas tanto en función del tipo de oxidante como del HAP contaminante ($p < 0,05$). En el primer caso, se observaron porcentajes de H_2O_2 residual (tratamiento FN) de entre el 1 y el 9 %, sustancialmente menores a los observados para PS (40-70 %). Por otro lado, los valores de PM luego de 7 días fueron no detectables en todos los casos.

En la Figura 63 se representan los porcentajes de H_2O_2 residual de los tratamientos FN, luego de 7 días de ensayo. Se observó que los sedimentos con Ba, para ambas concentraciones, presentaron %OR marcadamente mayores a los del control y a los sistemas con agregado de Fen ($p < 0,05$). Por otro lado, el PS residual luego de los 7 días de incubación (Figura 64) fue menor al control ($p < 0,05$) para los ensayos sobre sedimentos con 500 ppm_{ss} de Fen, y con BaA en ambas concentraciones (125 y 250 ppm_{ss}), mientras que para 500 ppm_{ss} de Fen no tuvo diferencias con el control ($p < 0,05$).

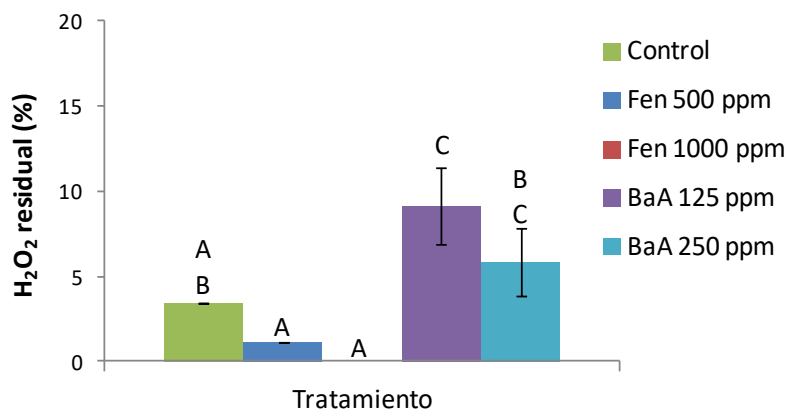


Figura 63: Porcentaje de H₂O₂ residual luego de tratamiento FN sobre sedimentos contaminados, al cabo de 7 días de tratamiento. Las medias con una letra en común no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

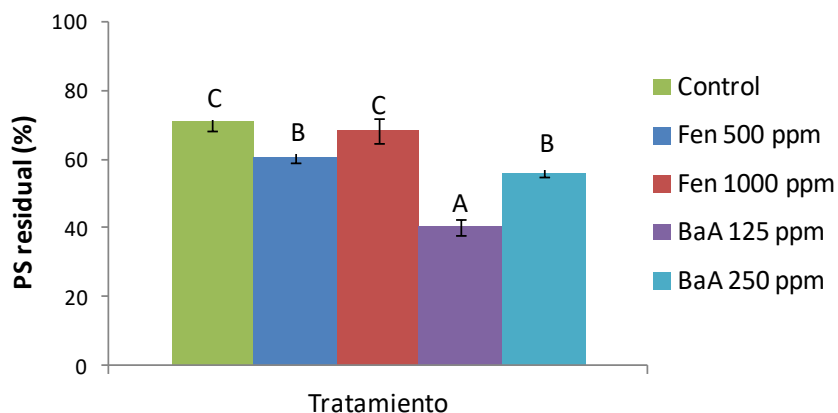


Figura 64: Porcentaje de PS residual luego de 7 días de incubación de los tratamientos en sedimentos con diferente agregado de HAPs. Las medias con una letra en común no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Cuando se analiza lo que sucedió con los oxidantes residuales para los tres tratamientos con BaA (Figura 65), podemos observar que luego de 3 días de incubación, a diferencia de lo observado luego de 7 días, los porcentajes de PM residual (20 - 40 %) fueron significativamente mayores a los de FN (10 - 20 %), comparando entre cada concentración ($p < 0,05$).

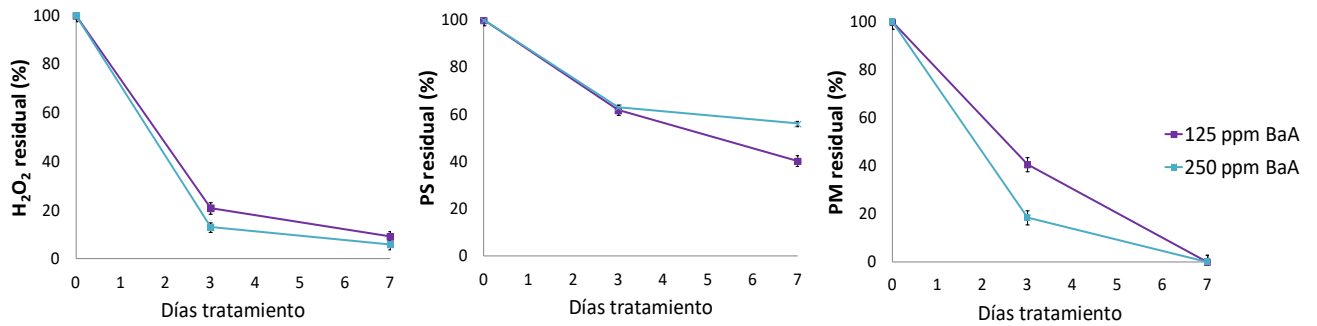


Figura 65: %OR para cada tratamiento oxidante y agregado de BaA, a 3 y 7 días de ensayo en sedimentos

HAPs residuales

La degradación de los HAPs mostró diferencias al comparar entre oxidantes, así como también entre tipo y concentración de HAP presente ($p < 0,05$). En la Tabla 14 se muestran las concentraciones iniciales nominales y las residuales absolutas de cada HAP en los distintos tratamientos. En la Figura 66 se representan las medias de %DH para los ensayos con diferentes agregados de HAPs, para cada oxidante. Se observó que, excepto para PS en sedimentos contaminados con 250 ppm_{ss} de BaA, los %DH resultaron mayores para los tres tratamientos (PM, PS y FN) sobre Fen respecto a BaA. En este sentido, el porcentaje de degradación calculado de Fen fue de 63 (± 5) %, mientras que el de BaA fue de 33 (± 19) %.

Tabla 14: Concentraciones iniciales nominales y concentraciones residuales absolutas de cada HAP, para cada tratamiento oxidante en sedimentos.

Oxidante	Fen inicial (ppm _{ss})	BaA inicial (ppm _{ss})	Fen final (ppm _{ss})	BaA final (ppm _{ss})
FN	Control (< 10)	Control (27 ± 16)	< 10	< 10
PS	Control (< 10)	Control (27 ± 16)	< 10	21 ± 2
PM	Control (< 10)	Control (27 ± 16)	< 10	22 ± 2
FN	500	-	190 ± 25	-
PS	500	-	262 ± 29	-
PM	500	-	204 ± 11	-
FN	1000	-	385 ± 1	-
PS	1000	-	389 ± 24	-
PM	1000	-	361 ± 2	-
FN	-	125	-	82 ± 2
PS	-	125	-	109 ± 9
PM	-	125	-	99 ± 1
FN	-	250	-	134 ± 8
PS	-	250	-	96 ± 14
PM	-	250	-	197 ± 17

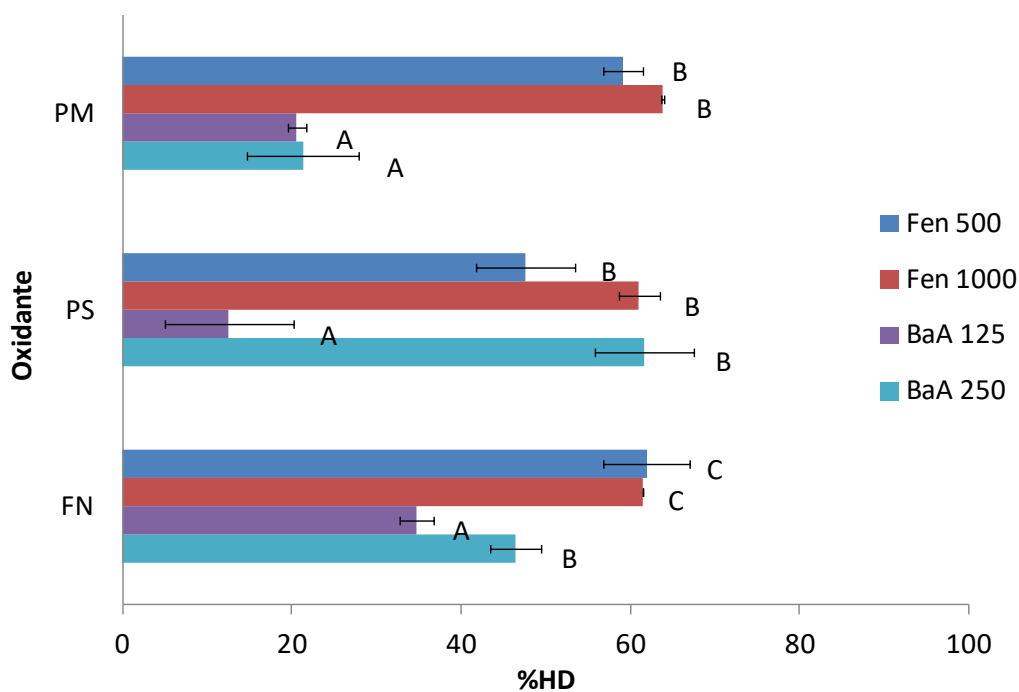


Figura 66: Porcentajes de degradación de HAPs en sedimentos, en cada tratamiento oxidante. Las medias con una letra en común no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

La comparación del %DH entre los diferentes oxidantes para cada HAP y concentración del mismo, se muestra en la Figura 67. Para el caso del Fen no se observaron variaciones entre los tratamientos, en ninguna de las concentraciones de Fen ($p > 0,05$). Por otro lado, en los sedimentos con BaA las variaciones en el %DH dependieron de su concentración. En los ensayos con una concentración de 125 ppm_{ss}, el %DH resultó mayor para FN: 35 (± 4) %, respecto a PS y PM: 16 (± 5) % ($p < 0,05$), mientras que para concentraciones de BaA de 250 ppm_{ss} resultó mayor para PS: 60 (± 3) %, respecto a FN: 45 (± 2) % y PM: 21 (± 1) % ($p < 0,05$).

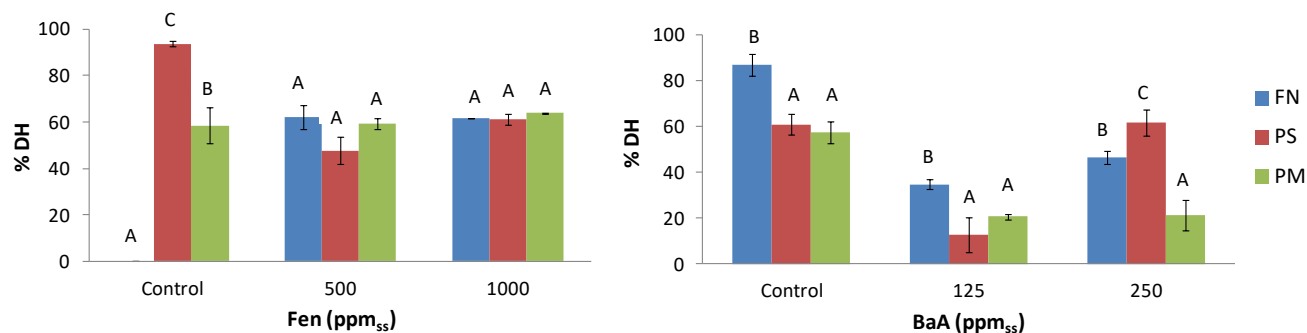


Figura 67: %DH en sedimentos, para cada concentración de HAP. Las medias con la misma letra no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Recuento de Bacterias Heterótrofas (BH)

Los recuentos de UFC de BH en sedimentos, luego de los tres tratamientos utilizados, se representan en la Figura 68. Las medias de log UFC gr⁻¹_{ss} se compararon entre los diferentes HAPs para cada tratamiento oxidante. Se observaron variaciones entre los oxidantes en los sistemas control y con Fen ($p < 0,05$), mientras que se obtuvieron valores similares en todos los ensayos con BaA ($p > 0,05$). Por otro lado, PM mostró una disminución en el recuento de BH en relación al control. Sin embargo, en los ensayos con Fen se observaron valores menores de BH para FN: $5,3 (\pm 0,1)$ log UFC gr⁻¹_{ss}, intermedios para PS: $6,7 (\pm 0,2)$ log UFC gr⁻¹_{ss}, y mayores para PM $7,4 (\pm 0,1)$ log UFC gr⁻¹_{ss}, en comparación con el control.

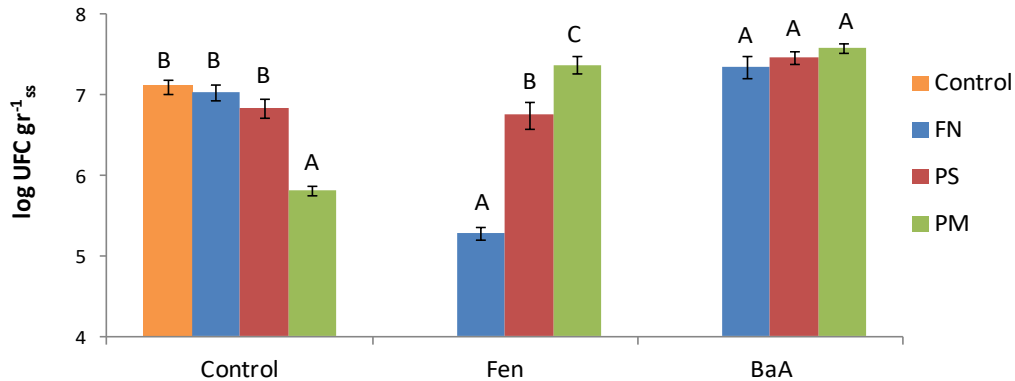


Figura 68: Recuentos de BH luego de cada tratamiento oxidante sobre sedimentos contaminados con HAPs. Las medias con la misma letra no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Suelos

pH

El pH de la fase acuosa mostró variaciones significativas entre los diferentes oxidantes luego de 7 días ($p < 0,05$), independientemente del HAP agregado a los suelos ($p > 0,05$). Los tratamientos FN y PS mostraron una disminución del pH respecto al control ($7,5 \pm 0,1$), con valores de $6,9 \pm 0,1$ y $6,8 \pm 0,1$ respectivamente, mientras que los sistemas con PM ($7,6 \pm 0,1$) no presentaron diferencias con el control ($p > 0,05$).

Oxidante residual

Los %OR en los ensayos con suelos mostraron diferencias dependiendo del oxidante aplicado, así como del HAP agregado y su concentración ($p < 0,05$). En los sistemas con FN las concentraciones de H_2O_2 fueron no detectables en todos los casos. Por otro lado, el PS mostró %OR que variaron entre $65 (\pm 3) \%$ en el control y $60 (\pm 1) \%$ en los suelos con 250 ppm_{ss} de BaA (Figura 69). En el caso de los tratamientos con PM, los porcentajes residuales fueron inferiores a los correspondientes al PS. Asimismo, PM mostró diferencias significativas entre los distintos HAPs y concentraciones, con valores de %OR en ensayos con Fen no detectables (500 ppm_{ss}) y de $8 (\pm 1) \%$ (1000 ppm_{ss}), y en ensayos con BaA de 32

(± 1) % (125 ppm_{ss}) y 42 (± 3) % (250 ppm_{ss}), mientras que el control presentó un valor promedio de 37 (± 2) % (Figura 69).

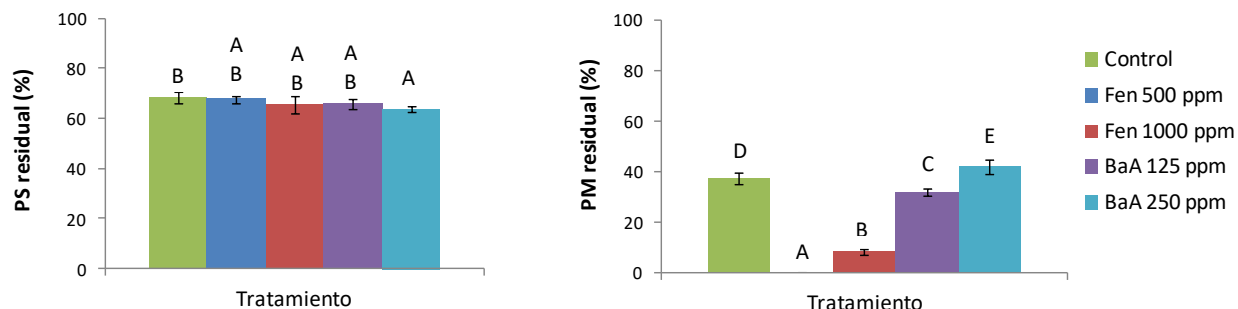


Figura 69: %OR para los tratamientos con PS y PM sobre suelos contaminados con HAPs. Las medias se compararon entre los diferentes HAPs para cada oxidante, y aquellas con una letra en común no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

Los resultados obtenidos para %OR al cabo de 3 días de incubación en los ensayos sobre suelos no presentaron diferencias significativas con los observados luego de 7 días ($p > 0,05$), mostrando que los oxidantes en este caso llegaron a su concentración final luego de los primeros 3 días de reacción.

HAPs residuales

En la Tabla 15 se presentan las concentraciones de iniciales nominales y las residuales absolutas para cada HAP en los tratamientos de remediación sobre suelos. Los %DH presentaron diferencias significativas entre los oxidantes ($p < 0,05$), tanto para los suelos con Fen como con BaA (Figura 70). La degradación de Fen (500 ppm_{ss}) fue desde nula para FN, hasta el 90 % para PM, obteniéndose con el PS valores intermedios (57 %). En el caso de 1000 ppm_{ss} de Fen, el rendimiento de la degradación fue mejor ya que varió desde el 41 % (FN) hasta el 93 % PM, con un 69 % para PS. En el caso de los suelos con BaA, la aplicación de FN produjo %DH de 52 % (500 ppm_{ss}) y 62 % (1000 ppm_{ss}), mientras que PS y PM mostraron promedios de (73 \pm 5) % y (88 \pm 4) %, respectivamente.

Tabla 15: Concentraciones iniciales nominales y concentraciones residuales absolutas de cada HAP, para cada tratamiento oxidante en suelos. Nd = no detectable

Oxidante	Fen inicial (ppm _{ss})	BaA inicial (ppm _{ss})	Fen final (ppm _{ss})	BaA final (ppm _{ss})
FN	Control (Nd)	Control (20 ± 11)	Nd	24 ± 11
PS	Control (Nd)	Control (20 ± 11)	Nd	24 ± 2
PM	Control (Nd)	Control (20 ± 11)	Nd	32 ± 7
FN	500	-	509 ± 81	
PS	500	-	224 ± 60	
PM	500	-	42 ± 20	
FN	1000	-	571 ± 28	
PS	1000	-	295 ± 15	
PM	1000	-	48 ± 5	
FN	-	500		237 ± 30
PS	-	500		134 ± 10
PM	-	500		57 ± 28
FN	-	1000		349 ± 44
PS	-	1000		267 ± 48
PM	-	1000		74 ± 28

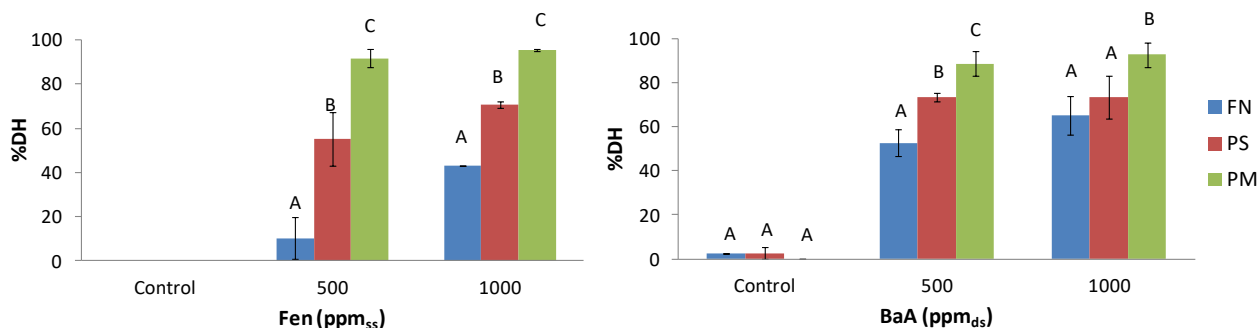


Figura 70: % DH en suelos, para cada concentración de HAP. Las medias de %DH se compararon, en cada concentración de HAP, entre los diferentes tratamientos y aquellas con la misma letra no presentaron variaciones significativas ($p > 0,05$).

Recuentos de Bacterias Heterótrofas (BH)

Los recuentos de UFC de BH en suelos, luego de los tres tratamientos realizados, se representan en la Figura 71. En los controles, PM mostró una disminución en el recuento de BH en comparación con el control y con FN y PS (p

< 0,05). Por otro lado, en los suelos con Fen y BaA, FN (5,3 y 5,4 log UFC gr⁻¹_{ss}, respectivamente) y PM (5,5 y 4,4 log UFC gr⁻¹_{ss}) mostraron una disminución en BH en comparación con PS (7,2 y 6,6 log UFC gr⁻¹_{ss}).

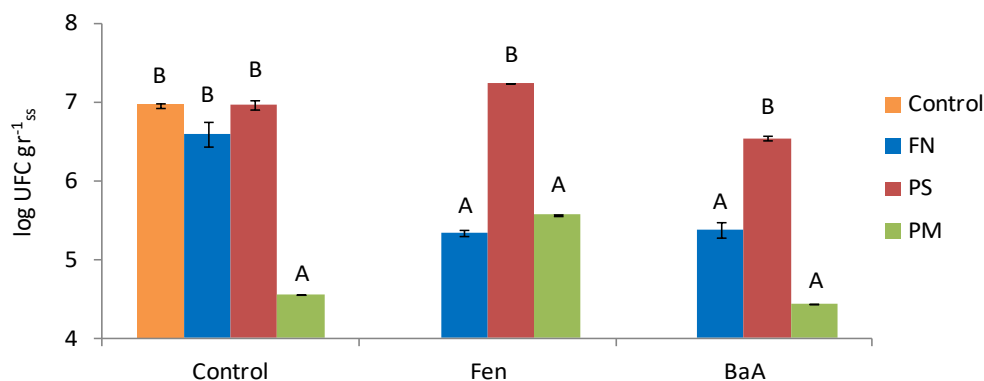


Figura 71: Recuentos de BH luego de cada tratamiento oxidante sobre suelos contaminados con HAPs. Las medias de log UFC gr⁻¹_{ss} se compararon entre los diferentes HAPs para cada oxidante, y aquellas con la misma letra no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

7.3.2. Bioensayos con sedimentos/suelos remediados y *S. quadricauda*

Sedimentos

Abundancia algal

La abundancia de *S. quadricauda* mostró valores significativamente menores para los bioensayos realizados con sedimentos contaminados con Fen y tratados con FN y PS, en comparación con PM ($p < 0,05$) (Figura 72). Por otro lado, en el caso de los sistemas con BaA, los menores valores de abundancia algal se observaron en los tratamientos con PS y PM para la concentración de 125 ppm_{ss}, mientras que no se observaron diferencias cuando la concentración de BaA fue de 250 ppm_{ss} ($p < 0,05$).

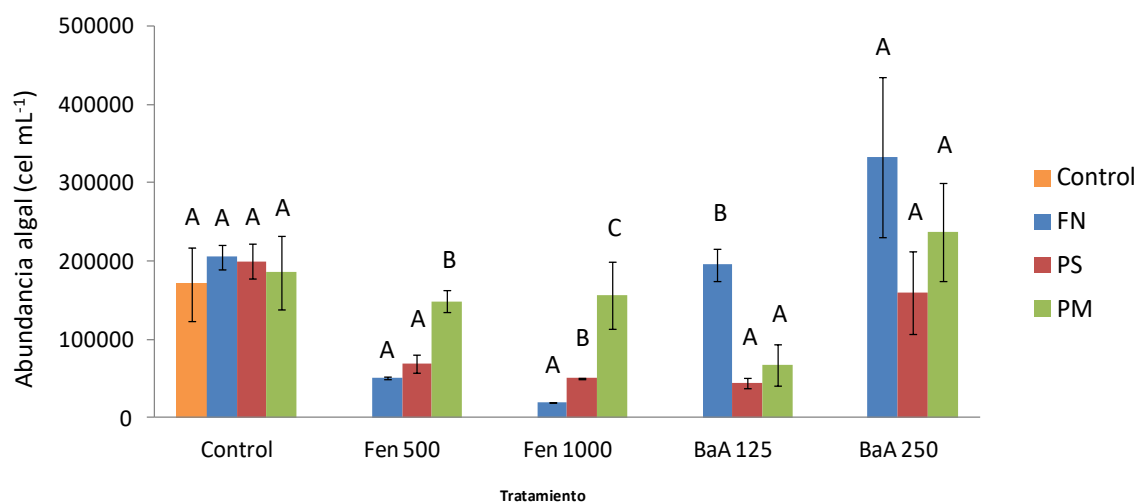


Figura 72: Abundancia de *S. quadricauda* luego de la incubación con sedimentos contaminados con HAPs y tratados con diferentes oxidantes. Las medias de abundancia algal se compararon, en cada concentración de HAP, entre los diferentes oxidantes, y aquellas con una letra en común no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Clorofila “a”

Los resultados del análisis de clorofila “a” se representan en la Figura 73. Se observaron variaciones de acuerdo con el oxidante aplicado, así como también en relación con el HAP contaminante y su cantidad ($p < 0,05$). El control y los ensayos con oxidante sobre sedimentos sin contaminar mostraron valores similares de clorofila “a” ($p > 0,05$). Para los sistemas con Fen, los mayores valores se obtuvieron para PM en los ensayos con 500 ppm_{ss}, y para FN en aquellos con 1000 ppm_{ss}. Asimismo, en aquellos ensayos con 1000 ppm_{ss} de Fen, la clorofila “a” fue menor para PS y PM en relación con los controles. Por otro lado, las mayores concentraciones cuando se agregó BaA se observaron luego de las oxidaciones con FN para 125 ppm_{ss} y PS para 250 ppm_{ss}, inclusive con mayores valores que los controles ($p < 0,05$). Contrariamente, para PS y PM en sedimentos con BaA 125 ppm_{ss} y FN para BaA 250 ppm_{ss} fueron menores a los controles ($p < 0,05$).

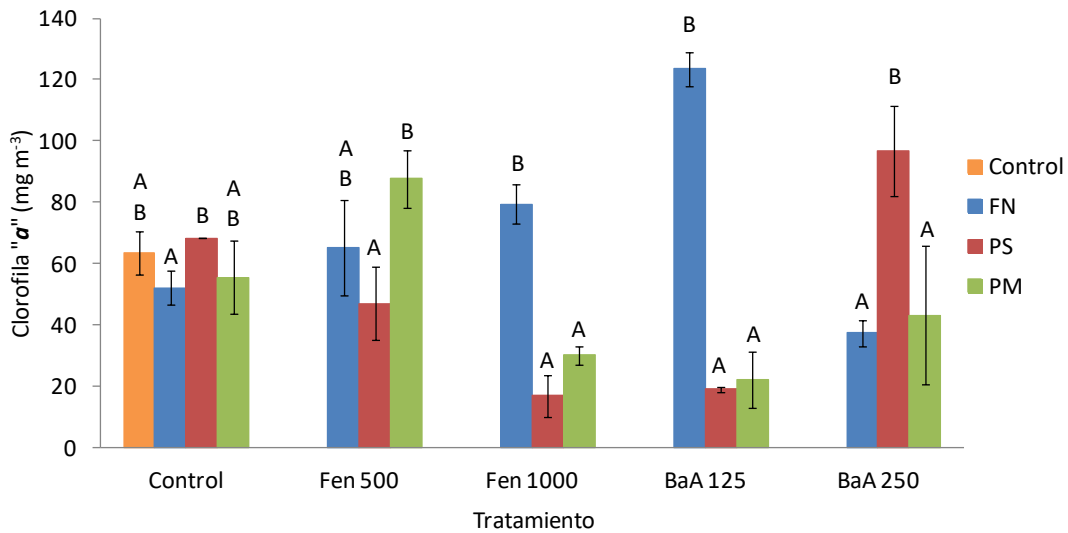


Figura 73: Concentraciones de clorofila “a” luego de cada tratamiento oxidante sobre sedimentos contaminados con HAPs. Las medias se compararon, para cada concentración de HAP, entre los distintos oxidantes, y aquellas con una letra en común no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Análisis de Componentes Principales

Se realizó el análisis de correlación de Pearson entre las 6 variables experimentales determinadas. Los CP con valores propios > 1 , así como la contribución de cada variable en cada uno de ellos, se muestran en la Tabla 16. El ACP con CP1 y CP2 representó el 66,86 % de la variabilidad (porcentaje acumulado, Tabla 16). Los tres ejes (CP1 a CP3) explicaron un 84 % de la variabilidad total de los sistemas, y el porcentaje restante se atribuyó a la variabilidad experimental.

El CP1 explicó el mayor porcentaje de variabilidad de los parámetros pH, abundancia algal, %DH, %OR y BH, mientras que el mayor porcentaje para la clorofila “a” se se observó en el CP3.

Tabla 16: Coeficientes de correlación y valores propios para cada variable en los diferentes componentes principales. Los valores en negrita corresponden para cada variable al factor para el cual el coseno cuadrado es el mayor.

<i>Coeficientes de correlación</i>	CP1	CP2	CP3
pH	0,542	0,380	0,009
Abundancia	0,502	0,080	0,035
Clorofila "a"	0,083	0,099	0,753
%DH	0,453	0,249	0,100
%OR	0,422	0,417	0,047
BH	0,698	0,088	0,084
<i>Valor propio</i>	2,701	1,311	1,025
<i>Variabilidad (%)</i>	45,009	21,857	17,091
<i>% acumulado</i>	45,009	66,866	83,956

En la Figura 74 se puede observar una relación inversa entre los vectores de %DH y las variables abundancia algal, clorofila “a” y BH, así como entre los de %OR y pH. Los sistemas con igual tratamiento oxidante se encontraron espacialmente cercanos, con excepción de los de FN, que se separaron en cuadrantes opuestos dependiendo del HAP contaminante. En este sentido, los sistemas con FN sobre sedimentos con BaA se agruparon en el cuadrante superior derecho, como resultado de sus mayores valores de abundancia algal, clorofila “a” y BH, mientras que los de FN sobre Fen lo hicieron en el cuadrante opuesto, en relación a sus menores valores para estas variables, y a sus mayores valores de %DH. Para todos los ensayos con PS, se observó una agrupación en el cuadrante superior izquierdo, derivado de sus altos %OR. Finalmente, los sistemas tratados con PM se ubicaron en el cuadrante inferior derecho y sobre el eje horizontal, lo cual se corresponde con los mayores valores de pH, así como también de abundancia algal, clorofila “a” y BH.

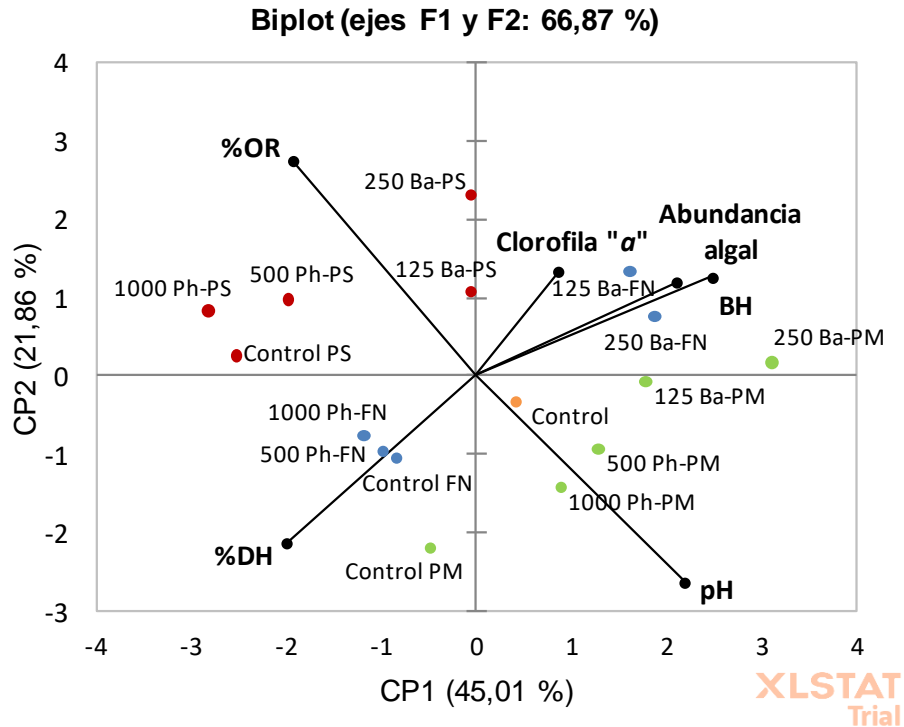


Figura 74: Biplot del Análisis de Componentes Principales para los ensayos con sedimentos. El eje x representa al componente principal 1 (CP1) y el eje y, al componente principal 2 (CP2). Ph = Fenantreno, Ba = Benzo(a)antraceno. Los diferentes colores representan al control sin oxidante (naranja) ó al tratamiento oxidante (azul: FN; rojo: PS y; verde: PM). El marcador sin color representa al control sin agregado de HAPs ni oxidantes.

Suelos

La Figura 75, muestra el análisis de los valores de abundancia algal obtenidos en los bioensayos con suelos a los que se los trató con los tres oxidantes. En el tratamiento con PM, se observó una tendencia a aumentar los valores de abundancia algal aunque esta variación sólo fue significativa para los suelos con 500 ppm_{ss} de BaA ($p < 0,05$). Por otro lado, no existieron diferencias significativas en la abundancia algal entre el control y el tratamiento con suelos contaminados con Fen ($p > 0,05$).

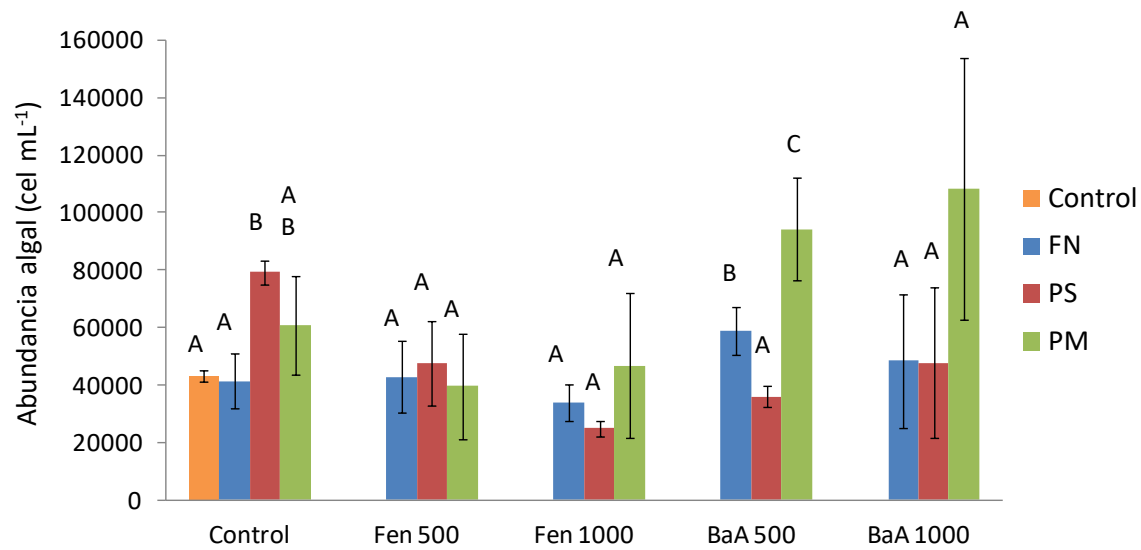


Figura 75: Abundancia de *S. quadricauda* luego de la incubación con suelos contaminados con HAPs y tratados con diferentes oxidantes. Las medias de abundancia algal se compararon, en cada concentración de HAP, entre los diferentes tratamientos, y aquellas con una letra en común no presentaron diferencias ($p > 0,05$).

Las concentraciones de clorofila “a” obtenidas a partir de suelos contaminados y tratados con los tres oxidantes mostraron una tendencia similar a los de abundancia algal, con valores estadísticamente mayores para PM respecto a FN (Fen 500 ppm_{ss}) y a FN y PS para los 1000 ppm_{ss} de Fen y 1000 ppm_{ss} de BaA ($p < 0,05$) (Figura 76). Asimismo, las medias para los ensayos con FN y PS sobre Fen fueron menores a las de sus respectivos controles sin agregados de Fen ($p < 0,05$).

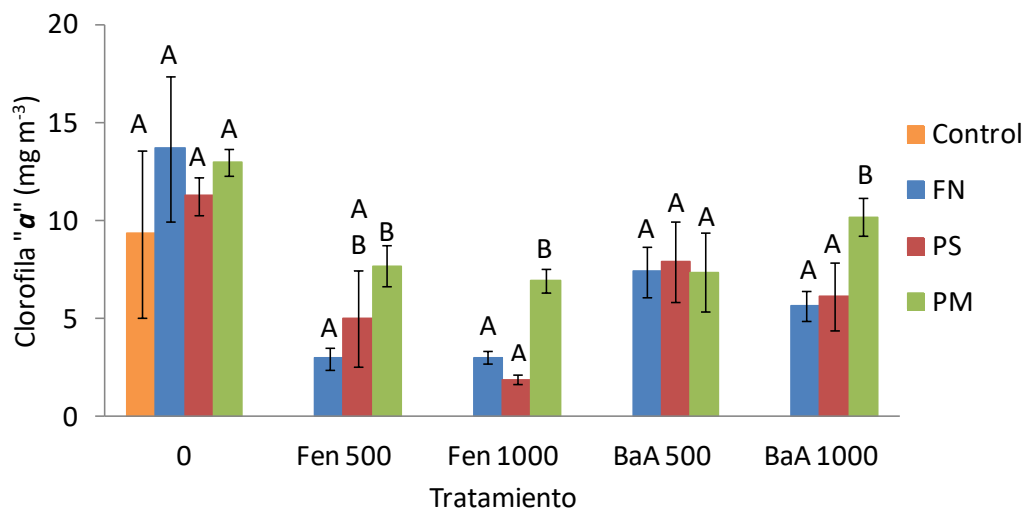


Figura 76: Concentraciones de clorofila “a” luego de cada tratamiento oxidante sobre suelos contaminados con HAPs. Las medias se compararon, en cada concentración de HAP, entre los diferentes tratamientos oxidantes, y aquellas con una letra en común no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

Análisis de Componentes Principales

Se realizó el análisis de correlación de Pearson entre las 6 variables experimentales determinadas. Los CP con valores propios > 1 , así como la contribución de cada variable en cada uno de ellos, se muestran en la Tabla 17. El CP1 explica el mayor porcentaje de variabilidad de los parámetros biológicos (Abundancia algal y BH), así como también pH, mientras que los parámetros Clorofila “a” y %OR se encuentran representados principalmente en el CP2. El ACP con CP1 y CP2 representó el 62 % (porcentaje acumulado, Tabla 17). Los tres ejes (CP1 a CP3) significaron un 81 % de la variabilidad total de los sistemas, y el porcentaje restante se atribuye al error experimental.

Tabla 17: Coeficientes de correlación y valores propios para cada variable en los diferentes componentes principales. Los valores en negrita corresponden para cada variable al factor para el cual el coseno cuadrado es el mayor.

<i>Coeficientes de correlación</i>	CP1	CP2	CP3
pH	0,521	0,052	0,266
Abundancia	0,459	0,032	0,046
Clorofila "a"	0,280	0,487	0,099
%DH	0,038	0,274	0,608
%OR	0,199	0,610	0,136
BH	0,704	0,059	0,007
<i>Valor propio</i>	2,201	1,512	1,162
<i>Variabilidad (%)</i>	36,677	25,208	19,360
<i>% acumulado</i>	36,677	61,885	81,245

La Figura 77 sugiere que no existe una relación directa entre %OR y %DH con la abundancia algal y la clorofila "a"). Asimismo, estos dos parámetros se comportaron de manera similar teniendo en cuenta que aquellos oxidantes que tuvieron mejores eficiencias, PS y PM, fueron también los que presentaron mayores valores de %OR. Por el contrario, %OR y %DH sí tuvieron una relación directa con el aumento de pH, e inversa con BH. Por otro lado, se observó una agrupación de las muestras según el tratamiento oxidante. Aquellas derivadas del tratamiento con FN se agruparon en los cuadrantes derechos sobre el CP1, correspondiéndose con los menores valores de pH y abundancia algal, y a los mayores de BH. Las muestras de PS se agruparon en los cuadrantes inferiores sobre el CP2, en relación con los mayores %OR registrados. Finalmente, las muestras tratadas con PM se agruparon hacia la izquierda sobre el CP1, correlacionándose con los valores de pH y abundancia algal más elevados, así como también con los menores valores de BH.

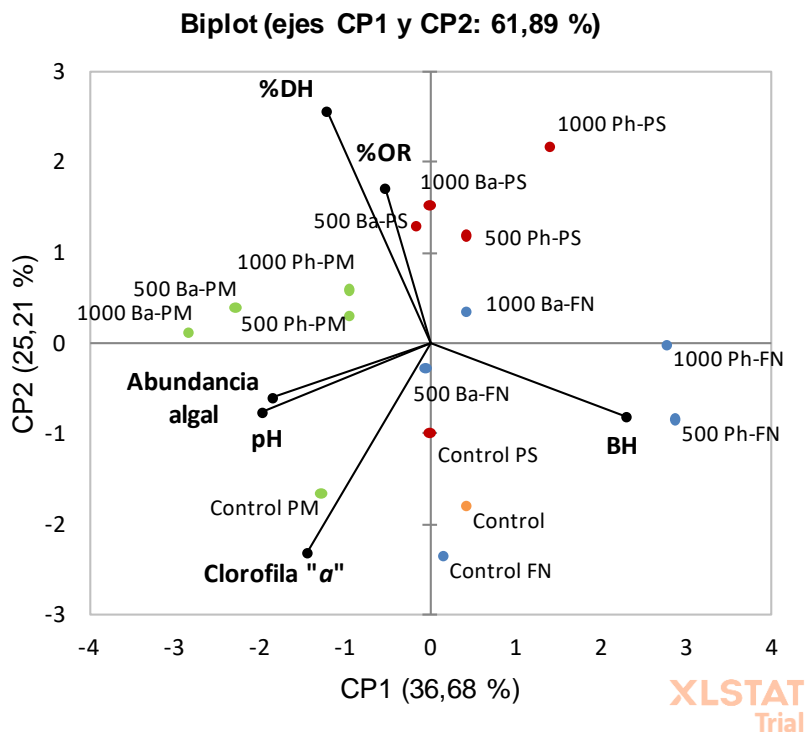
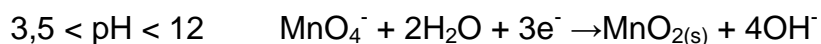


Figura 77: Biplot del Análisis de Componentes Principales para los ensayos con suelos. El eje x representa al componente principal 1 (CP1) y el eje y, al componente principal 2 (CP2). Ph = Fenantreno, Ba = Benzo(a)antraceno. Los diferentes colores representan al control sin oxidante (naranja) ó al tratamiento oxidante (azul: FN; rojo: PS y; verde: PM). El marcador sin color representa al control sin agregado de HAPs ni oxidantes.

7.4. Discusión

La variación de pH como resultado del uso de diferentes oxidantes dependió del tipo utilizado, independientemente del HAP presente o su concentración. La utilización de un agente quelante (EDTA) junto con la reacción Fenton tradicional impidió la precipitación de óxidos de hierro y permitió realizar la oxidación química a pH cercanos a la neutralidad, según lo propuesto por Nam *et al.* (2001). En el caso del PS, aunque el carácter ácido de las soluciones utilizadas ($K_2S_2O_8$ 1 % = 5,1-5,7) y la descomposición del persulfato residual producen el descenso del pH de los sistemas (Huang *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008; Tsitonaki *et al.*, 2008), las concentraciones utilizadas en este trabajo resultaron en valores de pH mínimos de 6,5. Por el contrario, los tratamientos con PM produjeron la

alcalinización del medio cuando se partió de sistemas cercanos a la neutralidad, de acuerdo con la reacción propuesta por de Souza e Silva *et al.* (2009):



lo que explica el pH obtenido en los sistemas tratados con PM.

El pH final de los sistemas, según el oxidante aplicado, fue similar para todos los ensayos realizados. Teniendo en cuenta que sedimentos y suelos tuvieron inicialmente diferente pH (7,0 y 7,5, respectivamente), la variación de este dependió del sustrato utilizado en el ensayo. En este sentido, los ensayos con FN mantuvieron el pH inicial de sedimentos, mientras que PM hizo lo propio para el caso de los suelos. En todos los casos, la variación de pH fue menor a una unidad, sugiriendo una elevada capacidad buffer de los sedimentos y suelos calcáreos del ambiente (Ben-Yaakov, 1973). Estos valores de pH permitieron utilizar los sistemas resultantes de las oxidaciones en los posteriores ensayos con *S. quadricauda*, considerando el rango de pH en el que esta especie se ha desarrollado en estudios previos (Nalewajko *et al.*, 1997; Mohammed *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2014).

Dentro de los oxidantes ensayados en este trabajo, el PS presentó las mayores concentraciones residuales, con valores superiores al 60 %, tanto al utilizar sedimentos como suelos contaminados con HAPs. Por otro lado, excepto para sedimentos con Ba, en los demás casos se alcanzaron porcentajes cercanos al 70 % de degradación de HAPs con PS luego de una semana. Las soluciones de PS tienen gran estabilidad, pudiendo permanecer en el sistema por un período mayor a 5 meses (Yen *et al.*, 2011; Peluffo, 2016), aunque se descompone rápidamente en radicales sulfato en presencia de metales, entre ellos el hierro (Liang *et al.*, 2004). Es por eso que para controlar la formación de radicales se utiliza un agente quelante que regula la liberación de ese metal. En este caso la relación de PS:Fe:EDTA utilizada fue efectiva.

Las concentraciones de H₂O₂ (FN) luego de 7 días de incubación fueron menores al 20 % en los ensayos con sedimentos, y no detectables cuando se

utilizaron suelos. Los resultados de concentraciones residuales para FN corresponden a lo descrito anteriormente para este tipo de sistemas (Yen *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012), donde se observó que la concentración de H₂O₂ disminuyó más rápidamente que la del PS. Ferrarese *et al.* (2008) observaron que las mejores eficiencias de remediación (95 %), en sedimentos con 1400 ppm_{ss} de HAPs, se obtuvieron con FN en dosis de oxidante cercanas a 100 mmol por cada 30 g de sedimento, debido a la oxidación vigorosa que requiere la mineralización completa de HAPs adsorbidos en sedimentos o suelos. Sin embargo, estas dosis son mucho mayores a las utilizadas en esta tesis (de aproximadamente 10 mmol oxidante cada 30 g de sedimento).

En el caso del PM, su porcentaje residual varió entre los sedimentos (no detectable) y los suelos (< 40 %). Sin embargo, luego de 3 días de ensayo con sedimentos las concentraciones de PM fueron mayores a las de H₂O₂ (FN). En este sentido, la eficiencia de degradación fue mayor en sedimentos para el FN (> 30 %) respecto a PM (< 20 %), mientras que en suelos fue mayor para PM (> 90 %) que para FN (< 52 %). Se ha demostrado que la estabilidad de PM depende fuertemente de la presencia de materia orgánica con la que reacciona inespecíficamente (Brown, 2004). Esto explicaría la mayor persistencia del PM en suelos, teniendo en cuenta que estos presentan menor contenido de materia orgánica (CT = 0,5 %) que los sedimentos (CT = 1,0 %). Las concentraciones iniciales y residuales de PM en el sedimento o suelo deberían ser las menores posibles, teniendo en cuenta los efectos negativos conocidos del PM, tales como degradación de la materia orgánica (Sirguy *et al.*, 2008) y las alteraciones en la permeabilidad debidas a la precipitación de MnO₂ (Siegrist *et al.*, 2002). La concentración crítica de Mn en suelos asociada con daños en la vegetación es variable dependiendo las especies y variedades presentes, debido a diferencias en la tolerancia al Mn, así como también de las propiedades fisicoquímicas del suelo como, por ejemplo, el pH: valores inferiores a 5,5 incrementan los niveles de Mn divalente en la solución del suelo e incrementan la toxicidad. Muchas especies son sensibles a concentraciones tan bajas como 1 mg kg⁻¹, valores que se encuentran en muchos suelos ácidos (El-Jaoual y Cox, 1998). Sirguy *et al.* (2008)

observaron que con concentraciones residuales en el rango de 11 – 26 mg kg⁻¹ de Mn extraíble disminuyó el crecimiento vegetal, así como también se incrementaron la CIC del suelo y la precipitación de MnO₂, con la consecuente reducción de la permeabilidad. Aunque las concentraciones más elevadas utilizadas en este trabajo podrían generar hasta 6 mg kg⁻¹ de Mn⁺², sería importante evaluar el efecto que estas concentraciones tendrían sobre la vegetación nativa. En relación a estos efectos negativos del PM, la disminución en el recuento de BH, observada en sedimentos tratados con PM, concuerda con lo observado previamente por otros autores sobre su efecto sobre la comunidad microbiana (Liang *et al.*, 2012; Peluffo, 2016).

La efectividad de remediación mostró también diferencias según se llevaran a cabo sobre sedimentos o suelos contaminados. En el caso de los sedimentos, todos los tratamientos alcanzaron porcentajes de degradación de Fen mayores que de BaA. Por otro lado, la degradación de los HAPs en suelos mostró diferencias según el oxidante aplicado, con una efectividad que respondió al orden PM > PS > FN. En este sentido, la aplicación de CG-FID sin etapa de “*clean up*” para cuantificación de HAPs residuales en ensayos de remediación ha sido ampliamente utilizada (Cecotti *et al.*, 2018; Mora *et al.*, 2020; Medina *et al.*, 2021), y no presenta los inconvenientes descritos previamente (Capítulo I, sección 5.4.) para la identificación de estos compuestos, debido a las altas concentraciones de HAPs agregadas a los sistemas. En el Anexo V se muestra una serie de cromatogramas correspondientes a suelos y sedimentos obtenidos luego del tratamiento oxidante, donde se observa la diferencia en la intensidad de las señales correspondientes a Fen ó BaA (residuales, comparadas con la matriz sin agregado inicial y con un standard de 80 ppm_{ss} de HAPs (AccuStandard®).

Las diferencias en la eficiencia de remediación según el sustrato utilizado se deben a la interacción de los oxidantes con los componentes de los sedimentos o suelos, debido a sus diferentes mecanismos de reacción. En este sentido, Brown *et al.* (2004) encontraron que PS y PM reaccionan de formas muy diferentes con la matriz del suelo. El orden de efectividad de degradación observado para los suelos coincide también con los resultados obtenidos por Yen *et al.* (2011). Estos

autores observaron que, si bien el FN representa un oxidante más fuerte que los otros dos, esta capacidad oxidante no persiste en un sistema de remediación por tiempos prolongados, como PS, debido a la rápida descomposición del H_2O_2 y a la rápida desaparición de los radicales oxhidrilos. En matrices complejas como el suelo o los sedimentos, parte de los radicales formados se pierden por reacciones secundarias con la materia orgánica o los microorganismos del suelo (Richardson et al., 2011). La alta efectividad de PM coincide con estudios previos en suelos con baja proporción de materia orgánica (< 1%). En este sentido, Yen *et al.* (2011), obtuvieron un 60 % de degradación de hidrocarburos totales utilizando PM en un suelo contaminado con diesel (5000 ppm_{ss} de hidrocarburos totales), trabajando con una concentración de oxidante de 300 ppm_{ss}, mayor a la utilizada en este trabajo (35 ppm_{ss}). Por otro lado, de Souza e Silva *et al.* (2009) obtuvieron altos porcentajes de eliminación de Fen (80 – 90 %) en suelos contaminados luego de 3 días de tratamiento con PM en cantidades estequiométricas. Asimismo, Peluffo (2016) utilizó suelos con alto contenido de materia orgánica (8 %), encontrando que los tratamientos con PM presentaron mucha menor efectividad (< 10 %).

El análisis multivariado mostró que los controles no se agruparon entre sí, sino con grupos muestrales que tenían en común el oxidante utilizado en cada caso, sugiriendo que las consecuencias del agregado de diferentes oxidantes son las que gobiernan la evolución del sistema. En el caso de los ensayos con agregado de HAPs, las muestras se agruparon según igual contaminante y oxidante, por lo que se puede decir que la variación de cada sistema es independiente de la concentración inicial del contaminante, pero no de la naturaleza de este, ya que no siempre se agruparon Fen y BaA. Respecto al crecimiento de *S. quadricauda*, los tratamientos que resultaron en un mejor desarrollo del indicador algal fueron PM y FN en el caso de utilización de sedimentos y PM en el caso de suelos, relacionado en este segundo caso con el pH alcalino obtenido. Contrariamente a lo esperado, la abundancia de *S. quadricauda* y las concentraciones de clorofila “a” en los ensayos, fueron menores cuando el porcentaje de degradación de HAPs fue mayor. En esos casos, podría no haberse alcanzado un estado basal libre de contaminantes, similar al de los

controles utilizados en los ensayos de contaminación (Capítulo II), con condiciones desfavorables para el crecimiento de la especie algal. Esto podría deberse tanto a cambios fisicoquímicos, por ejemplo, un aumento en la conductividad eléctrica debido a los productos de descomposición del PS (Peluffo *et al.*, 2018), como a la generación de subproductos de degradación ó metabolitos de degradación intermedia de los HAPs. Si bien la identificación y cuantificación de estos subproductos no fue realizada en este trabajo, varios autores han demostrado que la degradación de los HAPs puede generar productos de degradación intermedia tales como aldehídos, cetonas y quinonas (Watts *et al.*, 2002; Flotron *et al.*, 2005; Lunstedt *et al.*, 2006; Boulangé *et al.*, 2019). Aunque estos subproductos normalmente se encuentran en bajas concentraciones luego de una oxidación química, son de primordial interés debido a la toxicidad de algunos compuestos (Ferrarese *et al.*, 2008).

La abundancia de la comunidad bacteriana se vió afectada por algunos de los tratamientos, dependiendo del sustrato. Mientras que FN tuvo un efecto negativo en ambos casos, PM produjo una disminución de BH sólo en los ensayos con suelos. Este efecto negativo se correlacionó con los valores de PM residual más altos en estos ensayos, comparado con los sedimentos. Por otro lado, PS no afectó los valores de BH iniciales, en ningún caso. En ciertas condiciones de aplicación de oxidantes químicos *in situ*, la comunidad microbiana de los sedimentos o suelos puede disminuir significativamente (de Souza e Silva *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos investigadores han propuesto que se podría esperar una recuperación de la densidad microbiana con el tiempo (Sahl y Munakata-Marr, 2006; Tsitonaki *et al.*, 2008; Sutton *et al.* 2011). En este sentido, sería importante evaluar también el efecto sobre la comunidad de bacterias degradadoras de HAPs, a fin de conocer su abundancia relativa dentro de las BH y su composición específica antes y después del proceso de remediación.

7.5. Conclusiones

La aplicación de técnicas de oxidación química *in situ* sobre los sedimentos y suelos del embalse Los Barreales resultó en diferente efectividad de degradación de los HAPs de acuerdo con el oxidante aplicado. La reacción de Fenton produjo los porcentajes de oxidante residual más bajos, aunque la degradación de HAPs alcanzó alrededor del 50 % sobre sedimentos, produciendo un descenso de la abundancia de bacterias heterótrofas cultivables en sedimentos y suelos. En el caso del PS, la eficiencia fue intermedia, aunque mostró los porcentajes residuales más elevados. Por último, teniendo en cuenta la alta degradación de HAPs tanto en sedimentos como en suelos, y sus bajas concentraciones remanentes, el PM resultó el oxidante más eficaz y permitió mantener las condiciones de pH alcalinas propias del cuerpo de agua. Un factor importante a ser considerado en la aplicación del PM es su concentración residual, dado que cuando esta fue más elevada (suelos) disminuyó la abundancia de la comunidad bacteriana.

Se comprobó la potencialidad del alga *S. quadricauda* como indicadora de efectividad de remediación. Considerando las variables respuesta algales estudiadas en este trabajo, se obtuvieron resultados que se correlacionaron tanto con la efectividad de degradación de los HAPs como con los porcentajes de oxidante residual y los cambios en el pH del sistema. En este sentido, la aplicación de PS produjo los menores crecimientos del indicador en ensayos con sedimentos y suelos, FN tuvo variaciones dependientes del HAP contaminante, con los mejores porcentajes de degradación de HAP y crecimiento de *S. quadricauda* para Ba; mientras que la oxidación con PM resultó en el mejor desarrollo del indicador.

Teniendo en cuenta lo expuesto en los párrafos anteriores, la oxidación con PM resultó, la mejor opción para la remediación de sedimentos y suelos del embalse Los Barreales contaminados con Fen y BaA, permitiendo la utilización del alga nativa *S. quadricauda* como bioindicador de efectividad de remediación.

8. Conclusiones generales

La caracterización del embalse Los Barreales permitió establecer una línea base de calidad, su estado trófico y el aporte de nutrientes de la cuenca y la composición de la comunidad fitoplanctónica a lo largo de las estaciones del año. Esta información permitió por un lado, analizar el uso de esta comunidad como indicadora de contaminación por hidrocarburos y, por el otro, desarrollar una herramienta para el monitoreo físico-químico y biológico del ambiente.

La hipótesis 1, “*La contaminación por HAPs disminuye el crecimiento de las algas y provoca cambios en la estructura y capacidad de intercambio iónico de suelos y sedimentos*”, resultó parcialmente validada, ya que la contaminación artificial en ensayos de laboratorio sobre sedimentos y suelos del embalse (en concentraciones superiores a 250 ppm_{ss}) afectó al crecimiento algal, modificó las concentraciones de nutrientes en solución, aunque no afectó la capacidad de intercambio de los sustratos utilizados.

Se comprobó la hipótesis 2, “*Al menos una especie de las algas nativas del embalse Los Barreales, puede resultar útil como indicadora biológica de contaminación por HAPs*”. Dentro de las especies que componen la comunidad fitoplanctónica del embalse, la clorofita *Scenedesmus quadricauda* ha demostrado ser sensible, en ensayos de laboratorio, a la contaminación por Pir (1000 ppm_{ss}), Fen (> 250 ppm_{ss}) y BaA (> 50 ppm_{ss}) en sedimentos, y Fen (> 250 ppm_{ss}) en suelos del ambiente, así como también a la presencia de petróleo crudo (> 250 ppm_{ss}) en los mismos. Estos resultados demuestran la utilidad de esta especie como bioindicadora de este tipo de contaminación, tanto en bioensayos de laboratorio como en el ambiente natural. Esto último, en combinación con las determinaciones fisicoquímicas de calidad de agua, sedimentos y suelos, permitiría una evaluación más precisa del estado del ambiente.

En este sentido, el estudio de condiciones óptimas de cultivo en laboratorio de otras especies algales fitoplanctónicas o perifíticas del embalse, permitiría el desarrollo de otros indicadores biológicos de contaminación complementarios, lo

cual sería de gran utilidad para mejorar la sensibilidad del biomonitoreo a lo largo de todo el año.

Se aceptó también la hipótesis 3, “*Al menos una especie de las algas nativas del embalse Los Barreales, puede resultar útil como indicadora biológica de efectividad de remediación química de suelos y sedimentos contaminados por HAPs*”, ya que *Scenedesmus quadricauda* demostró también ser útil como indicadora de efectividad de remediación química de sedimentos y suelos del embalse, obteniéndose los resultados más promisorios para el caso de la aplicación de ión permanganato como oxidante, tanto para el desarrollo del indicador algal, como para la degradación del contaminante así como por su menor efecto sobre la comunidad bacteriana.

Asimismo, es de gran importancia para el futuro la determinación de subproductos de degradación de los HAPs en la oxidación, así como también realizar un estudio pormenorizado de la composición de la comunidad bacteriana tanto de sedimentos como de suelos del embalse, y su respuesta específica a los oxidantes utilizados. Esto permitiría ajustar las condiciones de reacción, con el objetivo de optimizar la degradación de los hidrocarburos y minimizar la generación de compuestos tóxicos para los organismos acuáticos, pudiéndose utilizar de esta forma el indicador algal de manera precisa.

Por otro lado, los productos intermedios o finales de las oxidaciones propuestas en esta tesis son compuestos que se encuentran relacionados al ciclo de fósforo en sedimentos y suelos. En el caso de las reacciones Fenton o con ión persulfato, la adición de Fe^{+2} , cuando es necesario para la activación, puede llevar a un aumento en la movilización de fósforo desde los sedimentos (Smolders y Roelofs, 1993), mientras que la producción de Fe^{+3} favorece la retención del mismo (Löfgren y Boström, 1989). A su vez, la biodisponibilidad del fósforo también aumenta a mayores concentraciones de ión sulfato (Curtis, 1989; Caraco *et al.*, 1993), un compuesto producto de la oxidación con ión persulfato. En el caso del tratamiento con ión permanganato, el MnO_2 , generado como producto final, también se encuentra involucrado en el ciclo del fósforo, mediante acoplamiento

redox con la oxidación del Fe^{+2} (Hongve, 1997; White *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta esto, sería importante a futuro realizar ensayos para evaluar la influencia de estos productos de oxidación sobre la dinámica del fósforo en los sedimentos y suelos del embalse Los Barreales.

9. Bibliografía

- Adams WJ, Kimerle RA, Mosher RG (1985). Aquatic safety assessment of chemicals sorbed to sediments. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium*. ASTM International. 429-453. <https://doi.org/10.1520/STP36282S>
- AIC (2018). Informe hidrometeorológico año 2017. *Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro*. <http://www.aic.gov.ar/>
- Aizaki M, Otsuki A, Fukushima T, Hosomi M, Muraoka K (1981). Application of Carlson's trophic state index to Japanese lakes and relationships between the index and other parameters: With 2 figures and 4 tables in the text. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 21(1), 675-681. <https://doi.org/10.1080/03680770.1980.11897067>
- Akçay A (2013). *The calculation of LD50 using probit analysis*. Wiley online library. https://doi.org/10.1096/fasebj.27.1_supplement.1217.28
- Aksmann A, Tukaj Z (2004). The effect of anthracene and phenanthrene on the growth, photosynthesis, and SOD activity of the green alga *Scenedesmus armatus* depends on the PAR irradiance and CO₂ level. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 47(2):177-184. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-2297-9>
- Alba GI (2011). Comparación de la Electrorremediación de Suelo Tipo Gleysol Contaminado con Hidrocarburo con el método de lavado con Tritón X-114 y la Biorremediación con Cultivo Sólido empleando Residuos Agroindustriales. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología. *Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica*. Veracruz, México
- Alegbeleye OO, Opeolu BO, Jackson VA (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. *Environmental management*, 60(4), 758-783. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2>

- Alvarez NO, Pena EJ (2004). Alternativas de monitoreo de calidad de aguas: algas como bioindicadores. *Acta Nova*, 2(4), 513-517
- Alvaro CES, Arocena LA, Martínez MÁ, Nudelman NES (2017). Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región Patagonia Norte, Argentina. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(2):247-257. <https://dx.doi.org/10.20937/rica.2017.33.02.06>
- Amengual-Morro C, Niell GM, Martínez-Taberner A (2012). Phytoplankton as bioindicator for waste stabilization ponds. *Journal of Environmental Management*, 95:S71-S76. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.07.008>
- Amezcuá–Allieri MA, Lead J, Rodríguez–Vázquez R (2005). Impact of microbial activity on copper, lead and nickel mobilization during the bioremediation of soil PAHs. *Chemosphere*, 61(4):484-491. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.002>
- Amorim MJ, Oliveira E, Teixeira AS, Gravato CS, Loureiro S, Guilhermino LC, Van Gestel C, Soares AM (2011). Toxicity and bioaccumulation of phenanthrene in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta: Enchytraeidae). *Environmental toxicology and chemistry*, 30(4):967-972. <https://doi.org/10.1002/etc.464>
- Andersen RA (Ed.) (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier, Massachusetts. 596 pp
- APHA (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington, USA. 1134 pp
- Aprill W, Sims RC (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, 20:253–265. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(90\)90100-8](https://doi.org/10.1016/0045-6535(90)90100-8)
- Anipsitakis GP, Dionysiou DD (2004). Radical generation by the interaction of transition metals with common oxidants. *Environmental Science Technology*, 38:3705–3712. <https://doi.org/10.1021/es035121o>

- Arias AH, Vazquez-Botello A, Tombesi N, Ponce-Vélez G, Freije H, Marcovecchio J (2010). Presence, distribution, and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160(1-4):301. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0696-5>
- Auer MT, Kieser MS, Canale RP (1986). Identification of critical nutrient levels through field verification of models for phosphorus and phytoplankton growth. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(2):379-388. <https://doi.org/10.1139/f86-048>
- Bacocchi, R., D'Aprile, L., Innocenti, I., Massetti, F., & Verginelli, I. (2014). Development of technical guidelines for the application of in-situ chemical oxidation to groundwater remediation. *Journal of cleaner production*, 77: 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.12.016>
- Bai XL, Ding SM, Fan CX, Liu T, Shi D, Zhang L (2009). Organic phosphorus species in surface sediments of a large, shallow, eutrophic lake, Lake Taihu, China. *Environmental Pollution*, 157:2507–2513. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.03.018>
- Banjoo DR, Nelson PK (2005). Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1066(1-2): 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.01.033>
- Bastian MV, Toetz DW (1982). Effect of eight polynuclear hydrocarbons on growth of *Anabaena flos-aquae*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 29(5):531-538. <https://doi.org/10.1007/BF01669616>
- Baud-Grasset F, Baud-Grasset S, Safferman SI (1993). Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere*, 26:1365–1374. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(93\)90187-A](https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90187-A)

- Bellinger EG, Sigeo DC (2015). *Freshwater algae: identification, enumeration and use as bioindicators*. John Wiley & Sons. 290pp
- Ben-Yaakov S (1973). pH buffering of pore water of recent anoxic marine sediments. *Limnology and Oceanography*, 18(1):86-94. <https://doi.org/10.4319/lo.1973.18.1.0086>
- Bennett GF (1995). *In situ bioremediation: when does it work?* Committee on In Situ Bioremediation, Water Science and Technology Board, Commission on Engineering and Technical Systems, National Research Council, *National Academy Press*, Washington, DC. 207 pp
- Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, Westerholm R (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental health perspectives*, 110(3):451-488. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241197>
- Boulangé M, Lorgeoux C, Biache C, Saada A, Faure P (2019). Fenton-like and potassium permanganate oxidations of PAH-contaminated soils: Impact of oxidant doses on PAH and polar PAC (polycyclic aromatic compound) behavior. *Chemosphere*, 224:437-444. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.108>
- Bran D, Ayesa J, López C (2002). Áreas ecológicas de Neuquén. Informe Laboratorio De Teledetección-SIG N°4-INTA-EEA Bariloche.
- Breedveld GD, Sparrevik M (2000). Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation*, 11:391–399. <https://doi.org/10.1023/A:1011695023196>
- Brown RA, Robinson D, Skladany G, Loeper J (2004). Response to naturally occurring organic material: permanganate versus persulfate. Proceedings of *the Fourth International Conference of Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*. Monterey, CA

- Brutti LN, Beltran MJ, García de Salamone I (2018). *Biorremediación de los recursos naturales*. Ediciones INTA. 521 pp
- Bursztyn Fuentes AL, José C, de Los Ríos A, do Carmo LI, de Iorio AF, Rendina AE (2018). Phytoextraction of heavy metals from a multiply contaminated dredged sediment by chicory (*Cichorium intybus* L.) and castor bean (*Ricinus communis* L.) enhanced with EDTA, NTA, and citric acid application. *International journal of phytoremediation*, 20(13), 1354-1361. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1524826>
- Cabanillas L, Carstens G, Lovecchio JP, Marshall PA, Rebori L, Soldo JC, Vergani G (2013). Hidrocarburos convencionales y no convencionales. *Asociación Argentina de geólogos y geofísicos del petróleo*, 23(134), 41-48.
- Cameron EM (1996). Hydrogeochemistry of the Fraser River, British Columbia: seasonal variation in major and minor components. *Journal of Hydrology*, 182(1-4), 209-225. [https://doi.org/10.1016/0022-1694\(95\)02924-9](https://doi.org/10.1016/0022-1694(95)02924-9)
- Caraco NF, Cole JJ, Likens GE (1993). Sulfate control of phosphorus availability in lakes. *Hydrobiologia*, 253(1-3), 275-280. <https://doi.org/10.1007/BF00050748>
- Carey C, Rydin E (2011) Lake trophic status can be determined by the depth distribution of sediment phosphorus. *Limnology and Oceanography*, 56:2051-2063. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2051>
- Carr JF, Applegate VC, Keller M (1965). A recent occurrence of thermal stratification and low dissolved oxygen in western Lake Erie. <http://hdl.handle.net/1811/5114>
- Carter M (1993). *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers, Florida. 823 pp
- Carusso S, Juárez AB, Moretton J, Magdaleno A (2018). Effects of three veterinary antibiotics and their binary mixtures on two green alga species. *Chemosphere*, 194:821-827. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.047>

- Casas G, Gil MN, Commendatore MG, Torres AI, Marinho C, Sturla J (2010). *Evaluación de la composición químico-nutricional y del nivel de metales pesados e hidrocarburos en Undaria pinnatifida de los golfos San José y Nuevo, Chubut*. Dirección General de Promoción Científica y Técnica de la Provincia de Chubut, Puerto Madryn, Argentina. 47pp
- Cecotti M, Coppotelli BM, Mora VC, Viera M, Morelli IS (2018). Efficiency of surfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil: Link with bioavailability and the dynamics of the bacterial community. *Science of the Total Environment*, 634:224-234. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.303>
- Cerniglia CE (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 4(3):331-338. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(93\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0958-1669(93)90104-5)
- Chapman LJ, Chapman CA, Crisman TL, Nordlie FG (1998). Dissolved oxygen and thermal regimes of a Ugandan crater lake. *Hydrobiologia*, 385(1-3):201-211. <https://doi.org/10.1023/A:1003527016384>
- Chen H, Zhang Z, Tian F, Zhang L, Li Y, Cai W, Jia X (2018). The effect of pH on the acute toxicity of phenanthrene in a marine microalgae *Chlorella salina*. *Scientific reports*, 8(1):1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35686-9>
- Chimney MJ, Wenkert L, Pietro KC (2006). Patterns of vertical stratification in a subtropical constructed wetland in south Florida (USA). *Ecological Engineering*, 27(4), 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.05.017>
- Chorus I, Köhler A, Beulker C, Fastner J, van de Weyer K, Hegewald T, Hupfer M (2020). Decades needed for ecosystem components to respond to a sharp and drastic phosphorus load reduction. *Hydrobiologia*, 1-31. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04450-4>
- Ciano N, Nakamatsu V, Luque J, Amari M, Owen M, Lisoni C (2000). Revegetación de áreas disturbadas por la actividad petrolera en la Patagonia Extrandina

(Argentina). *XI Conferencia de la International Soil Conservation Organization (ISCO 2000). Buenos Aires, Argentina.*

Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (Eds.). (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater.* American Public Health Association, Washington D.C.

COIRCO (2018). Programa integral de calidad de aguas del río Colorado. Subprograma calidad del medio acuático. *Informe final, año 2018.* Comité Interjurisdiccional del río Colorado. Secretaría de Gobierno de Energía de la Nación, Grupo Interempresario. <https://www.coirco.gov.ar/download/calidad-aguas/calidad-medio-acuatico/Programa%20COIRCO%202018.pdf>

Commendatore MG, Nievas ML, Amin O, Esteves JL (2012). Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). *Marine environmental research*, 74:20-31. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.11.010>

Commendatore MG, Franco MA, Gomes Costa P, Castro IB, Fillmann G, Bigatti G, Nievas ML (2015). Butyltins, polyaromatic hydrocarbons, organochlorine pesticides, and polychlorinated biphenyls in sediments and bivalve mollusks in a mid latitude environment from the Patagonian coastal zone. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(12):2750-2763. <https://doi.org/10.1002/etc.3134>

Curtis PJ (1989). Effects of hydrogen ion and sulphate on the phosphorus cycle of a Precambrian Shield lake. *Nature*, 337(6203):156-158. https://ui.adsabs.harvard.edu/link_gateway/1989Natur.337..156C/doi:10.1038/337156a0

Dailianis S, Tsarpali V, Melas K, Karapanagioti HK, Manariotis ID (2014). Aqueous phenanthrene toxicity after high-frequency ultrasound degradation. *Aquatic toxicology*, 147:32-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.006>

- del Brio J, Montagna CM, Lares BA, Parolo ME, Venturino A (2018). Chemical characterization and toxicity of water-accommodated fraction of oil on the South American native species *Hyaella curvispina*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 60:209-215. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.022>
- de Souza e Silva PT, da Silva VL, de Barros Neto B, Simonnot M (2009). Potassium permanganate oxidation of phenanthrene and pyrene in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 168:1269–1273. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.007>
- Del Vento S, Dachs J (2002). Prediction of uptake dynamics of persistent organic pollutants by bacteria and phytoplankton. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(10):2099-2107. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211013>
- Diaz M (1994). *Fitoplancton de lagos Andino Patagónicos: su relación con factores abióticos*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Diaz M, Mora V, Pedrozo F, Nichela D, Baffico G (2015). Evaluation of native acidophilic algae species as potential indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) soil contamination. *Journal of applied phycology*, 27(1):321-325. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0334-2>
- Diaz M, Pedrozo F, Reynolds C, Temporetti P (2007). Chemical composition and the nitrogen-regulated trophic state of Patagonian lakes. *Limnological Ecology and Management of Inland Waters*, 37(1):17-27. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.08.006>
- Diaz-Pardo E, Vazquez G, López-López E (1998). The phytoplankton community as a bioindicator of health conditions of Atezca Lake, Mexico. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 1(3-4):257-266. <https://doi.org/10.1080/14634989808656922>

- Dionisi HM, Lozada M, Marcos MS, Di Marzio WD, Loviso CL (2011). *Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118010549.ch45>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW (2011) *InfoStat Group*, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Dobal AV, Loza Álvarez S, Lugioyo Gallardo GM (2011). Potencialidades de las cianobacterias planctónicas como bioindicadores de estrés ambiental en ecosistemas costeros. *Serie Oceanológica*, 2011, vol. 9, p. 112-117. ISSN 2072-800x
- Döhler G (1984). Effect of UV-B radiation on biomass production, pigmentation and protein content of marine diatoms. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 39(6):634-638. <https://doi.org/10.1515/znc-1984-0619>
- Dokulil MT (2003). Algae as ecological bio-indicators. *Trace metals and other contaminants in the environment*. 6:285-327. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80139-X](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80139-X)
- Drovandi A, Zuluaga J, Filippini M, Bermejillo A, Peralta P, Bustamante M, Ruiz M, Granero M, Morsucci A, Velgas M, Valdes A, Nacif N (2005). Diagnóstico preliminar del estado trófico de las aguas del embalse El Carrizal, Provincia de Mendoza. *XX Congreso Nacional del Agua 2005 y III Simposio de Recursos Hídricos del Cono Sur*.
- Duarte L (2013). *Proyecto de Desarrollo Institucional para la Inversión UTF/ARG/017/ARG*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Argentina.
- Echaniz S, Vignatti A (2009). Determinación del estado trófico y de la capacidad de carga del embalse Casa de Piedra. *BioScriba*, 2(1):41-51.
- Echeveste P, Agustí S, Dachs J (2010). Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton

- populations. *Environmental pollution*, 158(1):299-307. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.006>
- Eichel KA, Macrae ML, Hall RI, Fishback L, Wolfe BB (2014). Nutrient uptake and short-term responses of phytoplankton and benthic algal communities from a subarctic pond to experimental nutrient enrichment in microcosms. *Arctic, antarctic, and alpine research*, 46(1):191-205. <https://doi.org/10.1657/1938-4246-46.1.191>
- El-Dib MA, Abou-Waly HF, El-Naby AH (2001). Fuel oil effect on the population growth, species diversity and chlorophyll (a) content of freshwater microalgae. *International Journal of Environmental Health Research*, 11(2):189-197. <https://doi.org/10.1080/09603120020047582>
- El-Jaoual T, Cox DA (1998). Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2), 353-386. <https://doi.org/10.1080/01904169809365409>
- Elçi Ş (2008). Effects of thermal stratification and mixing on reservoir water quality. *Limnology*, 9:135–142. <https://doi.org/10.1007/s10201-008-0240-x>
- Engraff M, Solere C, Smith K, Mayer P, Dahllöf I (2011). Aquatic toxicity of PAHs al PAH mixtures at saturation to benthic amphipods. *Aquatic toxicology*, 102:142-149. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.009>
- Eom IC, Rast C, Veber AM, Vasseur P (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(2):190-205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.020>
- FAO (2017). *Desarrollo Institucional para la Inversión. DT N° 9 Aspectos Ambientales de la provincia del Neuquén*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Proyecto FAO UTF ARG 017.
- FAO (2020). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. <http://www.fao.org/argentina/es/>
- Ferrante SB, Giuliani A (2014). Hidrocarburos no convencionales en Vaca Muerta, Neuquén: ¿Recursos estratégicos para el autoabastecimiento energético en

- la Argentina del siglo XXI? (dossier). *Revista Estado y Políticas Públicas*, 2(3):33-61. <http://hdl.handle.net/10469/8746>
- Ferrarese E, Andreottola G, Oprea IA (2008). Remediation of PAH-contaminated sediments by chemical oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 152(1):128-139. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.080>
- Fetzer JC (2000). *The Chemistry and Analysis of the Large Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Nueva York: Wiley. 304pp
- Fiedler S, Vepraskas MJ, Richardson JL (2007). Soil redox potential: importance, field measurements, and observations. *Advances in agronomy*, 94:1-54. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(06\)94001-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(06)94001-2)
- Fischer HB, List E, Koh R, Imberger J, Brooks N (1979). *Mixing in inland and coastal waters*. Academic Press. New York, 229-242.
- Flotron V, Delteil C, Padellec Y, Camel V (2005). Removal of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent process. *Chemosphere*, 59(10):1427-1437. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.065>
- Forsberg C (1989). Importance of sediments in understanding nutrient cyclings in lakes. *Hydrobiologia*, 176/177:263-277. <https://doi.org/10.1007/BF00026561>
- Forsythe W (1985). *Física de suelos: manual de laboratorio 1º edn*. IICA, San José de Costa Rica. 236 pp
- Froehner S, Machado KS, Dombroski LF, Nunes AC, Kishi RT, Bleninger T, Sanes J (2012). Natural biofilms in freshwater ecosystem: indicators of the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(7):3965-3973. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1164-y>
- Gala WR, Giesy J P (1994). Flow cytometric determination of the photoinduced toxicity of anthracene to the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 13(5):831-840. <https://doi.org/10.1002/etc.5620130519>

- Gan VS, Ng HK (2012). Inorganic chelated modified-Fenton treatment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soils. *Chemical Engineering Journal*, 180:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.10.082>
- Gao L, Zhou JM, Yang H, Chen J (2005). Phosphorus fractions in sediment profiles and their potential contributions to eutrophication in Dianchi Lake. *Environmental Geology*, 48, 835–844. <https://doi.org/10.1007/s00254-005-0005-3>
- García M (2008). Sedimentation engineering: processes, measurements, modeling, and practice. *American Society of Civil Engineers*. <https://doi.org/10.1061/9780784408148>
- Gaspere L, Machiwa JF, Mdachi SJM, Streck G, Brack W (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination of surface sediments and oysters from the inter-tidal areas of Dar es Salaam, Tanzania. *Environmental Pollution*, 157(1):24-34. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.08.002>
- Gerber S, Häder DP (1995). Effects of enhanced solar irradiation on chlorophyll fluorescence and photosynthetic oxygen production of five species of phytoplankton. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(1), 33-41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00266.x>
- Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR, Greenberg BM (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science*, 176:20–30. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.014>
- Germida JJ, Frick CM, Farrell RE (2002). Phytoremediation of oil contaminated soils. *Developments in Soil Science*, 28:169–186. [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(02\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(02)80015-0)
- Gilvear DJ, Petts GE (1985). Turbidity and suspended solids variations downstream of a regulating reservoir. *Earth Surface Processes and Landforms*, 10(4), 363-373. <https://doi.org/10.1002/esp.3290100408>
- Golterman HL (2004). *The Chemistry of Phosphate and Nitrogen Compounds in Sediments*. Kluwer Academic Publishers, London, 251 pp.

- Golterman HL, Clymo RS, Ohmstad M (1978). *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. IBP Handbook, 8:215.
- Golterman HL, Sly PG, Thoma RL (1983). *Study of the relationship between water quality and sediment transport*. UNESCO. 231 pp.
- Grasshoff P (1983). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie. FRG,419:61-72.
- Gryzenia J, Cassidy D, Hampton D (2009). Production and accumulation of surfactants during the chemical oxidation of PAH in soil. *Chemosphere*, 77(4):540-545. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.012>
- Håkanson L, Jansson M (1983). *Principles of Lake Sedimentology*. Springer-Verlag, Heidelberg, 316 pp.
- Hall C, Tharakan P, Hallock J, Cleveland C, Jefferson M (2003). Hydrocarbons and the evolution of human culture. *Nature*, 426 (6964):318-322. <https://doi.org/10.1038/nature02130>
- Harris GP, Trimbee AM (1986). Phytoplankton population dynamics of a small reservoir: physical/biological coupling and the time scales of community change. *Journal of Plankton Research*, 8(6):1011-1025. <https://doi.org/10.1093/plankt/8.6.1011>
- Hemraj DA, Hossain MA, Ye Q, Qin JG, Leterme SC (2017). Plankton bioindicators of environmental conditions in coastal lagoons. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 184:102-114. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.10.045>
- Henderson-Sellers (1984). *Engineering limnology*. Boston: Pitman Advanced Publishers. 356 pp
- Herrmann WA, Kohlpaintner CW, Manetsberger RB, Bahrmann H, Kottmann H (1995). Water-soluble metal complexes and catalysts. Part 7. New efficient water-soluble catalysts for two-phase olefin hydroformylation: BINAS-Na, a superlative in propene hydroformylation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 97(2):65-72. <https://doi.org/10.1002/anie.199508111>

- Hieltjes AH, Lijklema L (1980). Fractionation of inorganic phosphates in calcareous sediments. *Journal of Environment quality*, 9(3):405-407.
<https://doi.org/10.2134/jeq1980.00472425000900030015x>
- Hill GJC, Machlis L (1970) Defined media for growth and gamete production by the green alga *Oedogonium cardiacum*. *Plant physiology*, 46:224-226.
<https://doi.org/10.1104/pp.46.2.224>
- Hillebrand H, Claus Dieter D, Pollinger KU, Zohar T (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35, 403–424.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Hjorth M, Vester J, Henriksen P, Forbes V, Dahllöf I (2007). Functional and structural responses of marine plankton food web to pyrene contamination. *Marine Ecology Progress Series*, 338:21-31.
<https://doi.org/10.3354/meps338021>
- Hoffman DJ, Rattner BA, Burton Jr GA, Cairns Jr J (2002). *Handbook of ecotoxicology*. CRC press. 1312 pp
- Hongve D (1997). Cycling of iron, manganese, and phosphate in a meromictic lake. *Limnology and Oceanography*, 42(4):635-647.
<https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.4.0635>
- Horne AJ, Goldman CL (1994). *Limnology*. MacGraw-Hill, Inc. Second Edition, New York. 576 pp.
- Hoshaw RW, Rosowski JR, Stein JR (1973). *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge. 448 pp
- Huang KC, Zhao Z, Hoag GE, Dahmani A, Block PA (2005). Degradation of volatile organic compounds with thermally activated persulfate oxidation. *Chemosphere*, 61:551–560.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.032>
- Huling SG, Pivetz BE (2006). *In situ chemical oxidation*. U.S. Environmental Protection Agency, (EPA/600/R-06/072), 60 pp.

- Hung WN, Chiou CT, Lin TF (2014). Lipid–water partition coefficients and correlations with uptakes by algae of organic compounds. *Journal of hazardous materials*, 279:197-202. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.071>
- Hurley KA (1977). *Vertical heat transport mechanisms in lakes and reservoirs*. Tesis Doctoral. Massachusetts Institute of Technology.
- IAPG (2001). *Clasificación del petróleo*. Instituto Argentino del Petróleo y el Gas. <https://www.iapg.org.ar>
- IARC (1983). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 32. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data*. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. France. 483 pp.
- Imbellone PA, Beilinson E, Aguilera EY (2017). Micromorfología de suelos. *Suelos y Geología Argentina, una visión integradora desde diferentes campos disciplinarios*. Pereyra F; Torres Duggan M (Eds.), 159-183
- Imberger J, Patterson JC, Hutchinson JW, Wu T (1990). Advances in Applied Mechanics. *Physical Limnology*, 27, 303-475.
- Istvánovics V, Osztóics A, Honti M (2004). Dynamics and ecological significance of daily internal load of phosphorus in shallow Lake Balaton, Hungary. *Freshwater Biology*, 49(3), 232-252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01180.x>
- Jeppesen E, Søndergaard M, Jensen JP, Havens KE, Anneville O, Carvalho L, Gerdeaux D, Winder M (2005). Lake responses to reduced nutrient loading— an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshwater Biology*, 50(10), 1747-1771. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01415.x>
- Julien PY (2010). *Erosion and sedimentation*. Cambridge university press. 355 pp
- Kalff J (2002). *Limnology: inland water ecosystems*. Upper Saddle River, NJ : Prentice Hall. 592 pp

- Kauss PB, Hutchinson TC (1970). The effects of water-soluble petroleum components on the growth of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Environmental Pollution*, 9.3(1975):157-174. [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(75\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0013-9327(75)90033-6)
- Kittrell FW (1965). Thermal stratification in reservoirs. *Symposium on Stream-flow Regulation for Quality Control*. Robert A. Taft Sanitary Engineering Center. 57-67
- Kolthoff IM, Miller IK (1951). The chemistry of persulfate. I. The kinetics and mechanism of the decomposition of the persulfate ion in aqueous medium. *Journal of the American Chemical Society*, 73(7):3055-3059. <https://doi.org/10.1021/ja01151a024>
- Kostic S, Parker G (2003). Progradational sand-mud deltas in lakes and reservoirs. Part 1. Theory and numerical modeling. *Journal of Hydraulic Research*, 41(2):127-140. <https://doi.org/10.1080/00221680309499956>
- Kulik N, Goi A, Trapido M, Tuhkane T (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environment Management*, 78:382–391. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.05.005>
- Labollita HA, Pedrozo FL (1997). Factors controlling the trophic state of reservoirs at the basins of Limay, Neuquen and Negro Rivers (Argentina). *Proceedings of the 7th International Conference on Lakes Conservation and Management: ILEC-Lacar'97*. International Lakes Environment Committee Foundation. 21-3
- Lamas ML, Salusso MM (2014). Dinámica del fósforo en agua y sedimentos de un embalse subtropical (Salta, Argentina) [Dynamics of phosphorus in water and sediments of a subtropical reservoir (Salta, Argentina)]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 6.2:239. <http://www.ijias.issr-journals.org/abstract.php?article=IJIAS-14-131-01>
- Leanza HA, Hugo C, Repol D, González R, Danieli JC, Lizuain A (2001). *Hoja Geológica 3969-I, Zapala. Provincia del Neuquén*. Servicio Geológico

Minero Argentino. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Boletín 275, 134 p. Buenos Aires. <http://repositorio.segemar.gob.ar/handle/308849217/198>

Lee-Hyung K., Choi E., and Stenstrom M. K. (2003). Sediment characteristics, phosphorus types and phosphorus release rates between river and lake sediments. *Chemosphere*, Vol. 50, pp. 53–61. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00310-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00310-7)

Lei Z (2002). "Effects of petroleum hydrocarbon on the growth of marine algae: Experiment versus model. *Journal of Ocean University of Qingdao*. 32.5: 804-810.

León JG, Pedrozo FL, Temporetti PF (2017). Phosphorus fractions and sorption dynamics in the sediments of two Ca-SO₄ water reservoirs in the central Argentine Andes. *International journal of sediment research*, 32(3):442-451. <https://doi.org/10.1016/j.ijsrc.2017.03.002>

Leturia MF, Nugoli SC (2017). La contaminación por hidrocarburos. El caso "Magdalena". *Anales de la Facultad de Ciencias Jurídicas y Sociales de la Universidad Nacional de La Plata*. 46 (2017).

Liang B, Lehmann J, Solomon D, Kinyangi J, Grossman B, O'Neill B, Skjemstad O, Thies J, Luizao FJ, Petersen J, Neves EG (2006). Black Carbon Increases Cation Exchange Capacity in Soils. *Soil Science Society of America Journal*, J. 70:1719–1730. <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0383>

Liang C, Bruell CJ (2008). Thermally activated persulfate oxidation of trichloroethylene: experimental investigation of reaction orders. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(9):2912-2918. <https://doi.org/10.1021/ie070820l>

Liang C, Bruell CJ, Marley MC, Sperry KL (2004). Persulfate oxidation for in situ remediation of TCE Activated by chelated ferrous ion. *Chemosphere*, 55:1225–1233. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.01.030>

- Liang C, Chien YC, Lin YL (2012). Impacts of ISCO persulfate, peroxide and permanganate oxidants on soils: soil oxidant demand and soil properties. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 21(6):701-719. <https://doi.org/10.1080/15320383.2012.691129>
- Liang, C., Liang, C. P., & Chen, C. C. (2009). pH dependence of persulfate activation by EDTA/Fe (III) for degradation of trichloroethylene. *Journal of contaminant hydrology*, 106(3-4), 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2009.02.008>
- Libes S (2009). *Introduction to marine biogeochemistry*. Academic Press, ISBN 978-0-12-088530-5. 801 pp
- Liu FJ; Wang JS; Theodorakis CW (2006). Thyrotoxicity of sodium arsenate, sodium perchlorate, and their mixture in zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology*, 40(10):3429-3436. <https://doi.org/10.1021/es052538g>
- Löfgren S, Boström B (1989). Interstitial water concentrations of phosphorus, iron and manganese in a shallow, eutrophic Swedish lake—implications for phosphorus cycling. *Water research*, 23(9):1115-1125. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(89\)90155-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90155-3)
- Lopez Ordieres MC (2016). *Determinación de la calidad química del agua de la baja cuenca del río neuquén asociada a las actividades hidrocarburífera y agrícola*. Tesis de Licenciatura en Saneamiento y Protección Ambiental. Universidad Nacional del Comahue, Argentina
- Lozada M, Marcos MS, Dionisi HM (2014). *La biorremediación de ambientes costeros contaminados con hidrocarburos*. Fondo Editorial Provincial (Chubut). ISBN:978-987-1412-60-0. 156 pp
- Lundstedt S, Persson Y, Öberg L (2006). Transformation of PAHs during ethanol-Fenton treatment of an aged gasworks' soil. *Chemosphere*, 65(8):1288-1294. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.031>

- Luque J, Ciano N, Nakamatsu V, Amari M, Lisoni C (2000). Saneamiento de derrames de hidrocarburos por la técnica de biodegradación “*in situ*” en Patagonia, Argentina. *XI Conferencia de la International Soil Conservation Organization* (ISCO 2000). Buenos Aires, Argentina.
- Luque-García J, Luque de Castro M (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22:41–47. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00102-X)
- Maassen S, Uhlmann D, Roske I (2005). Sediment and pore water composition as a basis for the trophic evaluation of standing waters. *Hydrobiologia*, 543:55–70. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-5946-0>
- Mansilla D (2007). *Hidrocarburos y política energética: de la importancia estratégica al valor económico: Desregulación y privatización de los hidrocarburos en Argentina*. Ediciones del CCC Centro Cultural de la Cooperacion Floreal. 182 pp.
- Marcano J (2009). *Educación ambiental*. <https://jmarcano.com/ecologia/ecologia-aguas-dulces1/ecologia-aguas-dulces3/>
- Margalef R (1983). *Limnología* (Vol. 1009). Barcelona: Omega. 951 pp
- Martin JL, McCutcheon SC (1998). *Hydrodynamics and Transport for Water Quality Modeling*. CRC Press, Boca Raton, USA. 816 pp
- Margiotta F, Balestra C, Buondonno A, Casotti R, D'Ambra I, Di Capua I, Gallia R, Mazzocchi MG, Merquiol L, Pepi M, Percopo I, Saggiomo M, Sarno D, Zignone A (2020). Do plankton reflect the environmental quality status? The case of a post-industrial Mediterranean Bay. *Marine Environmental Research*, 104980. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104980>
- Marzolf GR (1990). Reservoirs as environments for zooplankton. *Reservoir Limnology: Ecological Perspectives*. John Wiley & Sons, New York, 195-208. 1990 pp

- Medina R (2017). *Remediación de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos* Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata.
- Medina R, Gara PMD, Rosso JA, Del Panno MT (2021). Effects of organic matter addition on chronically hydrocarbon contaminated soil. *Biodegradation*, 32(2):145-163. <https://doi.org/10.1007/s10532-021-09929-y>
- Megharaj M, Singleton I, McClure NC, Naidu R (2000). Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38(4):439-445. <https://doi.org/10.1007/s002449910058>
- Menone ML, Iturburu FG, Demetrio PM, Venturino A, Pedrozo FL, Temporetti PF, Rodriguez A, Amé MV, Quaini KP, Collins PA (2020). Calidad del agua y niveles guía para la protección de la biodiversidad acuática. Interacción entre ciencia y gestión. *Ecología Austral* (Artículo en prensa)
- Millemann RE, Birge WJ, Black JA, Cushman RM, Daniels KL, Franco PJ, Stewart AJ (1984). Comparative acute toxicity to aquatic organisms of components of coal-derived synthetic fuels. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113(1):74-85. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1984\)113%3C74:CATTAO%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1984)113%3C74:CATTAO%3E2.0.CO;2)
- Mohammed M, Markert B (2006). Toxicity of heavy metals on *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de Brébisson in Batch Cultures. *Environmental Science and Pollution Research*, 13(2):98-104. <https://doi.org/10.1065/espr2005.07.274>
- Monnin L, Ciffroy P, Garnier JM, Ambrosi JP, Radakovitch O (2018). Remobilization of trace metals during laboratory resuspension of contaminated sediments from a dam reservoir. *Journal of Soils and Sediments*, 18(7):2596-2613. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-1931-5>

- Montgomery D (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. Universidad Estatal de Arizona. 2^{da} Edn. Limusa Wiley, México. 686 pp
- Monza LB, Loewy RM, Savini MC, Pechen de d'Angelo AM (2013). Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments from the Neuquén River, Argentine Patagonia. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(4):370-379. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.728097>
- Mora VC, Madueño L, Peluffo M, Rosso JA, Del Panno MT, Morelli IS (2014). Remediation of phenanthrene-contaminated soil by simultaneous persulfate chemical oxidation and biodegradation processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(12):7548-7556. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2687-0>
- Mora VC, Morelli IS, Rosso JA (2020). Co-treatment of an oily sludge and aged contaminated soil: permanganate oxidation followed by bioremediation. *Journal of environmental management*, 261:110169. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110169>
- Mora VC, Rosso JA, Carrillo Le Roux G, Mártire DO, Gonzalez MC (2009) Thermally activated peroxydisulfate in the presence of additives: a clean method for the degradation of pollutants. *Chemosphere*, 75:1405–1409. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.038>
- Morelli IS, Del Panno MT, De Antoni GL, Paineira MT (2005). Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. *International biodeterioration & biodegradation*, 55(4):271-278. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.03.001>
- Morris GL, Fan J (1998). *Reservoir sedimentation handbook: design and management of dams, reservoirs, and watersheds for sustainable use*. McGraw Hill Professional. 810 pp
- Munawar M, Munawar IF (1987) Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of *in situ* sediment contaminants. *Ecological Effects of In Situ Sediment*

Contaminants, 87-105. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4053-6_10

Murphy J, Riley JP (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27:31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)

Mussini E, Crespo G, Bianco H (1984). *Evolución de la materia organica en suelos de la provincia del neuquen*. *Ciencia del Suelo*, 2(1).

Nagpal NK (1993). Ambient water quality criteria for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Ministry of Environment, Lands and Parks Province of British Columbia, Victoria. 135 pp

Nalewajko C, Colman B, Olaveson M (1997). Effects of pH on growth, photosynthesis, respiration, and copper tolerance of three *Scenedesmus* strains. *Environmental and experimental botany*, 37(2-3):153-160. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(96\)01029-5](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(96)01029-5)

Nam K, Rodriguez W, Kukor JJ (2001). Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction. *Chemosphere*, 45(1):11-20. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00051-0)

Nannavecchia PS (2016). *Contaminación antrópica de los cuerpos de agua. Estudio de su efecto sobre organismos del fitoplancton a escala ecológica y de bioensayos de laboratorio*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Argentina

Net S, El-Osmani R, Prygiel E, Rabodonirina S, Dumoulin D, Ouddane B (2015). Overview of persistent organic pollution (PAHs, Me-PAHs and PCBs) in freshwater sediments from Northern France. *Journal of Geochemical Exploration*, 148:181-188. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2014.09.008>

Neta P, Huie RE, Ross AB (1988). Rate constants for reactions of inorganic radicals in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17(3), 1027-1284. <https://doi.org/10.1063/1.555808>

- Nichela D, Haddou M, Benoit-Marquié F, Maurette MT, Oliveros E, García Einschlag F (2010). Degradation kinetics of hydroxy and hydroxynitro derivatives of benzoic acid by fenton-like and photo-fenton techniques: A comparative study. *Applied Catalysis B: Environmental*, 98:171-179. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.05.026>
- Nürnberg GK (2009). Assessing internal phosphorus load—problems to be solved. *Lake and Reservoir Management*, 25(4):419-432. <https://doi.org/10.1080/00357520903458848>
- Nyholm N, Källqvist T (1989). Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 8(8):689-703. <https://doi.org/10.1002/etc.5620080807>
- O'Brien PY, Dixon PS (1976). The effects of oils and oil components on algae: a review. *British Phycological Journal*, 11(2):115-142. <https://doi.org/10.1080/00071617600650161>
- OECD (1982). *Eutrophication of waters, monitoring, assessment and control*. OECD, Paris, 154 pp.
- Okay OS, Tüfekçi V, Donkin P (2002). Acute and chronic toxicity of pyrene to the unicellular marine alga *Phaeodactylum tricorutum*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 68(4):600-605. <https://doi.org/10.1007/s001280296>
- Okely P, Imberger J (2007). Horizontal transport induced by upwelling in a canyon-shaped reservoir. *Hydrobiologia*, 586(1):343-355. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-0706-6>
- Okere U, Semple K (2012). Biodegradation of PAHs in 'pristine' soils from different climatic regions. *J Bioremed Biodegrad S*, 1(2). <https://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.S1-006>
- Ollas M, Nieto JM, Sarmiento AM, Cerón JC, Cánovas CR (2004). Seasonal water quality variations in a river affected by acid mine drainage: the Odiel River

- (South West Spain). *Science of the total environment*, 333(1-3):267-281.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.012>
- Oliva AL (2016). Acumulación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en sedimentos y mejillines (*Brachidontes rodriguezii*) del estuario de Bahía Blanca. Tesis, Universidad Nacional del Sur, Argentina
- Olsen SR, Watanabe FS (1957). A method to determine a phosphorus adsorption maximum of soils as measured by the Langmuir isotherm. *Soil Science Society of America Journal*, 21(2):144-149.
<https://doi.org/10.2136/sssaj1957.03615995002100020004x>
- Oprea I, Badea A, Ziglio G, Ragazz M, Andreottola G, Ferrarese E, Apostol T (2009). The remediation of contaminated sediments by chemical oxidation. *Sci. Bull*, 71, 131-142.
- Ordóñez Suárez JL (2001). *Procesos y tecnologías emergentes de remediación de aguas subterráneas contaminadas con disolventes clorados*. Investigación, gestión y recuperación de acuíferos contaminados. IGME, Madrid, 245-258.
- Ospina-Alvarez N, Pena, EJ (2004). Alternativas de monitoreo de calidad de aguas: algas como bioindicadores. *Ata Nova*, 2(4):513-517
- Palese C, Gardiol JM, Lassig JL (2009). Mapas de velocidad media del viento en el centro-este de la provincia de Neuquen. *Meteorológica*, 34(1):17-27.
- Pardo F, Santos A, Romero A (2016). Fate of iron and polycyclic aromatic hydrocarbons during the remediation of a contaminated soil using iron-activated persulfate: a column study. *Science of The Total Environment*, 566:480-488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.197>
- Paredes J, Rubio C, Solera A, Andreu J (2013). Modelación de la dinámica térmica de embalses mediterráneos: El caso del embalse de Amadorio (Alicante, España). *Tecnología y ciencias del agua*, 4(1):5-25.
- Parmar TK, Deepak R, Agrawal YK (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in life science*, 9.2:110-118.
<https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>

- Passarge J, Hol S, Escher M, Huisman J (2006). Competition for nutrients and light: stable coexistence, alternative stable states, or competitive exclusion? *Ecological Monographs*, 76(1):57-72. <https://doi.org/10.1890/04-1824>
- Patrolecco L, Ademollo N, Capri S, Pagnotta R, Polesello S (2010). Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). *Chemosphere*, 81(11):1386-1392. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.027>
- Pedrozo F, Chillrud S, Temporetti P, Diaz M (1993). Chemical composition and nutrient limitation in rivers and lakes of northern Patagonian Andes (39.5-42 S; 71 W)(Rep. Argentina). *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 25(1):207-214. <https://doi.org/10.1080/03680770.1992.11900093>
- Peluffo M. (2016) *Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante oxidación química*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Peluffo M, Mora VC, Morelli IS, Rosso JA (2018). Persulfate treatments of phenanthrene-contaminated soil: Effect of the application parameters. *Geoderma*, 317:8-14. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.12.016>
- Peralta P, Fuentes V (2005). Fitobentos, fitoplancton y zooplancton litoral del bañado de Carilauquen, Cuenca de Llanquanelo, Mendoza, Argentina. *Limnetica*, 24(1-2):183-198. <https://doi.org/10.23818/limn.24.18>
- Ptacnik R, Lepistö L, Willén E, Brettum P, Andersen T, Rekolainen S, Carvalho L (2008). Quantitative responses of lake phytoplankton to eutrophication in Northern Europe. *Aquatic Ecology*, 42(2):227-236. <https://doi.org/10.1007/s10452-008-9181-z>
- Quirós R (1988). Relationships between air temperature, depth, nutrients and chlorophyll in 103 Argentinian lakes: With 2 figures and 6 tables in the text. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie:*

- Rabodonirina S, Net S, Ouddane B, Merhaby D, Dumoulin D, Popescu T, Ravelonandro P (2015). Distribution of persistent organic pollutants (PAHs, Me-PAHs, PCBs) in dissolved, particulate and sedimentary phases in freshwater systems. *Environmental pollution*, 206:38-48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.06.023>
- Ramadass K, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R (2016). Sensitivity and antioxidant response of *Chlorella* sp. MM3 to used engine oil and its water accommodated fraction. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97(1):71-77. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1817-4>
- Rast W, Jones RA, Lee GF (1983). Predictive capability of US OECD phosphorus loading-eutrophication response models. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 990-1003. <https://www.jstor.org/stable/25042007>
- Rattan KJ, Corriveau JC, Brua RB, Culp JM, Yates AG, Chambers PA (2017). Quantifying seasonal variation in total phosphorus and nitrogen from prairie streams in the Red River Basin, Manitoba Canada. *Science of the Total Environment*, 575, 649-659. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.073>
- Reasoner DJ, Geldreich EE (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology*, 49(1):1-7.
- Ren L, Rabalais NN, Turner RE, Morrison W, Mendenhall W (2009). Nutrient limitation on phytoplankton growth in the upper Barataria Basin, Louisiana: microcosm bioassays. *Estuaries and Coasts*, 32(5):958-974. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9174-8>
- Reynolds CS (1988). The concept of ecological succession applied to seasonal periodicity of freshwater phytoplankton: With 4 figures in the text. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*:

Verhandlungen, 23(2), 683-691.
<https://doi.org/10.1080/03680770.1987.11899692>

- Rhee GY, Gotham IJ (1980). Optimum N: P ratios and coexistence of planktonic algae 1. *Journal of phycology*, 16(4):486-489.
- Richardson SD, Aitken MD (2011). Desorption and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil subjected to long term in situ biostimulation. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(12):2674-2681.
<https://doi.org/10.1002/etc.682>
- Richardson TL, Pinckney JL, Paerl HW (2001). Responses of estuarine phytoplankton communities to nitrogen form and mixing using microcosm bioassays. *Estuaries*, 24(6):828-839. <https://doi.org/10.2307/1353174>
- Ringuelet R (1967). Contaminación o polución del ambiente acuático con referencia especial a la que afecta al área platense. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, La Plata (Buenos Aires, Argentina). AGRO, Publicación Técnica. Año IX, N° 15.
- Rocha GS, Pinto FHV, Melão MGG, Lombardi AT (2015). Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? *Journal of applied phycology*, 27(1):171-178. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0320-8>
- Rodrigo MA, Rojo C, Larrosa J, Segura M, Moeys M (2007). Influencia de la concentración de nutrientes y la herbivoría sobre la estructura y la función de una comunidad algal. *Limnetica*, 26(1):183-198. ISSN 0213-8409
- Rosso JA, Allegretti P, Mártire DO, Gonzalez MC (1999). Reaction of sulphate and phosphate radicals with trifluorotoluene. *Journal Chemical Society, Perkin Trans*, 2:205–210. <https://doi.org/10.1039/A807751G>
- Rovedatti MG, Loez CR, Topalián ML, Castañé PM, Salibián A, Olguín HF (2000). Monitoring of a polluted river (Reconquista, Argentina) based on physicochemical parameters and phytoplankton. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 27(5):2743-2748. <https://doi.org/10.1080/03680770.1998.11898165>

- Ryding SO, Rast W (1992). *El control de la eutrofización en lagos y pantanos*. Siri: i9788436806588). 375 pp
- Rysgaard S, Risgaard-Petersen N, Sloth NP (1996). Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. *Coastal Lagoon Eutrophication and ANaerobic Processes CLE AN*, 133-141. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1744-6_11
- Sahl J, Munakata-Marr J (2006). The effects of in situ chemical oxidation on microbiological processes: A review. *Remediation Journal: The Journal of Environmental Cleanup Costs, Technologies & Techniques*, 16(3):57-70. <https://doi.org/10.1002/rem.20091>
- Sargian P, Mas S, Pelletier E, Demers S (2007). Multiple stressors on an Antarctic microplankton assemblage: water soluble crude oil and enhanced UVBR level at Ushuaia (Argentina). *Polar Biology*, 30(7):829-841. <https://doi.org/10.1007/s00300-006-0243-1>
- Schindler D, Hecky RE, Findlay DL, Stainton MP, Parker BR, Paterson MJ, Beaty KG, Lyng M, Kasian EM (2008). Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole ecosystem experiment. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*, 105:11254–11258. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805108105>
- Seiler T-B, Best N, Fernqvist MM, Hercht H, Smith K, Braunbeck T, Mayer P, Hollert H (2014). PAH toxicity at aqueous solubility in the fish embryo test with *Danio rerio* using passive dosing. *Chemosphere* 112:77-84. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.064>
- Sibley PK, Harris ML, Bestari KT, Steele TA, Robinson RD, Gensemer RW, Solomon KR (2004). Response of zooplankton and phytoplankton communities to creosote-impregnated Douglas fir pilings in freshwater microcosms. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 47(1):56-66. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-3129-7>

- Siegrist RL, Urynowicz MA, Crimi ML, Lowe KS (2002). Genesis and effects of particles produced during in situ chemical oxidation using permanganate. *Journal of Environmental Engineering*, 128(11):1068-1079. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2002\)128:11\(1068\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2002)128:11(1068))
- Sirguey C, de Souza e Silva PT, Schwartz C, Simonnot M (2008). Impact of chemical oxidation on soil quality. *Chemosphere*, 72:282–289. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.027>
- Siron R, Giusti G, Berland B, Morales-Loo R, Pelletier E (1991). Water-soluble petroleum compounds: chemical aspects and effects on the growth of microalgae. *Science of the total environment*, 104(3):211-227. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(91\)90073-N](https://doi.org/10.1016/0048-9697(91)90073-N)
- Smedes F, Van Vliet LA, Booij K (2013). Multi-ratio equilibrium passive sampling method to estimate accessible and pore water concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in sediment. *Environmental science & technology*, 47(1):510-517. <https://doi.org/10.1021/es3040945>
- Smolders A, Roelofs JGM (1993). Sulphate-mediated iron limitation and eutrophication in aquatic ecosystems. *Aquatic Botany*, 46(3-4):247-253. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(93\)90005-H](https://doi.org/10.1016/0304-3770(93)90005-H)
- Sommer U, Gliwicz ZM, Lampert W, Duncan A (1986). The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. Hydrobiol*, 106(4), 433-471.
- Søndergaard M, Jensen JP, Jeppesen E (2003). Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes. *Hydrobiologia*, 506(1-3):135-145. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000008611.12704.dd>
- Soto D (1994). The Torres del Paine lake district (Chilean Patagonia): a case of potentially N-limited lakes and ponds. *Archives of Hydrobiology*, 99, 181-197.

- Styszko K (2016). Sorption of emerging organic micropollutants onto fine sediments in a water supply dam reservoir, Poland. *Journal of soils and sediments*, 16(2):677-686. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1239-7>
- Summer ME, Miller WP (1996). Cation exchange capacity and exchange coefficients. *Methods of Soil Analysis*. SSSA Book Series: 5, Part 3. Chemical Methods. Chapter 40: 1201- 1229. Madison, Wisconsin, USA. 1390 p.
- Sutton NB, Grotenhuis JTC, Langenhoff AA, Rijnaarts HH (2011). Efforts to improve coupled in situ chemical oxidation with bioremediation: a review of optimization strategies. *Journal of Soils and Sediments*, 11(1):129-140. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0272-9>
- Swartz RC (1999). Consensus sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(4):780-787. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180426>
- Swartz RC, Kemp PF, Schults DW, Ditsworth GR, Ozretich RJ (1989). Acute toxicity of sediment from Eagle Harbor, Washington, to the infaunal amphipod *Rhepoxynius abronius*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 8(3):215-222. <https://doi.org/10.1002/etc.5620080304>
- Sze P (1980). Seasonal succession of phytoplankton in Onondaga Lake, New York (USA). *Phycologia*, 19(1):54-59. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-19-1-54.1>
- Tang X, Wu M, Li R (2018). Distribution, sedimentation, and bioavailability of particulate phosphorus in the mainstream of the Three Gorges Reservoir. *Water research*, 140:44-55. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.024>
- Tansel B, Rafiuddin S (2016). Heavy metal content in relation to particle size and organic content of surficial sediments in Miami River and transport potential. *International Journal of Sediment Research*, 31(4):324-329. <https://doi.org/10.1016/j.ijsrc.2016.05.004>

- Temporetti P (1999). *Dinámica del fósforo en cuerpos de agua con cría intensiva de salmonidos*. Tesis doctoral. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Argentina
- Temporetti P, Beamud G, Pedrozo F (2014). The Trophic State of Patagonian Argentinean Lakes and its Relationship with Depth Distribution in Sediment Phosphorus. *International Journal of Environment Research*, 8(3):671-686. <https://dx.doi.org/10.22059/ijer.2014.762>
- Temporetti P, Snodgrass K, Pedrozo F (2013). Dynamics of phosphorus in sediments of a naturally acidic lake. *International Journal of Sediment Research*, 28:90-102. [https://doi.org/10.1016/S1001-6279\(13\)60021-9](https://doi.org/10.1016/S1001-6279(13)60021-9)
- Temporetti PF, Alonso MF, Baffico G, Diaz MM, Lopez W, Pedrozo FL, Vigliano PH (2001). Trophic state, fish community and intensive production of salmonids in Alicura Reservoir (Patagonia, Argentina). *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 6(4):259-267. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1770.2001.00142.x>
- Teodoru C, Wehrli B (2005). Retention of sediments and nutrients in the Iron Gate I Reservoir on the Danube River. *Biogeochemistry*, 76(3):539-565. <https://doi.org/10.1007/s10533-005-0230-6>
- Thornton KW, Kimmel BL, Payne FE (1990). *Reservoir limnology: ecological perspectives*. John Wiley & Sons. 256 pp
- Thuy HTT, Loan TTC, Phuong TH (2018). The potential accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in phytoplankton and bivalves in Can Gio coastal wetland, Vietnam. *Environmental Science and Pollution Research*, 25.18:17240-17249. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2249-y>
- Tsitonaki A, Smets BF, Bjerg PL (2008). Effects of heat activated persulfate oxidation on soil microorganisms. *Water Research*, 42:1013–1022. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.09.018>
- Ujowundu CO, Kalu FN, Nwaoguikpe RN, Kalu OI, Ihejirika CE, Nwosunjoku EC, Okechukwu RI (2011). Biochemical and physical characterization of diesel

petroleum contaminated soil in southeastern Nigeria. *Research Journal of Chemical Sciences*, 1(8):57-62. ISSN 2231-606X

Upham BL, Weis LM, Trosko JE (1998). Modulated gap junctional intercellular communication as a biomarker of PAH epigenetic toxicity: structure-function relationship. *Environmental Health Perspectives*, 106:975–981. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106s4975>

Usman M, Faure P, Ruby C, Hanna K (2012). Application of magnetite-activated persulfate oxidation for the degradation of PAHs in contaminated soils. *Chemosphere*, 87(3):234-240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.001>

Usman M, Hanna K, Haderlein S (2016). Fenton oxidation to remediate PAHs in contaminated soils: A critical review of major limitations and counter-strategies. *Science of the Total Environment*, 569:179-190. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.135>

USEPA (2002). *Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organism*. 4th ed. EPA-821-R-02-013, Washington DC

USEPA (2012). *Ecological Effects Test Guidelines*. OCSP 850.4500: Algal Toxicity EPA 712-C-006. Washington, DC

Usman M, Hanna K, Faure P (2018). Remediation of oil-contaminated harbor sediments by chemical oxidation. *Science of the Total Environment*, 634, 1100-1107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.092>

Varela A (2013). *Interpretación Sísmica del Cretácico en el área Loma La Lata, Cuenca Neuquina, Provincia de Neuquén, Argentina*. Trabajo Final de Licenciatura, Universidad Nacional de San Juan, Argentina.

Veignie E, Rafin C, Landy D, Fourmentin S, Surpateanu G (2009). Fenton degradation assisted by cyclodextrins of a high molecular weight polycyclic

- aromatic hydrocarbon benzo [a] pyrene. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2-3):1296-1301. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.012>
- Verlecar XN, Desai SR, Sarkar A, Dalal SG (2006). Biological indicators in relation to coastal pollution along Karnataka coast, India. *Water research*, 40(17):3304-3312. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.022>
- Vidal-Liñán L, Bellas J; Campillo JA, Beiras R (2010). Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere*. 78(3):265-272. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.06>
- Vollenweider RA (1976). Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, Dott. Marco de Marchi Verbania Pallanza*.
- Vollenweider RA, Kerekes JJ (1980). Background and summary results of the OECD cooperative program on eutrophication. *Proceedings of an International Symposium on Inland Waters and Lake Restoration*. U.S. Environmental Protection Agency. EPA 440/5-81-010:26-36.
- Waldemer RH, Tratnyek PG, Johnson RL, Nurmi JT (2007). Oxidation of chlorinated ethenes by heat-activated persulfate: kinetics and products. *Environmental Science & Technology*, 41(3):1010-1015. <https://doi.org/10.1021/es062237m>
- Wang Z, Ma X, Na G, Lin Z, Ding Q, Yao Z (2009). Correlations between physicochemical properties of PAHs and their distribution in soil, moss and reindeer dung at Ny-Ålesund of the Arctic. *Environmental Pollution*, 157(11):3132-3136. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.014>
- Watts RJ, Stanton PC, Howsawkung J, Teel AL (2002). Mineralization of a sorbed polycyclic aromatic hydrocarbon in two soils using catalyzed hydrogen peroxide. *Water Research*, 36(17):4283-4292. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00142-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00142-2)

- Wetzel RG (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. Gulf professional publishing, Houston. 1006 pp
- Wetzel RG, Likens GE (1991). *Limnological analyses*. Springer verlag, 2nd edn, New York. 391 pp
- White DJ, Noll MR, Makarewicz JC (2008). Does manganese influence phosphorus cycling under suboxic lake water conditions? *Journal of Great Lakes Research*, 34(4):571-580. [https://doi.org/10.1016/S0380-1330\(08\)71602-2](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(08)71602-2)
- WHO (2004). Guidelines for drinking-water quality (Vol. 1). World Health Organization, Geneva. 142 pp
- Wick AF, Haus NW, Sukkariyah BF, Haering KC, Daniels WL (2011) Remediation of PAH-contaminated soils and sediments: A literature review. CSES Department, Internal Research Document. p 1–102. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.467.2723&rep=rep1&type=pdf>
- Wild S, Jones K (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution*, 88:91–108. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)91052-M](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)91052-M)
- Wu N, Schmalz B, Fohrer N (2014). Study progress in riverine phytoplankton and its use as bio-indicator—a review. *Austin Journal of Hydrology*, 1.1:9.
- Yalçın-Özdilek Ş, Özdilek HG, Ozaner FS (2007). Possible influence of beach sand characteristics on green turtle nesting activity on Samandağ Beach, Turkey. *Journal of Coastal Research*, 23(6 (236)):1379-1390. <https://doi.org/10.2112/06-0630.1>
- Yen CH, Chen KF, Kao CM, Liang SH, Chen TY (2011). Application of persulfate to remediate petroleum hydrocarbon-contaminated soil: feasibility and comparison with common oxidants. *Journal of hazardous materials*, 186(2-3):2097-2102. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.129>

- Yunker MB, Macdonald RW, Vingarzan R, Mitchell RH, Goyette D, Sylvestre S (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic geochemistry*, 33(4):489-515. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(02\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(02)00002-5)
- Zachleder V, Tukaj Z (1993). Effect of fuel oil and dispersant on cell cycle and macromolecular synthesis in the chlorococcal alga *Scenedesmus armatus*. *Marine Biology*, 117(2):347-353. <https://doi.org/10.1007/BF00345680>
- Zambrano J, Carballeira A (2011). Efectos de hidrocarburos sobre la fisiología y el crecimiento de *Ulva* sp. (Chlorophyta). *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 15(1-4):373-381.
- Zanettini JCM, Santamaría GR, Leanza H (2001). *Hoja Geológica 3772-II, Las Ovejas. Provincia del Neuquén*. Servicio Geológico Minero Argentino. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Boletín 263, 67p. Buenos Aires. <https://repositorio.segemar.gov.ar/handle/308849217/151>
- Zhang X, Xia X, Dong J, Bao Y, Li H (2014). Enhancement of toxic effects of phenanthrene to *Daphnia magna* due to the presence of suspended sediment. *Chemosphere*, 104:162-169. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.086>
- Zhao C, Pan X, Xiang H, Yang S, Zhao J, Gan X, Dong B, Ding S (2020). Determination of priority areas and principal environmental factors for water ecosystem health remediation. *Ecohydrology*, 13(1), e2165. <https://doi.org/10.1002/eco.2165>

10 Trabajo de respaldo

ENVIRONMENTAL EARTH SCIENCES

Publisher: **SPRINGER**, ONE NEW YORK PLAZA, SUITE 4600, NEW YORK, United States, NY, 10004

ISSN / eISSN: **1866-6280 / 1866-6299**

Web of Science Core Collection: **Science Citation Index Expanded**

Additional Web of Science Indexes: **Biological Abstracts | BIOSIS Previews | Current Contents Agriculture, Biology & Environmental Sciences | Essential Science Indicators**



Environmental Earth Sciences

[Editorial board](#) [Aims & scope](#) [Journal updates](#)

Environmental Earth Sciences is an international multidisciplinary journal concerned with innovative approaches and significant aspects of interaction between humans, natural resources or unique geographic zones, with emphasis on the solid earth.

In pursuit of these topics, the geoscientific community is invited to contribute their knowledge and experience. Major disciplines include: hydrogeology, hydrochemistry, geochemistry, geophysics, engineering geology, natural resources management, environmental geography and soil science. — [show all](#)

Editors-in-Chief

Gunter Dörhöfer, James LaMoreaux, Olaf Kolditz

Publishing model

Hybrid. [Learn about publishing OA with us](#)

2.180 (2019)

Impact factor

66 days

Submission to first decision

637,329 (2019)

Downloads

2.253 (2019)

Five year impact factor

288 days

Submission to acceptance



Rotondo, Leandro <leandrorotondo@comahue-conicet.gob.ar>

ENGE: Your manuscript entitled Effects of lake sediment contamination by PAHs on nutrients and phytoplankton in Vaca Muerta, Neuquén, Argentina - [EMID:12e7e13c3ad6e004]

James W. LaMoreaux <em@editorialmanager.com>
Responder a: "James W. LaMoreaux" <eeswest@yahoo.com>
Para: Leandro Rotondo <leandrorotondo@comahue-conicet.gob.ar>

19 de noviembre de 2020, 16:10

Ref.: Ms. No. ENGE-D-19-02760R3
Effects of lake sediment contamination by PAHs on nutrients and phytoplankton in Vaca Muerta, Neuquén, Argentina
Environmental Earth Sciences

Dear Dr. Rotondo:

It is my pleasure to accept your manuscript entitled Effects of lake sediment contamination by PAHs on nutrients and phytoplankton in Vaca Muerta, Neuquén, Argentina for publication in Environmental Earth Sciences in its current state.

Please be sure to make all necessary editing on the galley proofs you receive. The online publication of your manuscript will be a permanent, inalterable record. No further revisions can be made after your manuscript is published online except by errata sheet.

After the typesetters enter your corrections, the manuscript will be published online.

On behalf of all the staff of Environmental Earth Sciences, congratulations and thank you for your contribution.

Please keep us in mind for any future work that you consider to be appropriate for our readers.

Thanks again,

James W. LaMoreaux, PhD
Editor-in-Chief
Environmental Earth Sciences

Our flexible approach during the COVID-19 pandemic

If you need more time at any stage of the peer-review process, please do let us know. While our systems will continue to remind you of the original timelines, we aim to be as flexible as possible during the current pandemic.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/enge/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

**Effects of lake sediment contamination by PAHs on nutrients and phytoplankton in
Vaca Muerta, Neuquén, Argentina**

Rotondo, Leandro^{*(1)}; *Temporetti, Pedro*⁽¹⁾; *Mora, Verónica*⁽²⁾; *Baffico, Gustavo*⁽¹⁾; *Beamud, Guadalupe*⁽¹⁾; *Díaz Mónica*⁽¹⁾; *Pedrozo, Fernando*⁽¹⁾.

(1) INIBIOMA, Universidad Nacional del Comahue, CONICET, Quintral 1250, Bariloche (8400),
Argentina.

(2) Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de
Ciencias Exactas-UNLP, CCT-La Plata, CONICET, La Plata 1900, Argentina.

*leandrorotondo@comahue-conicet.gob.ar

Acknowledgments

We wish to thank P. Alvear and R. Sauval for their sampling assistance. We especially want to thank M. Nichela and M. J. Bernas for providing us with accommodation and easy access to the reservoir.

Abstract

Aquatic sediments act as a source for nutrients as well as contaminants, among which there are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) such as phenanthrene (Ph), anthracene (An), pyrene (Py) and benz(a)anthracene (Ba). Phytoplankton can be an indicator of contaminants presence, thus, we decided to study it in Los Barreales reservoir (Neuquén Province, Argentina). Reservoir water and sediments were characterized, and additional samples were collected in order to perform assays. Bioassays were carried out by incubating sediments contaminated with increasing concentrations of PAHs and filtered lake water, with the addition of native phytoplankton; with the addition of *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson (reservoir native alga); and without sediments. The results showed that: A) nutrient concentrations in water decreased for Ph, Py and Ba at concentrations from 500 ppm, B) *S. quadricauda* abundance and chlorophyll *a* decreased with Ph treatments at 250 ppm (on incubation days 2 and 7), Py from 1000 ppm (on incubation day 2) and Ba from 50 ppm (on incubation days 2 and 7), and C) that the effect of the PAHs used on algal growth was direct. Sediments contamination with Ph, Py or Ba modified nutrient concentrations in the water column and affected *S. quadricauda* growth.

Keywords

Bioindicator, Sediments, PAHs, Phytoplankton

Declarations

Funding

Funding for this study was provided by Centro Regional Universitario Bariloche (Universidad Nacional del Comahue) (Funds from Ord 160) and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (Funds from PICT 2018 4387 ANPCYT).

Conflicts of interest/Competing interests (Not applicable)

Ethics approval (Not applicable)

Consent to participate (Not applicable)

Consent for publication (Not applicable)

Availability of data and material (Not applicable)

Code availability (Not applicable)

Authors' contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Leandro Rotondo, Pedro Temporetti, Verónica Mora, Gustavo Baffico and Guadalupe Beamud. The first draft of the manuscript was written by Leandro Rotondo and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Introduction

Petroleum hydrocarbons represent a non-renewable natural resource of great importance as energy source and because of their derivatives (Hall et al. 2003). It is a complex, variable mixture of compounds including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). PAHs are organic compounds formed by simple fused aromatic rings (Fetzer, 2000). They are hydrophobic compounds, slightly soluble in water, with a high bio concentration factor, and their toxic, mutagenic and carcinogenic properties have been demonstrated (IARC 1983). These characteristics are related to their molecular structure, and the risk associated with these compound increases with their molecular weight (Upham et al. 1998). Approximately 130 PAHs have been identified, 16 of which (with 2-6 rings) are characterized as most toxic by EPA (United States Environmental Protection Agency), such as phenanthrene (Ph), anthracene (An), pyrene (Py), and benz(a)anthracene (Ba) (Peluffo 2016).

PAHs tend to accumulate in waterbody sediments due to their affinity for the organic phase, which is much greater than that for water, as reflected in their high organic carbon:water coefficients ($\log K_{oc}$), which vary between 2 and 7 (WHO 1998; Patrolecco et al. 2010; Rabodonirina et al. 2015). This tendency is stronger for those PAHs composed of four or more rings, of high molecular weight (Yunker et. al. 2002; Gaspare et. al. 2009; Net et al. 2015). Due to this accumulation capacity, sediments can act as contaminant sources, even several years after the pollution process has been stopped (Golterman 2004). Thus, sediment study can provide relevant information about contaminated areas, the nature of pollutants, and their concentrations and dispersion patterns, among other aspects. In addition, this compartment plays an important role in lake nutrient cycles. Nutrients are transported to the bottom by sedimentation and, from diverse mechanical, physical, chemical and biological processes, some of them can return to the water column (Forsberg 1989). Håkanson and Jansson (1983) proposed that this re-circulation could be very important when the nutrients involved are essential such as phosphorus (P) and nitrogen (N), a process called "internal load" (Petterson 1998; Boström et al. 1982; Håkanson 2004). This

nutrient recirculation could be modified by PAHs in sediments, either directly, through physical interference (Ujowundu et al. 2011), or indirectly, by changes in lake bottom bacterial activity (Sun et al. 2012), for example.

In this context, having an adequate system or model for assessing waterbody pollution acquires relevance (Håkanson and Jansson 1983). Several physical, chemical and biological parameters can be used to determinate the contamination level of aquatic environments (Schindler et al. 2008). Nevertheless, in some circumstances, these parameters could present strong seasonal fluctuations making waterbody monitoring difficult (Maassen et al. 2005). Chemical characterization of sediments and leachates enables useful data acquisition through standard analytical techniques, but it does not provide information about contaminant toxicity and bioavailability to organisms that inhabit the water column and sediments (Munawar and Munawar 1987). According to Ospina-Alvarez and Pena (2004), a bioindicator is any species or group of species whose function, population, or status can reveal the qualitative status of the environment. In the case of biological indicators, the presence or absence of certain species can provide information on the qualitative status of a waterbody in such a way that, once an aquatic ecosystem is known and characterized, the presence and amount of certain species could directly and accurately indicate specific contaminant concentrations (Ptacnik et al. 2008).

In this sense, important attention was paid to the effects that contaminants in the water column and sediments have on phytoplankton communities, which proved to be useful as a sensitive indicator of contamination stress. This indicator is easy to acquire and maintain and can be studied in a relatively short period since phytoplankton species have short generation times (Munawar and Munawar 1987). Microcosm bioassays are the techniques most commonly used to assess the potential toxicity of PAH on aquatic systems and phytoplankton communities (Aksmann and Tukaj 2004; Richardson et al. 2001; Sibley et al. 2001; Ren et al. 2009; Ramadass et al. 2016). Quantitative variation in phytoplankton communities is the first response to aquatic environmental changes (Ospina-Alvarez and Pena, 2004). Besides quantitative alterations, qualitative modifications in phytoplankton communities can also be observed: new species can

colonize the environment while some of the original species can decline and occasionally become extinct (Ptacnik 2008).

The use of algae as an indicator species for PAH contamination is well documented worldwide. In the case of the marine environment, there are studies such as those by Okay et al. (2002), which measured toxicity levels of Py on marine algae; by Echeveste et al. (2010), which dealt with PAH toxic effect on a culture of marine algae; and by Aksmann and Tukaj (2004), which evaluated Ph and An toxicity to *Scenedesmus armatus* species. Among freshwater studies are those by Froehner et al. (2012), which used natural biofilms as indicators of PAH presence, and those by Ramadass et al. (2016), which evaluated the sensitivity of *Chlorella* sp. to mineral oil soluble fractions.

In Argentina, most of the studies on the impact of petroleum spills on aquatic environments have been carried out mainly on coastal environments (Arias et al., 2010; Commendatore et al., 2012; Oliva et al., 2016). For example, in the gulfs of San Jorge and Nuevo, Chubut, Commendatore et al. (2015) and Casas et al. (2010) studied PAH presence in sediments and their toxic effect on marine alga *Undaria pinnatifida*. However, studies on freshwater environments are scarce. In northern Patagonia, Lopez Ordieres (2018), Ferrante and Giulliani (2014) and Monza (2013) studied PAH presence in water and sediments in the Neuquén river basin, while other researchers studied PAH presence in soil and their bioremediation (Alvaro et al. 2017). Monza (2013) and Ferrante and Giulliani (2014) found hydrocarbon presence in water and sediments, both in the Neuquén and Limay rivers basins, where aliphatic and aromatic hydrocarbons concentrations between 0.41 and 125 mg kg⁻¹ dry sediment (d.s.) were found. Diaz et al. (2015) studied three natural acidophilic autochthonous species of Lake Caviahue, Neuquén Province, identifying them (*Cyanidium caldarium*, *Keratococcus raphidioides* and *Euglena mutabilis*) as potential bioindicators of Ph contamination. Diaz et al. (2015) was the first study on the effect of PAH presence in soil on autochthonous phytoplankton in Patagonia, and it is the base for the present study, which focusses on PAHs in reservoir contaminated sediments, a PAH source scarcely studied through phytoplankton bioassays, and without precedents in Patagonia. Los Barreales

reservoir is located in the area of the most important Argentinean oil-producing basin, thus it is of high importance to have tools to quickly and accurately assess the impact that hydrocarbons will have on the aquatic environments in this area.

The aims of this research are a) To evaluate phytoplankton response and nutrient availability from contaminated sediments with increasing doses of PAHs and; b) To assess the use of native algae of the waterbody studied as bioindicators of PAH contamination in sediments.

Material and methods

Study area

This study was carried out in Vaca Muerta in the Neuquén basin, one of the five producing oilfields in Argentina. This non-conventional deposit involves four Argentinean provinces: Mendoza, Neuquén, Río Negro and La Pampa. This deposit from the Cretaceous-Jurassic periods is of marine origin and considered the most important in the country because of its reserves and level of exploitation (Cabanillas et al. 2013). Los Barreales reservoir (Fig. 1) belongs to the Neuquén river basin, located at Vaca Muerta, in eastern Neuquén province, Argentina (38°33'03"S; 68°49'21"O), with a maximum altitude of 422 m a.s.l. The climate is semiarid, and predominant vegetation corresponds to phytogeographic province of Monte, mostly medium shrub-steppe (1-2 m tall), with a total plant cover between 20 and 40% (Madariaga 2018). Los Barreales reservoir has an area of 407 km² and an average depth of 69.1 meters.

Sampling

In November 2017 water, sediment and phytoplankton samples were collected at a site established at the center of the reservoir (Fig. 1), where the location was determined by using a GPS. Five water samples were collected at 5 different depths, 2, 6, 10, 18 and 43 m (bottom), by using a Van Dorn bottle (3L) and preserved in accordance with APHA (1995). Sediments were

collected with a corer type UWITEC at 43 m (maximum depth), by triplicate. The top 10 cm of the sediment corer were used for physicochemical characterization and bioassays.

Field measures and laboratory analysis

Water transparency (Secchi Disk (SD)), pH (Thermo Orion 3 Star pH portable) and electrical conductivity (Thermo Orion 3 Star conductivity portable) were measured *in situ*. A sub-sample was left unfiltered for the determination of PAHs and total phosphorus (TP), while the rest was filtered through 0.45 µm pore size cellulose acetate membranes for the analysis of dissolved fractions of phosphorus and inorganic nitrogen. In the laboratory, we analyzed soluble reactive phosphorus (SRP) by molybdate blue and ascorbic acid (Murphy and Riley 1962), total phosphorus (TP) by potassium persulfate oxidation with 1:4 sulfuric acid and afterwards as SRP, nitrate plus nitrite (N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻) by cadmium column reduction and diazoic complex, and ammonium (N-NH₄⁺) by indophenol blue method (APHA 1995). Dissolved inorganic nitrogen (DIN) was calculated as the sum of nitrate, nitrite and ammonium. For the identification and quantification of PAHs, a liquid-liquid extraction was performed (APHA 1995) by mixing 50 mL of water in a polycarbonate tube with 3 mL of solvent (1:1, hexane: acetone). The hydrocarbons were extracted in an ultrasonic bath (Testlab Ultrasonic TB10TA) at 40 kHz, 400 W for 60 minutes (Luque-García and Luque de Castro, 2003). The mixture was centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes (Presvac model DCS-16RV) and the organic phase was filtered through nylon filter (0.45 µm pore size). Then, 2 µL were injected into a PerkinElmer Clarus 500 gas chromatograph equipped with an Agilent HP 5 column (30 m x 0.25 mm i.d. with 0.25 µm film thickness) and a flame ionization detector (GC-FID) (Morelli et al., 2005). Each hydrocarbon concentration was determined by comparison with the EPA's 16 priority pollutant PAH standard (AccuStandard®).

Sediments were dried at 60 °C. A fraction of each sample replicate (between 180 and 250 g) was used for granulometry analysis, which was carried out by using a set of sieves (Newark®, ASTM USA Standard Series Sieves): 2 mm (No. 10), 1 mm (No. 18) and 0.25 mm (No. 60). The fraction retained on each sieve was weighed and the percentage of the following fractions was calculated:

coarse sand (>2 mm), medium sand (2-1 mm), fine sand (1-0.25 mm) and very fine sand (0.25-0.05 mm). For the fraction remaining after sieving, Silt (0.05-0.002 mm) and Clay (<0.002 mm) fractions were determined by the densimeter method (Forsythe 1985). Another fraction of each dry sediment sample was homogenized in ceramic mortar and sieved through a 500 µm sieve (Newark®, ASTM No. 36 USA Standard Series Sieves) to remove less reactive fractions. The remaining fractions were further analyzed: TP was determined in sediment digested at 440 °C with concentrated H₂SO₄ and H₂O₂ 30% (Carter 1993) by using a Hach Digesdahl® Digestion Apparatus followed by SRP determination (Murphy and Riley 1962). Total nitrogen (TN) and total carbon (TC) were analyzed by automatic analyzer Thermo Flash 1112. The elemental composition (Si, Al, Fe, S, Ca, Mg, Na, K and Ti) of the bulk sample was performed by SEM-EDS (Philips 515-EDAX Genesis 2000) microanalysis: EDS was performed with an Octane Pro Silicon Drift Detector (EDAX, Mahawah, NJ, USA) at 30 kV, spot size of 7 nm, and at a working distance of 10 mm. Quantitative chemical analysis was performed by TEAM® EDS System. For the identification and quantification of PAHs, a 1 g subsample of each sediment sample was mixed in a polycarbonate tube with 3 mL of solvent (1:1, hexane: acetone), respectively (Banjoo and Nelson, 2005). The hydrocarbons were extracted in an ultrasonic bath (Testlab® Ultrasonic TB10TA) at 40 kHz, 400 W for 60 minutes (Luque-García and Luque de Castro, 2003). The mixture was centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes (Presvac® model DCS-16RV) and the solution was filtered through a nylon filter (0.45 µm pore size). CG-FID analysis was performed as mentioned for water samples.

In order to characterize the phytoplankton community, water samples from depths of 2, 6, 10, 18 and 43 m (bottom) were collected. Samples were fixed with Lugol-acetic solution and counted under an inverted microscope by using Utermöhl technique (Wetzel and Likens 1991). Species were identified by using specific bibliography for each algal group.

Bioassays

Four different bioassays were carried out: 1) to evaluate the effect of sediment contamination on nutrient availability in solution; 2) to evaluate the effect of sediment contamination on phytoplankton, which could show the presence of an indicator species that could be used in the following bioassay; 3) to evaluate the response of an algal species as a potential indicator of sediment contamination and 4) to evaluate the response of an algal species to water contamination. Sediments used to carry out the bioassays were a fraction of those previously dried at 60 °C, homogenized in ceramic mortar and sieved through a 500 µm sieve (Newark®, ASTM No. 36 USA Standard Series Sieves).

1) Evaluation of nutrient response to PAH contamination in reservoir sediments

In order to evaluate variations in nutrient release from sediments as a result of PAH contamination, sediment samples artificially contaminated with four different PAHs were incubated with reservoir water. PAH concentrations varied from non-contaminated (Wilcke 2000) to contaminated sediments (Diaz et al. 2015). The PAH concentrations obtained from reservoir sediment analysis were used as basal values, and concentrations after contamination were: 0 (basal), 50, 100, 250, 500 and 1000 ppm d.s. of Ph (Sigma® 97%), An (Merck® 96 %), Py (Sigma® 95%) or Ba (Aldrich® 99%). PAHs were incorporated to sediments by using acetone in accordance with Kulik et al. (2006). Contaminated sediments (3 g) were incubated in glass flasks, by triplicate, with 150 mL of filtered (0.45 µm) reservoir water, at 25°C for 48 hours. After this time, nutrient availability according to dose of PAHs used was evaluated by determination of ammonium (N-NH_4^+) and soluble reactive phosphorus (SRP) concentrations (APHA 1995).

2) Evaluation of native phytoplankton response to Ph contamination of reservoir sediments

Among the PAHs used in this study, Ph was selected for bioassay 2 because, as it is found in high concentrations in PAH contaminated environmental samples, it has been widely used as a model compound for studying PAH effects (McConkey et al. 1997; Hannam et al. 2010). Furthermore, it

has been shown to be toxic to aquatic organisms (Zhang et al. 2014; Diaz et al. 2015; Chen et al. 2018).

2.1 Obtaining the native algal inoculum

Native phytoplankton samples were obtained by using 10 and 50 µm Hydro-Bios® plankton nets, and then these samples were incubated in Hill (1970) culture medium, with 12-hour (~ 50 µmol photon m⁻² s⁻¹) photoperiod in a Neoline® incubation chamber at 25°C of average temperature, for a period of two months. Species relative abundances were analyzed for initial and final cultures, by taking a sample, fixing it with Lugol-acetic solution, and counting under an inverted microscope by using Utermöhl technique (Wetzel and Likens 1991).

2.2 Conducting the Bioassay

The bioassay consisted in incubating, by triplicate, diluted samples (10⁴ cells.mL⁻¹) of the culture of native phytoplankton with sediments contaminated with increasing final Ph concentrations (0 (basal), 250, 500 and 1000 ppm d.s.), which correspond to concentrations varying from non-contaminated (Wilcke 2000) to contaminated sediments (Diaz et al. 2015). Sediments (0.5 g) were mixed with 20 mL of reservoir water filtered through a 0.45 µm pore size membrane filter and left to settle for 24 hours, after which 5 mL of algae inoculum was added (final concentration: 10⁵ cells.mL⁻¹). The assay was carried out in 50 mL Nunclon® flasks, with 12 hour (~ 50 µmol photon m⁻² s⁻¹) photoperiod in a Neoline® chamber at 25°C of average temperature. Incubation time was 14 days. On days 0, 7 and 14 an aliquot of each flask was taken to determine algal abundance and chlorophyll **a** concentration. The samples for algal abundance were fixed with Lugol-acetic solution and counted under an inverted microscope by using Utermöhl technique (Wetzel and Likens 1991). The chlorophyll **a** sample was filtered through glass fiber filters (GF/F) extracted with 90% acetone and determined by fluorometry in accordance with APHA (1995).

2.3 Selection of the potential bioindicator species

According to the relative abundance in control treatment and its response to the different PAH treatments, *Scenedesmus quadricauda* was selected as a potential indicator of PAH contamination. The species was isolated by using a serial dilution technique following Hoshaw and Rosowsky (1973) and Andersen (2005). Hill (1970) culture medium was used, and cultures were incubated under the same conditions as mentioned in bioassay 2. Culture monitoring was carried out weekly, by using an inverted microscope, until obtaining a uni-algal culture of *S. quadricauda*.

3) Bioassay with *Scenedesmus quadricauda* and reservoir sediments contaminated with different PAHs

In order to evaluate algal response to increasing doses of PAHs, a bioassay was carried out by using uni-algal cultures of *S. quadricauda* obtained from bioassay 2 and PAH contaminated sediments.

Sediments were contaminated with Ph, An, Py or Ba, and concentrations after contamination were: 0 (basal), 50, 100, 250, 500 and 1000 ppm PAH d.s.), with the same methodology as for bioassay 1. The bioassay consisted of 0.5 g of sediment, 20 mL of reservoir filtered water, left to settle for 24 hours, after which 5 mL algae inoculum was added (final concentration: 10^4 cells.mL⁻¹). Incubation was carried out in 50 mL Nunclon® flasks under the same conditions as in bioassay 2. Incubation time was 7 days. On days 0, 2 and 7 an aliquot of each flask was taken to determine algal abundance and chlorophyll **a** concentration. The samples for algal abundance and chlorophyll **a** were processed like in bioassay 2.

4) Bioassay with *S. quadricauda* and water contaminated with different PAHs

In order to evaluate the toxic effect of PAHs on algae without the influence of their interaction with sediments, a bioassay with *S. quadricauda* culture and PAHs in water solution (without sediments) was carried out. The same amounts of PAHs that represented the concentrations in sediments in

bioassay 3 (0, 50, 100, 250, 500 and 1000 ppm d.s.) were added into 50 mL glass tubes by using acetone and its evaporation to incorporate Ph, An, Py or Ba to the system. The water phase consisted of 20 mL of the same culture medium as that for the isolation of *S. quadricauda* in bioassay 2, and 5 mL of algal inoculum (final concentration: 10^4 cells.mL⁻¹). Incubation was carried out under the same conditions as in bioassay 2. Incubation time was 7 days. On day 7, an aliquot of each flask was taken to determine algal abundance. The samples for abundance were fixed with Lugol-acetic solution and counted under an inverted microscope by using Utermöhl technique.

Statistical analysis

To determine significant differences between treatments in bioassays 1, 3 and 4, we used One-way Analysis of Variance (ANOVA), with a significance level of 5%. Response variables under analysis were SRP and N-NH₄⁺ concentrations (bioassay 1), *S. quadricauda* abundance and chlorophyll **a** (bioassays 3 and 4). Comparisons between pairs were carried out by using Tukey's method *a posteriori* (Montgomery 2004). In the case of bioassay 2, a Randomized Blocks Design ANOVA (significance level of 5%) was used to determine effects between control and treatments to avoid methodological issues (differences in light intensity). Variables under analysis were algal abundance and chlorophyll **a**. Comparisons between control and treatments of all bioassays were carried out by using Dunnett's Test (Montgomery 2004) *a posteriori*. InfoStat statistical software (Di Rienzo et al. 2011) was used for ANOVAs and Tukey's Tests. Lethal concentration 50 on days 2 and 7 (LC50-2d and LC50-7d) was estimated for the algal species that had shown significant treatment effects by using the linear interpolation method (USEPA 2002).

Results

Reservoir water and sediment chemical characterization

The reservoir water has an alkaline pH of 8.1, a conductivity of 265 $\mu\text{S cm}^{-1}$, and a transparency (SD) of 3.3 m. TP concentration was 31.6 $\mu\text{g L}^{-1}$. SRP represented the 16% of TP (5 $\mu\text{g L}^{-1}$), while N-NH_4^+ concentration was 7 $\mu\text{g L}^{-1}$. PAH concentrations were undetectable in water column. Phytoplankton community is represented mainly by Bacillariophyceae (40 %; *Cyclotella stelligera* and *Aulacoseira granulata*), Cryptophyceae (40%; *Plagioselmis lacustris*) and Chlorophyceae (15%; *Scenedesmus quadricauda* and *Monoraphidium* sp). Sediments have a neutral pH (7.0), high concentrations of TP (840 mg kg^{-1} d.s.) and low concentrations of TN (0.1 %) and TC (0.8 %). Sediment texture is dominated by sand (14.72 % coarse sand; 18.85 % medium sand; 26.78 % fine sand; 39.04 % very fine sand) being silt and clays very low (0.01 % and 0.60 %, respectively). The average mineral composition (weight percent oxide composition of each element) is: SiO_2 (55.4%) > Al_2O_3 (18.4%) > Fe_2O_3 (8.9%) > CaO (5.3%) > K_2O (3.2%) > MgO (2.9%) > Na_2O (2.8%) > Ti_2O (1.2%) > F_2O (1.2%) > P_2O_5 (0.4%) > SO_3 (0.3%). Concentrations of PAHs in sediments are: An = (0.4 \pm 0.3) ppm d.s.; Py = (0.4 \pm 0.5) ppm d.s.; Ph = (4.5 \pm 1.6) ppm d.s. and Ba = (25.7 \pm 5.1) ppm d.s.

1) Evaluation of nutrient response to PAH contamination in reservoir sediments

SRP and N-NH_4^+ concentrations in the water phase from the different treatments are shown in Fig. 2. An treatments did not show significant effects on SRP concentration, compared to control treatment (0), while SRP release to water column showed a significant decrease at 1000 ppm d.s. of Py, 1000 ppm of Ph, and 50 and 500 ppm d.s. of Ba ($p < 0.05$). N-NH_4^+ release in An treatments did not show significant effects. However, in the other PAH treatments, N-NH_4^+ release showed a significant decrease at 500 ppm d.s. of Py, 250 and 1000 ppm d.s. of Ph, and 50, 250 and 1000 ppm d.s. of Ba ($p < 0.05$).

2) Evaluation of native phytoplankton response to Ph contamination of reservoir sediments.

Algal abundances obtained from bioassay 2 are shown in Fig. 3. Significant differences ($p < 0.05$) were observed at 500 and 1000 ppm compared to the control treatment (0 ppm), after 7 days of

incubation. However, after 14 days, there were no significant differences ($p < 0.05$). Fig. 3 also shows chlorophyll *a* concentrations, which showed the same tendency as cell abundance, with significant differences on incubation day 7 ($p < 0.05$), after the Randomized Blocks Design ANOVA.

The initial culture of native phytoplankton used for bioassays was made almost entirely of Chlorophyceae species: *S. quadricauda* (49.0%), *Monoraphidium* sp. (22.9%), *Chlorella* sp. (6.6%) and *Selenastrum* sp. (1.4%), as well as Cyanophyceae (*Oscillatoria* sp., 17.0%) and Bacillariophyceae (*Nitzschia* sp., 3.0%). *S. quadricauda* abundance on days 0, 7 and 14 of the different Ph treatments are shown in Fig. 4. Treatments at 500 and 1000 ppm showed significant differences ($p < 0.05$) compared to control on incubation day 7, the same happened with total algal abundance values. From *S. quadricauda* abundance values, LC50-7d was estimated, resulting in 257.9 ppm of Ph.

3) Bioassays with *S. quadricauda* and reservoir sediments contaminated with different PAHs

Cell abundance values obtained from the treatments with increasing concentrations of different PAHs are shown in Fig. 5. There were no significant differences in any of the An treatments ($p < 0.05$). However, significant differences were observed ($p < 0.05$) in treatments with Py on days 2 and 7 (1000 ppm d.s.), with Ph on day 2 (up to 500 ppm d.s.) and on day 7 (up to 250 ppm d.s.), and with Ba on days 2 and 7 (all concentrations). A similar response was observed for chlorophyll *a* concentration (Fig. 6). An showed a significant decrease only on day 2 at 1000 ppm d.s.. In Py treatments, chlorophyll *a* decrease was significant on day 2 at 500 and 1000 ppm d.s. and on day 7 at 50 and 1000 ppm d.s.; in Ph treatments, on day 7 at 50, 500 and 1000 ppm d.s., and Ba treatments had a significant negative effect on all concentrations (Fig. 6, $p < 0.05$). LC50-2 and LC50-7 were estimated for PAH treatments with significant differences in algal abundance of at least 50 % compared to control (0) values, resulting for Ph 364.7 and 262.6 ppm, and for Ba 0.35 and 0.35 ppm, respectively.

4) Bioassay with *S. quadricauda* and water contaminated with different PAHs without sediments

In this bioassay a significant ($p < 0.05$) decrease in *S. quadricauda* abundance, to approximately half of that in the control, was observed for all treatments, this is, for the four PAHs used, and for all the concentrations used (Fig. 7).

Discussion

Water physical and chemical composition is characteristic of the tributary Neuquén river, which has medium conductivity values compared to the rest of Patagonian water environments (Diaz et al. 2007), resulting from basin lithology, with high gypsum and calcareous concentrations (Leanza et al. 2001; Zanettini et al. 2001). Due to SD and TP values the reservoir is classified as a mesotrophic environment, considering TP as the classification parameter (Wetzel 2001). The reservoir shows N deficiency ($DIN/SRP = 2$) like several of Patagonian aquatic environments (Diaz et al. 2007). The phytoplankton community is represented mainly by algae belonging to Bacillariophyceae, Cryptophyceae and Chlorophyceae; this last group includes *S. quadricauda*, which was the species selected for bioassays 3 and 4. Sediment composition and texture correspond to the soil properties of the area, which are alluvial aridisols, with variable texture between sandy and franc-silty, and low organic matter content (Duarte 2013). Sediments have low PAH concentrations compared to those used in the bioassays. However, these concentrations exceed about 20 times the Threshold Effect Concentrations consensus of the Sediment Quality Guidelines proposed by US EPA (Swartz 1999).

PAH contamination, with three of the four compounds used in this work, showed effects on nutrient bioavailability in solution (SRP and/or $N-NH_4^+$). SRP and $N-NH_4^+$ concentrations decreased significantly at the highest Py, Ph and Ba concentrations. This could be due to a decrease in bacterial metabolism in sediments, as a result of a reduced microbial population caused by PAH toxic effect (Sun et al. 2012). In this sense, a reduction in bacterial community would lead to lower rates of phosphorus solubilization (Boström et al. 1998) and ammonification (Jones et al. 1982). If we consider, for example, ammonification ratio calculated by Rysgaard et al. (1996) for lake sediments, we could make a rough estimation for this bioassay of $15 \mu g \cdot d^{-1} N-NH_4^+$

for a natural microbial population, which is a significant amount for N-NH_4^+ aqueous concentrations.

When the Ph effect on native phytoplankton was evaluated, a negative effect was observed on algae, mainly reflected in *S. quadricauda* abundance, decaying around 60 %. This species represented the highest percentage of the native phytoplankton culture used and it has already been demonstrated that several species of this genus are sensitive to PAH contamination (Zachleder and Tukaj 1993; Aksmann and Tukaj 2004). *Scenedesmus quadricauda* showed the same response to Ph contamination both when this alga was part of the native phytoplankton culture (bioassay 2) and when isolated (bioassay 3), with the same LC50-7d value in both cases, in average. Likewise, Ba contamination had a more accentuated negative effect on algae abundance and chlorophyll *a*, taking these parameters to almost null levels, even with the lowest concentration used (50 ppm). In this sense, Ba effect was clearly noticeable after incubation day 2, at all concentrations assessed, showing that Ba toxicity kinetics is faster than that of the other PAHs tested. Py had a lower depletory effect than Ba and Ph, observable in the higher concentrations (1000 ppm d.s.), while An treatments did not show effects on *S. quadricauda*. These results are consistent with those obtained by other authors (Bastian and Toetz 1982; Nagpal 1993; WHO 2004), who hold that Ba is one of the most toxic PAHs for algae. Toxicity levels found in the literature on Ph, An and Py vary widely, depending on bioassay conditions and species used (Milleman et al. 1984; Gala & Giesy 1994; Okay 2002; Aksmann and Tukaj 2004; Echeveste et al. 2010). Differences between the PAHs used can be explained by the structural differences in their molecules, both for the aromatic ring number and for their structural complexity. Toxicity not only increases with ring number (Millemann et al. 1984; Nagpal 1993; WHO 2004; Engraff et al. 2011; Seiler et al. 2014), those with four rings (Ba and Py) are more toxic than those with three (Ph and An), but also, with less linear structures with “bay regions” (Ba and Ph) (Boström et al. 2002).

Due to the fact that contamination showed negative effects on algae, and these effects were related to the PAHs which also modified nutrients availability in solution, a bioassay (Number 4)

was performed without sediments, to avoid any possible effect of sediment nutrient availability on algae growth. Results showed that the deleterious effects on algae in bioassays 2 and 3 are more likely related to the direct toxic effect of PAHs than to an indirect effect through variations in water nutrients, as supported by previous research (Del Vento and Dachs 2002; Aksmann and Tukaj 2004). In bioassay 4 the effects of PAH contamination on algal abundance were observed for all PAHs and at lower concentrations than those that showed effects in the bioassay with sediments. This is due to the absence of PAH adsorption on sediments, which reduces PAH bioavailability. This reduction when sediments are present is widely documented (Adams et al. 1985; Swartz et al. 1989), and could be also explained by a calculation of partition index between sediments and algae (Online resource 1), estimated from PAH physicochemical parameters as octanol:water partition coefficient (K_{ow}), solubility (S) and K_{oc} (Table 1). This index was similar for all PAHs used and showed that approximately 50 % of PAH total amount were associated with the sediment phase. On the other hand, Smedes et al. (2013) found there is a fraction of the total PAHs in sediments (at least 50 %) that is “inaccessible” and it is not available for release. So PAH concentrations in algae in bioassay 3 are likely to be even lower. This contrasts with the higher decay effect of all PAHs on *S. quadricauda* in bioassay 4, where PAH distribution strongly shifted to algal surface, due to their very slow water solubility (Table 1). In bioassay 3, when PAH bioavailability is lower, dissimilar decay effects seem to depend mainly on PAH toxicity, while in bioassay 4, with higher PAH bioavailability, the four PAHs used showed the same deleterious effect on algae.

Table 1: Physicochemical parameters of the PAHs used in this work (Anthracene (An), Pyrene (Py), Phenanthrene (Ph) and Benz(a)anthracene (Ba)).

PAH	log K_{ow}^a	S (mg.L⁻¹)^(a)	log K_{oc}^(b)
An	4.54	0.045	4.33
Py	5.18	0.132	4.97
Ph	4.57	1.100	4.36
Ba	5.91	0.011	5.70

^(a)Mackay et al, (1998).

^(b)Karickhoff et al (1979).

Conclusions

Contamination by PAHs in Los Barreales reservoir sediments at the concentrations used in these bioassays modifies nutrient release to the water column and it also affects the growth of the dominant phytoplankton species *Scenedesmus quadricauda* at concentrations of at least 50 ppm of Ba, 250 ppm of Ph and 1000 ppm of Py. These results indicate that bioassays with autochthonous algae species of the reservoir are useful to detect the effect of PAH contamination on sediments, and constitute the first approach to create a fast monitoring tool to assess the effect of oil spills on the Vaca Muerta geologic formation area.

Bibliography

Adams WJ, Kimerle RA, Mosher RG (1985). Aquatic safety assessment of chemicals sorbed to sediments. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium*. ASTM International. 429-453. <https://doi.org/10.1520/STP36282S>

Alvaro CES, Arocena LA, Martínez MÁ, Nudelman NES (2017). Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región Patagonia Norte, Argentina. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(2):247-257. <http://dx.doi.org/10.20937/rica.2017.33.02.06>

Andersen RA (Ed.) (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier, Massachusetts

Arias AH, Vazquez-Botello A, Tombesi N, Ponce-Vélez G, Freije H, Marcovecchio J (2010). Presence, distribution, and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160(1-4):301. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0696-5>

Aksmann A, Tukaj Z (2004). The effect of anthracene and phenanthrene on the growth, photosynthesis, and SOD activity of the green alga *Scenedesmus armatus* depends on the PAR irradiance and CO₂ level. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 47(2):177-184. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-2297-9>

APHA (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington DC

Asaoka, S., & Yamamoto, T. (2010). Characteristics of phosphate adsorption onto granulated coal ash in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 60(8), 1188-1192. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.03.032>

Banjoo, D.R., Nelson, P.K. (2005). Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *J. Chromatogr. A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.01.033>

Bastian MV, Toetz DW (1982). Effect of eight polynuclear hydrocarbons on growth of *Anabaena flos-aquae*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 29(5), 531-538. <https://doi.org/10.1007/BF01669616>

Boström B, Andersen JM, Fleischer S, Jansson M (1988). Exchange of phosphorus across the sediment-water interface. In *Phosphorus in freshwater ecosystems*, 229-244. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3109-1_14

Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, Westerholm R (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the

ambient air. Environmental health perspectives, 110(suppl 3):451-488.
<https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241197>

Cabanillas L, Carstens G, Lovecchio JP, Marshall P, Rebori L, Soldo JC, Vergani G (2013). Hidrocarburos Convencionales y no convencionales. Asociación Argentina de geólogos y geofísicos del petróleo, 41-47.

Casas G, Gil MN, Commendatore MG, Torres AI, Marinho C, Sturla J (2010). Evaluación de la composición químico-nutricional y del nivel de metales pesados e hidrocarburos en *Undaria pinnatifida* de los golfos san José y nuevo, Chubut. Dirección General de Promoción Científica y Técnica de la Provincia de Chubut, Puerto Madryn, Argentina.

Carter M (1993). Soil Sampling and Methods of Analysis. Canadian Society of Soil Science. Lewis Pub., Florida

Chen H, Zhang Z, Tian F, Zhang L, Li Y, Cai W, Jia X (2018). The effect of pH on the acute toxicity of phenanthrene in a marine microalgae *Chlorella salina*. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35686-9>

Commendatore MG, Nievas ML, Amin O, Esteves JL (2012). Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). *Marine environmental research*, 74:20-31.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.11.010>

Commendatore MG, Franco MA, Gomes Costa P, Castro IB, Fillmann G, Bigatti G, Nievas ML (2015). Butyltins, polyaromatic hydrocarbons, organochlorine pesticides, and polychlorinated biphenyls in sediments and bivalve mollusks in a mid latitude environment from the Patagonian coastal zone. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(12):2750-2763.
<https://doi.org/10.1002/etc.3134>

Del Vento S, Dachs J (2002). Prediction of uptake dynamics of persistent organic pollutants by bacteria and phytoplankton. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(10):2099-2107. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211013>

Diaz M, Pedrozo F, Reynolds C, Temporetti P (2007). Chemical composition and the nitrogen-regulated trophic state of Patagonian lakes. *Limnologia-Ecology and Management of Inland Waters*, 37(1):17-27. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.08.006>

Diaz M, Mora V, Pedrozo F, Nichela D, Baffico G (2015). Evaluation of native acidophilic algae species as potential indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) soil contamination. *Journal of applied phycology*, 27(1):321-325. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0334-2>

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW (2011) InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

- Duarte L (2013). Proyecto de Desarrollo Institucional para la Inversión UTF/ARG/017/ARG. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Argentina.
- Echeveste P, Agustí S, Dachs J (2010). Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. *Environmental pollution*, 158(1):299-307. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.006>
- Engraff M, Solere C, Smith K, Mayer P, Dahllöf I (2011). Aquatic toxicity of PAHs al PAH mixtures at saturation to benthic amphipods. *Aquatic toxicology* 102:142-149. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.009>
- Ferrante SB, Giuliani A (2014). Hidrocarburos no convencionales en Vaca Muerta, Neuquén: ¿Recursos estratégicos para el autoabastecimiento energético en la Argentina del siglo XXI? (dossier). *Revista Estado y Políticas Públicas*, 2(3):33-61. <http://hdl.handle.net/10469/8746>
- Fetzer JC (2000). Large (C= 24) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Analysis (Vol. 218). John Wiley & Sons, New York
- Forsberg C (1989). Importance of sediments in understanding nutrient cyclings in lakes. *Hydrobiologia*, 176/177:263-277. <https://doi.org/10.1007/BF00026561>
- Forsythe W (1985). Física de suelos: manual de laboratorio 1º edn. IICA, San José de Costa Rica
- Froehner S, Machado KS, Dombroski LF, Nunes AC, Kishi RT, Bleninger T, Sanes J (2012). Natural biofilms in freshwater ecosystem: indicators of the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(7):3965-3973. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1164-y>
- Gala WR, Giesy J P (1994). Flow cytometric determination of the photoinduced toxicity of anthracene to the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 13(5):831-840. <https://doi.org/10.1002/etc.5620130519>
- Gaspere L, Machiwa JF, Mdachi SJM, Streck G, Brack W (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination of surface sediments and oysters from the inter-tidal areas of Dar es Salaam, Tanzania. *Environmental Pollution*, 157(1):24-34. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.08.002>
- Golterman HL (2004). The Chemistry of Phosphate and Nitrogen Compounds in Sediments. Kluwer Academic Publishers, London
- Håkanson L, Jansson M (1983). "Principles of Lake Sedimentology". Springer-Verlag, Heidelberg
- Håkanson L (2004) Internal loading: A new solution to an old problem in aquatic sciences. *Lakes & Reservoirs Research & Management* 9(1):3-23. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1770.2004.00230.x>
- Hall C, Tharakan P, Hallock J, Cleveland C, Jefferson M (2003). Hydrocarbons and the evolution of human culture. *Nature*, 426(6964):318-322. <https://doi.org/10.1038/nature02130>

- Hannam ML, Bamber SD, Galloway TS, Moody AJ, Jones MB (2010). Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere*, 78(7), 779-784. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.049>
- Hill GJC, Machlis L (1970) Defined media for growth and gamete production by the green alga *Oedogonium cardiacum*. *Plan physiol.*, 46:224-226. <https://doi.org/10.1104/pp.46.2.224>
- Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*, 35(2), 403-424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Hoshaw RW, Rosowski JR, Stein JR (1973). Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge
- IARC (1983). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 32. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. France
- Jones JG, Simon BM, Horsley RW (1982). Microbiological sources of ammonia in freshwater lake sediments. *Microbiology*, 128(12):2823-2831. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-12-2823>
- Kaal J, Brodowski S, Baldock JA, Nierop KG, Cortizas AM (2008). Characterisation of aged black carbon using pyrolysis-GC/MS, thermally assisted hydrolysis and methylation (THM), direct and cross-polarisation ¹³C nuclear magnetic resonance (DP/CP NMR) and the benzenepolycarboxylic acid (BPCA) method. *Organic Geochemistry*, 39(10), 1415-1426. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.06.011>
- Karickhoff SW, Brown DS, Scott TA (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water research*, 13(3), 241-248. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(79\)90201-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(79)90201-X)
- Kulik N, Goi A, Trapido M, Tuhkane T (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *J. Environ. Manag.* 78:382–391. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.05.005>
- Leanza HA, Hugo C, Repol D, González R, Danieli JC, Lizuain A (2001). Hoja Geológica 3969-I, Zapala. Provincia del Neuquén. Servicio Geológico Minero Argentino. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Boletín 275, 134 p. Buenos Aires. <http://repositorio.segemar.gob.ar/handle/308849217/198>
- López Ordieres MC (2018). Determinación de la calidad química del agua de la baja cuenca del río Neuquén asociadas a las actividades hidrocarburífera y agrícola. Dissertation, Universidad Nacional del Comahue

- Luque-García J, Luque de Castro M (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 22, 41–47. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00102-X)
- Maassen S, Uhlmann D, Roske I (2005). Sediment and pore water composition as a basis for the trophic evaluation of standing waters. *Hydrobiologia* 543:55–70. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-5946-0>
- Mackay D, Callcott D (1998). Partitioning and physical chemical properties of PAHs. In *PAHs and Related Compounds* (pp. 325-345). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49697-7_8
- McConkey, B. J., Duxbury, C. L., Dixon, D. G., & Greenberg, B. M. (1997). Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: Effects of phenanthrene and its primary photoproduct, phenanthrenequinone. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(5), 892-899. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160508>
- Madariaga MC (2018). Diagnóstico para el desarrollo de Cordillera y Precordillera de las provincias de Río Negro y Neuquén. Comunicación técnica N° 241. Ediciones INTA, Bariloche
- Millemann RE, Birge WJ, Black JA, Cushman RM, Daniels KL, Franco PJ, Stewart AJ (1984). Comparative acute toxicity to aquatic organisms of components of coal-derived synthetic fuels. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113(1):74-85. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1984\)113%3C74:CATTAO%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1984)113%3C74:CATTAO%3E2.0.CO;2)
- Monza LB, Loewy RM, Savini MC, Pechen de d'Angelo AM (2013). Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments from the Neuquén River, Argentine Patagonia. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(4):370-379. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.728097>
- Montgomery D (2004): Diseño y análisis de experimentos. Universidad Estatal de Arizona. 2^{da} Edn. Limusa Wiley, México.
- Morelli IS, Del Panno MT, De Antoni GL, Paineira MT (2005). Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. *International biodeterioration & biodegradation*, 55(4), 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.03.001>
- Munawar M, Munawar IF (1987) Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of *in situ* sediment contaminants. *Ecological Effects of In Situ Sediment Contaminants. Developments in Hydrobiology*, vol 39. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4053-6_10
- Murphy J, Riley JP (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim Acta* 27:31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)

Nagpal NK (1993). Ambient water quality criteria for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Ministry of Environment, Lands and Parks Province of British Columbia, Victoria

Net S, El-Osmani R, Prygiel E, Rabodonirina S, Dumoulin D, Ouddane B (2015). Overview of persistent organic pollution (PAHs, Me-PAHs and PCBs) in freshwater sediments from Northern France. *Journal of Geochemical Exploration*, 148:181-188. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2014.09.008>

Okay OS, Tüfekçi V, Donkin P (2002). Acute and chronic toxicity of pyrene to the unicellular marine alga *Phaeodactylum tricornutum*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 68(4):600-605. <https://doi.org/10.1007/s001280296>

Oliva AL (2016). Acumulación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en sedimentos y mejillines (*Brachidontes rodriguezii*) del estuario de Bahía Blanca. Dissertation, Universidad Nacional del Sur

Ospina-Alvarez N, Pena, EJ (2004). Alternativas de monitoreo de calidad de aguas: algas como bioindicadores. *Ata Nova*, 2(4):513-517

Patrolecco L, Ademollo N, Capri S, Pagnotta R, Polesello S (2010). Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). *Chemosphere*, 81(11):1386-1392. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.027>

Peluffo M (2016) Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante oxidación química. Dissertation, Universidad Nacional de La Plata

Pettersson K (1998) Mechanisms for internal loading of phosphorus in lakes. *Hydrobiologia*. 373(0):21–25. <https://doi.org/10.1023/A:1017011420035>

Ptacnik R, Lepistö L, Willén E, Brettum P, Andersen T, Rekolainen S, Carvalho L (2008). Quantitative responses of lake phytoplankton to eutrophication in Northern Europe. *Aquatic Ecology*, 42(2):227-236. <https://doi.org/10.1007/s10452-008-9181-z>

Rabodonirina S, Net S, Ouddane B, Merhaby D, Dumoulin D, Popescu T, Ravelonandro P (2015). Distribution of persistent organic pollutants (PAHs, Me-PAHs, PCBs) in dissolved, particulate and sedimentary phases in freshwater systems. *Environmental pollution*, 206:38-48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.06.023>

Ramadass K, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R (2016). Sensitivity and antioxidant response of *Chlorella* sp. MM3 to used engine oil and its water accommodated fraction. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97(1):71-77. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1817-4>

- Ren L, Rabalais NN, Turner RE, Morrison W, Mendenhall W (2009). Nutrient limitation on phytoplankton growth in the upper Barataria Basin, Louisiana: microcosm bioassays. *Estuaries and Coasts*, 32(5):958-974. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9174-8>
- Richardson TL, Pinckney JL, Paerl HW (2001). Responses of estuarine phytoplankton communities to nitrogen form and mixing using microcosm bioassays. *Estuaries*, 24(6):828-839. <https://doi.org/10.2307/1353174>
- Rysgaard, S., Risgaard-Petersen, N., & Sloth, N. P. (1996). Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. In *Coastal Lagoon Eutrophication and ANaerobic Processes (CLE AN.)* (pp. 133-141). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1744-6_11
- Schindler D, Hecky RE, Findlay DL, Stainton MP, Parker BR, Paterson MJ, Beaty KG, Lyng M, Kasian EM (2008). Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole ecosystem experiment. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105:11254–11258. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805108105>
- Swartz RC, Kemp PF, Schults DW, Ditsworth GR, Ozretich RJ (1989). Acute toxicity of sediment from Eagle Harbor, Washington, to the infaunal amphipod *Rhepoxynius abronius*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 8(3):215-222. <https://doi.org/10.1002/etc.5620080304>
- Swartz RC (1999). Consensus sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(4), 780-787. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180426>
- Seiler T-B, Best N, Fernqvist MM, Hercht H, Smith K, Braunbeck T, Mayer P, Hollert H (2014). PAH toxicity at aqueous solubility in the fish embryo test with *Danio rerio* using passive dosing. *Chemosphere* 112:77-84. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.064>
- Sibley PK, Harris ML, Bestari KT, Steele TA, Robinson RD, Gensemer RW, Solomon KR (2004). Response of zooplankton and phytoplankton communities to creosote-impregnated Douglas fir pilings in freshwater microcosms. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 47(1):56-66. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-3129-7>
- Smedes F, Van Vliet LA, Booij K (2013). Multi-ratio equilibrium passive sampling method to estimate accessible and pore water concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in sediment. *Environmental science & technology*, 47(1), 510-517. <https://doi.org/10.1021/es3040945>

- Sun FL, Wang YS, Sun CC, Peng YL, Deng C (2012). Effects of three different PAHs on nitrogen-fixing bacterial diversity in mangrove sediment. *Ecotoxicology*, 21(6):1651-1660. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0946-8>
- Trazzi PA, Leahy JJ, Hayes MH, Kwapinski W (2016). Adsorption and desorption of phosphate on biochars. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.11.005>
- Ujowundu CO, Kalu FN, Nwaoguikpe RN, Kalu OI, Ihejirika CE, Nwosunjoku EC, Okechukwu RI (2011). Biochemical and physical characterization of diesel petroleum contaminated soil in southeastern Nigeria. *Research Journal of Chemical Sciences*. 1(8):57-62.
- USEPA (2002). Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organism. 4th ed. EPA-821-R-02-013, Washington DC
- Upham BL, Weis LM, Trosko JE (1998). Modulated gap junctional intercellular communication as a biomarker of PAH epigenetic toxicity: structure-function relationship. *Environ Health Perspect* 106:975–981. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106s4975>
- Wetzel RG (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. Gulf professional publishing, Houston
- Wetzel RG, Likens GE (1991). Springer-Verlag. New York
- WHO (2004). *Guidelines for drinking-water quality (Vol. 1)*. World Health Organization, Geneva
- Wilcke W (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil—a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163 (3):229– 248. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200006\)163:3%3C229::AID-JPLN229%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200006)163:3%3C229::AID-JPLN229%3E3.0.CO;2-6)
- Yao Y, Gao B, Inyang M, Zimmerman AR, Cao X, Pullammanappallil P, Yang L (2011). Biochar derived from anaerobically digested sugar beet tailings: characterization and phosphate removal potential. *Bioresour technol*, 102(10), 6273-6278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.006>
- Yunker MB, Macdonald RW, Vingarzan R, Mitchell RH, Goyette D, Sylvestre S (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic geochemistry*, 33(4):489-515. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(02\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(02)00002-5)
- Zachleder V, Tukaj Z (1993). Effect of fuel oil and dispersant on cell cycle and macromolecular synthesis in the chlorococcal alga *Scenedesmus armatus*. *Marine Biology*, 117(2):347-353. <https://doi.org/10.1007/BF00345680>

Zanettini JCM, Santamaría GR, Leanza H (2001). Hoja Geológica 3772-II, Las Ovejas. Provincia del Neuquén. Servicio Geológico Minero Argentino. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Boletín 263, 67p. Buenos Aires. <https://repositorio.segemar.gov.ar/handle/308849217/151>

Zhang X, Xia X, Dong J, Bao Y, Li H (2014). Enhancement of toxic effects of phenanthrene to *Daphnia magna* due to the presence of suspended sediment. *Chemosphere*, 104, 162-169.

Figure Legends

Fig. 1 Sample site at Los Barreales reservoir and its geographic location

Fig. 2 Water nutrient (SRP and N-NH_4^+) concentrations after incubation day 2 with anthracene (An), pyrene (Py), phenanthrene (Ph) or benz(a)anthracene (Ba) contaminated sediments, at different concentrations (0 (basal) - 1000 ppm d.s.). (*) Significant differences with control.

Fig. 3 Total algal abundance and chlorophyll **a** concentrations in water column of bioassays with a culture of Los Barreales reservoir phytoplankton and phenanthrene contaminated sediments, at different concentrations (0 (basal) - 1000 ppm d.s.), after 0, 7 and 14 days of incubation. (*) Significant differences with control

Fig. 4 *Scenedesmus quadricauda* abundance in bioassays with uni-algal cultures and phenanthrene contaminated sediments, at different concentrations (0 (basal) - 1000 ppm d.s.), after incubation days 7 and 14. (*) Significant differences with control

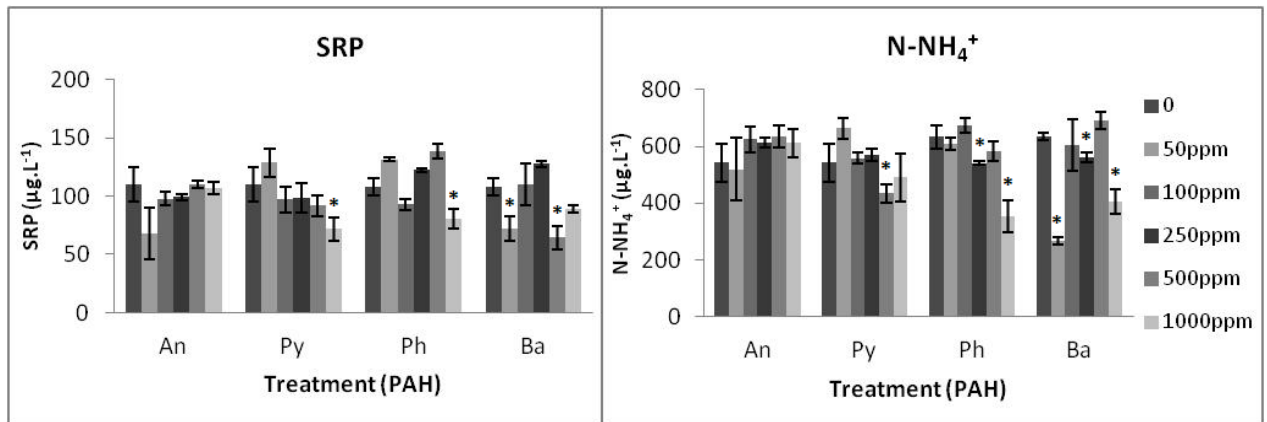
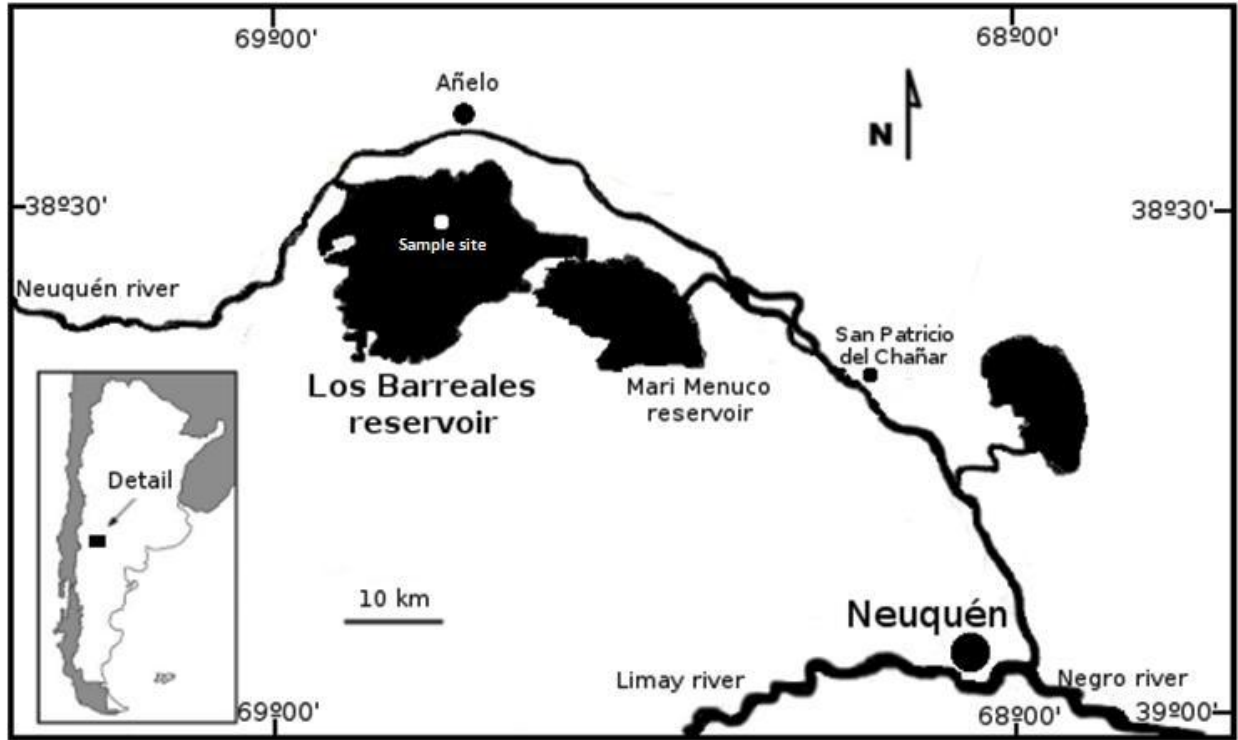
Fig. 5 *Scenedesmus quadricauda* abundance in bioassays with uni-algal cultures and anthracene, pyrene, phenanthrene or benz(a)anthracene contaminated sediments, at different concentrations (0 (basal) - 1000 ppm d.s.), after 2 and 7 days of incubation. (*) Significant differences with control

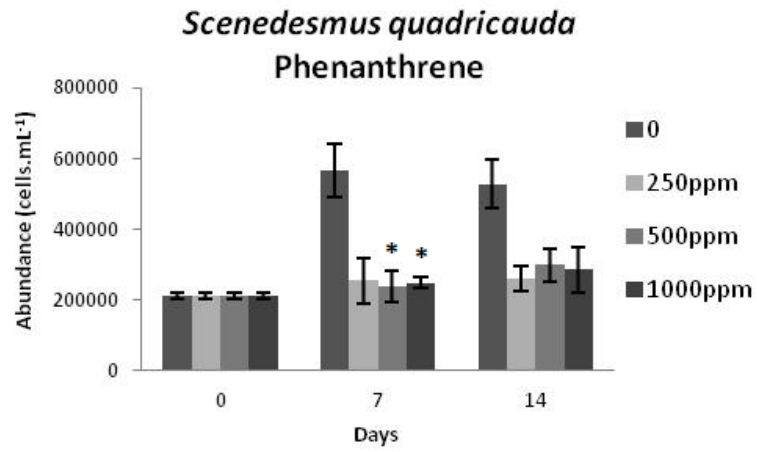
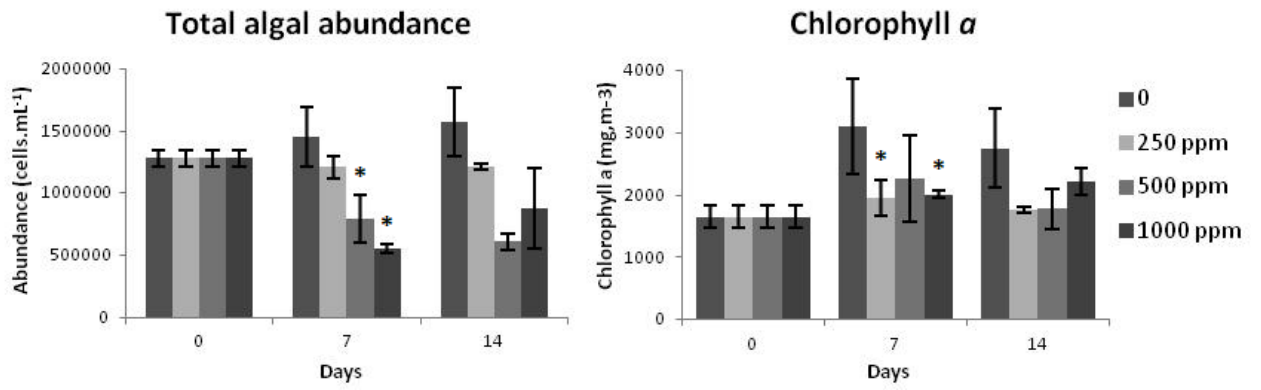
Fig. 6 Chlorophyll **a** concentration in bioassays with *Scenedesmus quadricauda* uni-algal cultures and anthracene, pyrene, phenanthrene or benz(a)anthracene contaminated sediments, at different concentrations (0 (basal) - 1000 ppm d.s.), after 2 and 7 days of incubation. (*) Significant differences with control

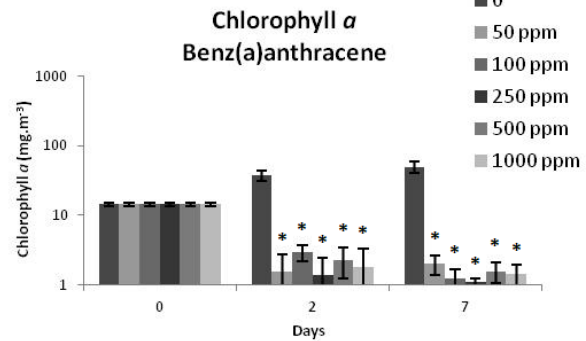
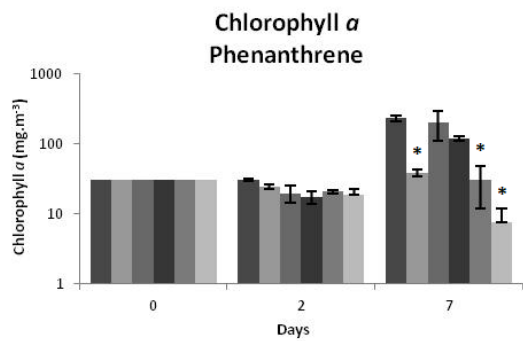
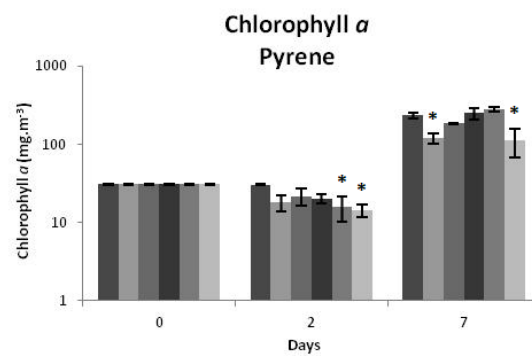
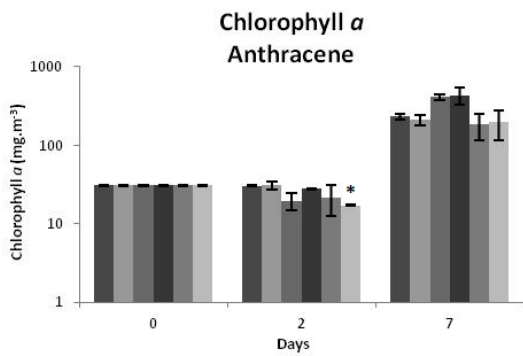
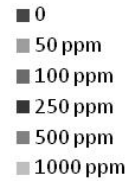
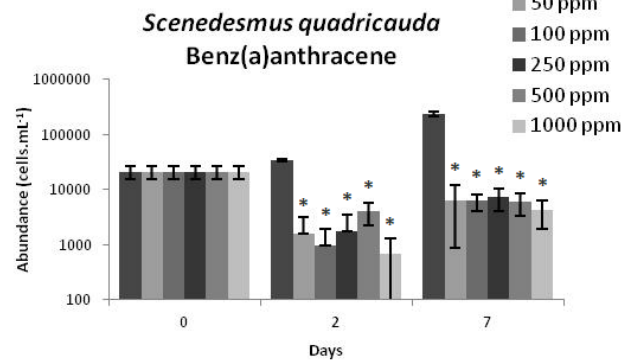
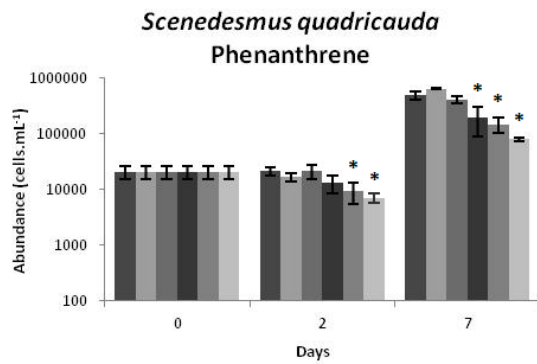
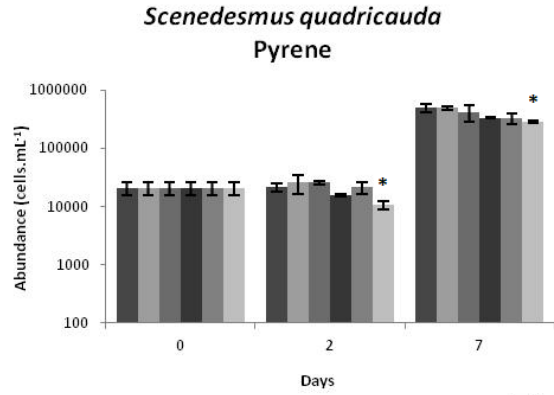
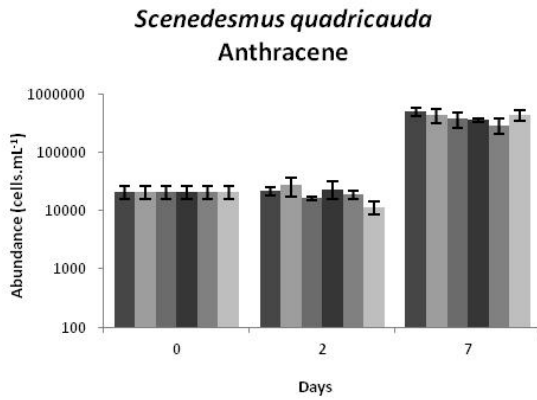
Fig. 7 *Scenedesmus quadricauda* abundance in bioassays with anthracene (An), pyrene (Py), phenanthrene (Ph) or benz(a)anthracene (Ba) added to uni-algal cultures, without sediments, at

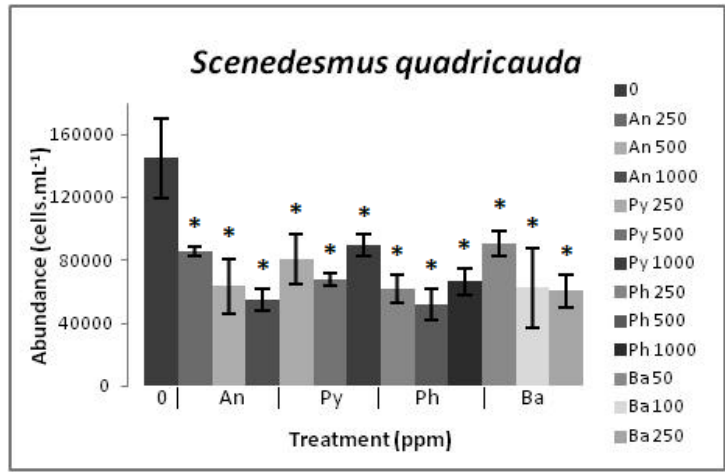
different concentrations (named 0 - 1000 ppm d.s. as if sediments were present). (*) Significant differences with control

Figures were made by using Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Office Picture Manager and Gimp Image Editor.









**Effects of lake sediment contamination by PAHs on nutrients and phytoplankton in Vaca
Muerta, Neuquén, Argentina**

Rotondo, Leandro^{*(1)}; *Temporetti, Pedro*⁽¹⁾; *Mora, Verónica*⁽²⁾; *Baffico, Gustavo*⁽¹⁾; *Beamud, Guadalupe*⁽¹⁾;
Diaz Mónica⁽¹⁾; *Pedrozo, Fernando*⁽¹⁾.

(1) INIBIOMA, Universidad Nacional del Comahue, CONICET, Quintral 1250, Bariloche (8400),
Argentina.

(2) Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias
Exactas-UNLP, CCT-La Plata, CONICET, La Plata 1900, Argentina.

*leandrorotondo@comahue-conicet.gob.ar

Estimation of Partition index

In order to evaluate PAH bioavailability when sediments were present in bioassay 3, PAH distribution between two hydrophobic phases (sediment/polymer) was estimated as proposed by Smedes et al. (2013):

$$\frac{N_p}{N_{s,0}} = \frac{m_p K_p}{m_s K_{sw} + m_p K_p} \quad (1)$$

where N_p is the amount of PAHs in the polymer (g), $N_{s,0}$ is the initial amount of PAHs in sediments (g), m_p and m_s are the masses of polymer and sediments (g), respectively, K_{pw} ($L \cdot kg^{-1}$) is the polymer-water partition coefficient, and K_{sw} ($L \cdot kg^{-1}$) is the sediment-water partition coefficient. The water phase is not included in the denominator because its capacity is negligible compared to the other compartments (Smedes et al.

2013). In the present paper, the second hydrophobic phase is represented by algal cells. In accordance with Hung et al. (2014), PAH distribution between the aqueous phase and algal cells is dominated by the lipid-water partition coefficient (K_{tw} : triolein-water partition coefficient), showing that the influence of proteins or carbohydrates on the adsorption of hydrophobic compounds is negligible compared to lipids on their surface. The lineal relationship between K_{tw} and lipid-normalized algae-water partition coefficient ($K_{aw/lipid}$) (Hung et al. 2014) was calculated from equations (2) and (3):

$$\log K_{tw} = 1.12 (\pm 0.03) \log K_{ow} - 0.64 (\pm 0.24) \quad (2)$$

$$\log K_{aw/lipid} = 0.983 (\pm 0.014) \log K_{tw} + 0.134 (\pm 0.061) \quad (3)$$

where K_{ow} is the octanol-water partition coefficient of each PAH (Table 1). The algae-water partition coefficient (K_{aw}) was calculated by normalization with algal lipid content (f_l) ($K_{aw} = K_{aw/lipid} \cdot f_l$) by using the value obtained by Hung et al. (2014) for *Chlorella sorokiniana* ($f_l = 0.136$), assuming that its lipid content is similar to that of the green alga evaluated in this work: *S. quadricauda*.

By replacing K_p with K_{aw} in equation (1), equation (4) is obtained, which allows estimating the relationship between the amount of PAHs in algal and sediment phases:

$$\frac{N_a}{N_{s,0}} = \frac{m_a K_{aw}}{m_s K_{sw} + m_a K_{aw}} \quad (4)$$

where N_a is the amount of PAHs in algal phase (g), m_a is the mass (kg) of algal phase, and K_{sw} is the sediment-water partition coefficient, calculated from the organic carbon-water partition coefficient (K_{oc}) of each PAH by normalization with organic carbon fraction of the sediments (f_{oc}) ($K_{sw} = K_{oc} \cdot f_{oc}$), in accordance with Karickhoff et al. (1978). m_a was calculated from *S. quadricauda* biovolume, estimated in accordance with Hillebrand et al. (1999), and its abundance in the initial culture used for bioassays. f_{oc} was assumed to be half of TC.

Percentages of PAHs associated to algal phase over the initial amount present in sediments in bioassay 3 are shown on Table 1, as well as the different PAH parameters used to estimate partitioning indexes. These percentages are similar for all PAHs used, ranging between 44.4 % (An) and 52.3 % (Ba) of the total PAH amount.

Partition indexes in bioassay 3 show a clear effect of the presence of sediments which, despite their lower affinity to PAHs than algal cells ($K_{sw} < K_{aw}$, Table 1), represent in this case a mass fifty times greater than algae.

Table 1: Physicochemical parameters of the PAHs used in this work (Anthracene (An), Pyrene (Py), Phenanthrene (Ph) and Benz(a)anthracene (Ba)), and partition index estimated for bioassay 3 (N_a/N_s).

PAH	log	S (mg.L ⁻¹)	log K_{oc} ^(b)	log K_{sw}	log K_{tw} ^(c)	log $K_{aw/lioid}$ ^(d)	log K_{aw}	m_a (g)	m_s (g)	N_a/N_s
An	4.54	0.045	4.33	2.03	4.44	4.50	3.63	0.01	0.5	0.44
Py	5.18	0.132	4.97	2.67	5.16	5.21	4.33	0.01	0.5	0.48
Ph	4.57	1.100	4.36	2.06	4.48	4.54	3.66	0.01	0.5	0.45
Ba	5.91	0.011	5.70	3.40	5.98	6.01	5.14	0.01	0.5	0.52

^(a)Mackay et al. (1998).

^(b)Karickhoff et al. (1979).

^(c)From equation (2).

^(d)From equation (3).

References

Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*, 35(2), 403-424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>

Hung WN, Chiou CT, Lin TF (2014). Lipid–water partition coefficients and correlations with uptakes by algae of organic compounds. *Journal of hazardous materials*, 279, 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.071>

Karickhoff SW, Brown DS, Scott TA (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water research*, 13(3), 241-248. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(79\)90201-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(79)90201-X)

Mackay D, Callcott D (1998). Partitioning and physical chemical properties of PAHs. In *PAHs and Related Compounds* (pp. 325-345). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49697-7_8

Smedes F, Van Vliet LA, Booij K (2013). Multi-ratio equilibrium passive sampling method to estimate accessible and pore water concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in sediment. *Environmental science & technology*, 47(1), 510-517. <https://doi.org/10.1021/es3040945>

11. Anexos

I: Reactivos utilizados

1-naftiletildiamina, puro , Biopack®

Acetona (C₃H₆O), Pro-análisis, Cicarelli®

Ácido acético (C₂H₄O₂), 99,5 % Pro-análisis, Cicarelli®

Ácido ascórbico (C₆H₈O₆), Pro-análisis, Cicarelli®

Ácido clorhídrico (HCl), 36,5-38 % Pro-análisis, Cicarelli

Ácido fosfórico (H₃PO₄), 85 % Pro-análisis, Cicarelli®

Ácido sulfúrico (H₂SO₄), 95-97 %, Merck®

Antraceno (C₁₄H₁₀), 96 %, Merck®

Benzo(a)antraceno (C₁₈H₁₂) , 99 %, Aldrich®

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃), Pro-análisis, Cicarelli®

Cloruro de amonio (NH₄Cl), Pro-análisis, Biopack®

Etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTANa₂), Pro-análisis, Merck®

Fenantreno (C₁₄H₁₀), 97 %, Sigma®

Formol (CH₂O), 40 %, Biopack®

Hidróxido de sodio (NaOH), purio, Merck®

Ioduro de potasio (IK), 99 %, Cicarelli®

Kit Ureasa (para determinación de N-NH₄⁺), reactivo A: nitroferricianuro de sodio y fenol; reactivo B: hidróxido de sodio e hipoclorito de sodio, Wiener Lab®

Lugol (I₂/KI), 0,3-0,4 % en I₂, Biopack®

Molibdato de amonio tetrahidrato $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O})$, Pro-análisis, Cicarelli®

n-Hexano $(\text{C}_6\text{H}_{14})$, Pro análisis, Biopack®

Nitrato de sodio (NaNO_3) , Pro-análisis, Merck®

Nitrito de sodio (NaNO_2) , Pro-análisis, Merck®

Oxalato de potasio $(\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4\cdot \text{H}_2\text{O})$, > 99 %, Emsure®

Permanganato de potasio (KMnO_4) , Pro-análisis, Cicarelli®

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) , 31,6 %, Anedra®

Persulfato de potasio $(\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2)$, > 99 %, Emsure®

Pireno $(\text{C}_{16}\text{H}_{10})$, 95 %, Sigma®

Sulfato de cobre pentahidratado $(\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O})$, Pro-análisis, Biopack®

Sulfanilamida $(\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S})$, > 98 %, Sigma-Aldrich®

Sulfato ferroso $(\text{Fe}_2\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O})$, 99 %, Cicarelli®

Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado $(\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O})$, Pro-análisis, Cicarelli®

Tiosulfato de sodio $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O})$, 99,5 %, Anedra®

II: Medios de cultivo

Medio de cultivo Hill (1970) modificado:

Composición por 1 L de solución:

20 mL KNO₃ 1 M

10 mL MgSO₄ 0,1 M

5 mL CaCl₂ 0,1 M

10 mL KH₂PO₄ 0,1 M

0,6 mL Vitamina B12 + biotina + tiamina

20 mL Micronutrientes (N(CH₂COOH)₃; Na₂B₄O₇; CuSO₄; CoCl₂; MnCl₂; ZnSO₄; (NH₄)₆Mo₇O₂₄; FeSO₄)

Medio de Cultivo R2A (Reasoner y Geldreich, 1985)

Composición en g.L⁻¹ de agua bidestilada:

0,5 g Extracto de Levadura

0,5 g Proteasa peptona

0,5 g Casamino

0,5 g Glucosa

0,5 Almidón soluble

0,3 Ácido pirúvico

0,3 g K₂HPO₄

0,005 g MgSO₄

15 g Agar Agar polvo

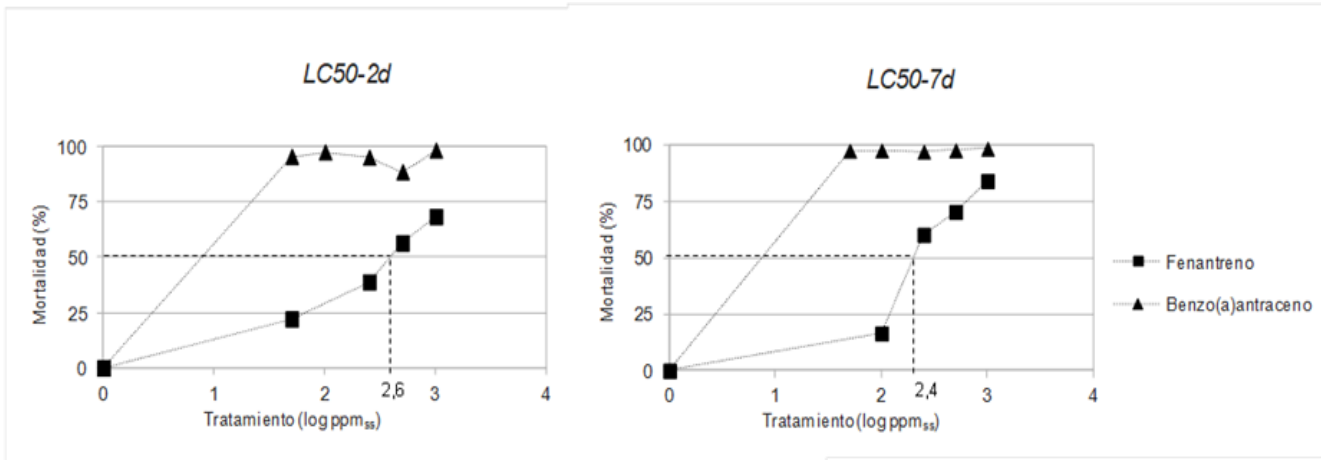
El pH se ajustó a 7,2 con una solución de NaOH o HCl 10 % y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Solución Fisiológica 0,9% (P/V)

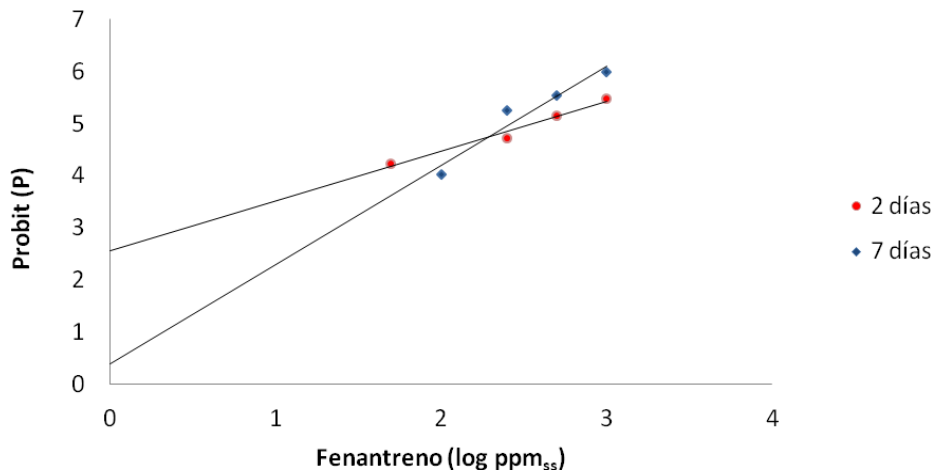
Composición en 100 mL de agua bidestilada:

0,9 g NaCl

III: Gráficos LC50



Mortalidad de *S. quadricauda* en el ensayo 3, luego de 2 y 7 días de incubación con diferentes HAPs. No se realizó la estimación del LC50 para benzo(a)antraceno debido a la falta de datos entre 0 y 50 ppm_{ss}.



2 días		7 días	
pendiente	0,95593969	pendiente	1,9038888
interseccion	2,55094017	interseccion	0,3938737
Test value	5	Test value	5
log conc. (ppm _{ss})	2,56193968	log conc. (ppm _{ss})	2,41932527
LC50	364,703285	LC50	262,618473

Distribución probit y cálculo de LC50 para los tratamientos con fenantreno a 2 y 7 días.

IV: Composición del petróleo crudo

Datos aportados por el el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, Merida, México, con la contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM).

Petróleo crudo ligero de la empresa Petroleos Mexicanos (PEMEX):

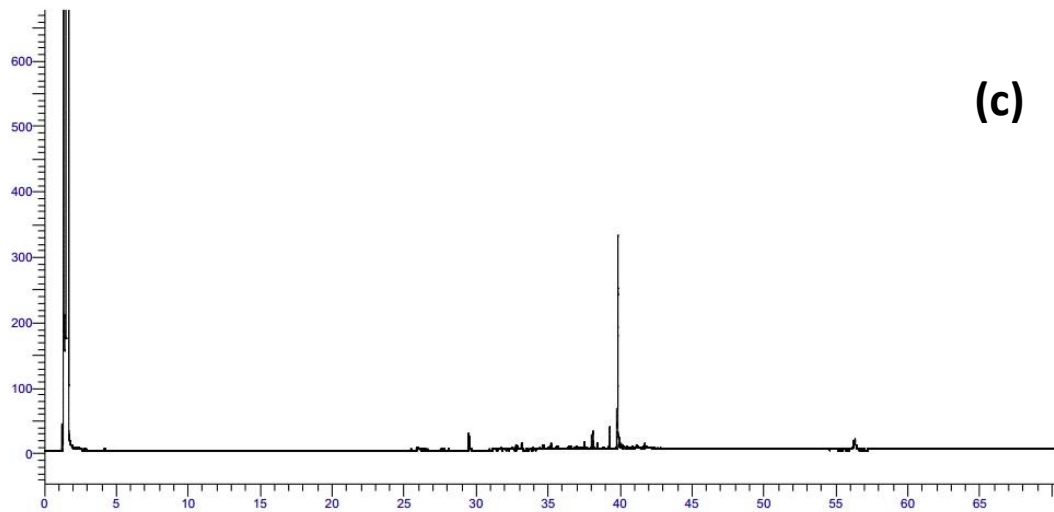
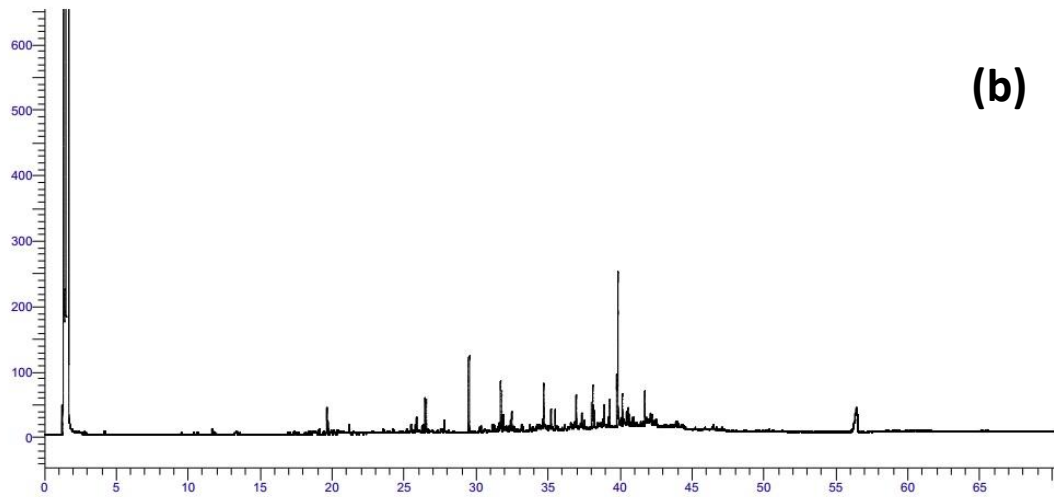
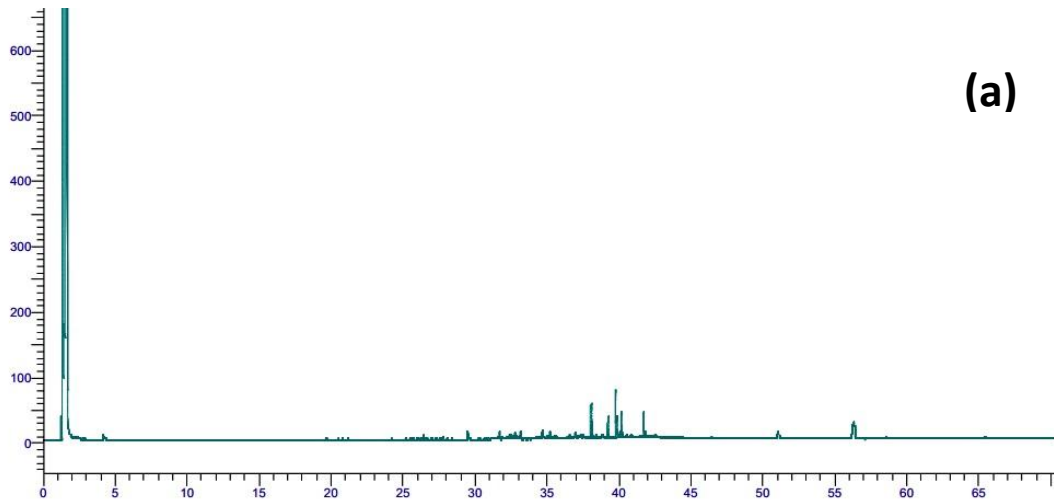
ND = No Detectable

Compuesto	g Kg⁻¹
C10	6,4638
C11	7,1518
C12	7,5739
C13	6,6046
C14	6,3760
C15	6,0280
C16	6,1929
C17	3,5539
PR	1,6588
C18	3,2564
FT	1,5948
C19	3,0812
C20	2,4660
C21	1,9595
C22	1,7334
C23	1,4018
C24	1,3479
C25	1,2140
C26	1,1416
C27	1,0204
C28	0,8869
C29	0,8295
C30	0,7058
C31	0,7068
C32	0,7125
C33	0,6545
C34	0,6378
C35	0,5553
C36	0,2971
C37	0,3903
C38	0,2552
C39	0,1581
C40	0,1288

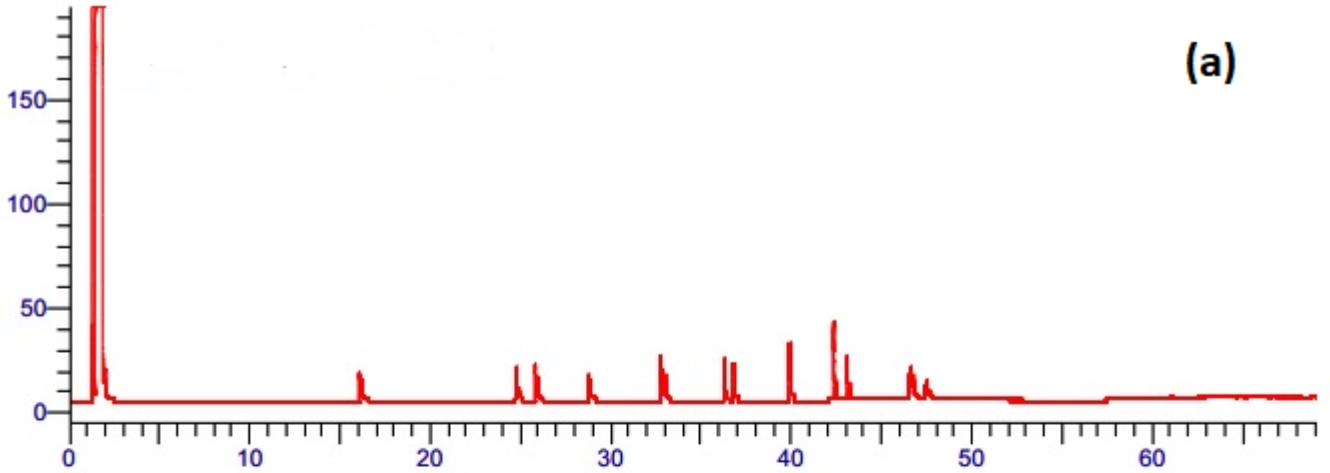
Compuesto	g Kg ⁻¹
ALIFÁTICOS TOTALES	78,7392
NAFTALENO	1,2625
2-METILNAFTALENO	1,5744
1-METILNAFTALENO	0,1506
BIFENIL	0,4363
2,6-DIMETILNAFTALENO	0,3703
ACENAFTILENO	0,0150
ACENAFTENO	0,3761
2,3,5-TRIMETILNAFTALENO	0,0063
FLUORENO	0,0099
DIBENZOTIOFENO	0,1614
FENANTRENO	0,0263
ANTRACENO	0,1300
1-METILFENANTRENO	0,0686
FLUORANTENO	ND
PIRENO	0,0787
CRISENO	0,0021
BENZO A ANTRACENO	0,0118
BENZO B FLUORANTENO	0,0132
BENZO K FLUORANTENO	0,0019
BENZO E PIRENO	0,0031
BENZO A PIRENO	ND
PERILENO	0,0068
INDENO 1,2,3,CD PIRENO	0,0019
DIBENZO AH ANTRACENO	ND
BENZO GHI PERILENO	0,0019
C19_tricyclic_terpene	0,0026
C20_tricyclic_terpene	0,0038
C21_tricyclic_terpene	0,9000
C22_tricyclic_terpene	1,9012
C23_tricyclic_terpene	2,6396
C24_tricyclic_terpene	1,3968
C25_tricyclic_terpene	7,0013
C26_tricyclic_terpene	3,4739
C27_tetracyclic_terpene	1,9913
C27_tetracyclic_terpene	6,5583
C28_tetracyclic_terpene	1,3887
C28_Tetracyclic_terpene.	1,8350
Ts:18a(H),21b(H)-22,29,30-Trisnorhopane	5,1739
Tm:17a(H),21b(H)-22,29,30-Trisnorhopane	8,1585

Compuesto	g Kg⁻¹
17a(H),18a(H),21b(H)-28,30-Bisnorhopane	ND
17a(H),21b(H)-30-Norhopane	22,3834
17a(H),21b(H)-30-oleonano	4,2654
17a(H),21b(H)-Hopane	21,1969
17b(H),21a(H)-Hopane	1,7844
22S-17a(H),21b(H)-30-Homohopane	13,5359
22R-17a(H),21b(H)-30-Homohopane	11,4460
Gamacerano	2,2909
22S-17a(H),21b(H)-30,31-Bishomohopane	7,7822
22R-17a(H),21b(H)-30,31-Bishomohopane	5,2319
22S-17a(H),21b(H)-30,31,32-Trishomohopane	5,5104
22R-17a(H),21b(H)-30,31,32-Trishomohopane	3,4791
22S-17a(H),21b(H)-30,31,32,33-Tetrakishomohopane	3,7975
22R-17a(H),21b(H)-30,31,32,33-Tetrakishomohopane	2,3789
22S-17a(H),21b(H)-30,31,32,33,34-Pentakishomohopane	3,5942
22R-17a(H),21b(H)-30,31,32,33,34-Pentakishomohopane	2,2837
C20-5a(H),14a(H),17a(H)-sterane	2,7755
5b_Pregnano	0,9535
C21-5a(H),14b(H),17b(H)-sterane	5,4765
C22-5a(H),14b(H),17b(H)-sterane	2,1541
C27-20S-13b(H),17a(H)-diasterane	4,5156
C27-20R-13b(H),17a(H)-diasterane	2,4107
C27-20S-13a(H),17b(H)-diasterane	1,2062
C27-20R-13a(H),17b(H)-diasterane	2,6174
C28-20S-13b(H),17a(H)-diasterane	2,6355
C29-20S-13b(H),17a(H)-diasterane	4,6526
C29-20R-13a(H),17ba(H)-diasterane	2,9457
C27-20S-5a(H),14a(H),17a(H)-cholestane	3,3981
C27-20R5a(H),14b(H),171b(H)-Cholestane	6,2547
C27-20S-5a(H),14b(H),171b(H)-cholestane	3,1851
C27-20R-5a(H),14a(H),17a(H)-cholestane	2,4916
C28-20S-5a(H),14a(H),17a(H)-ergostane	1,4944
C28-20R-5a(H),14b(H),17b(H)-ergostane	3,0696
C28-20S-5a(H),141b(H),17b(H)-ergostane	3,3291
C28-20R5a(H),14a(H),17a(H)-ergostane	2,0585
C29-20S-5a(H),14a(H),17a(H)-stigmastane	2,6854
C29-20R-5a(H),14b(H),17b(H)-stigmastane	4,4314
C29-20S-5a(H),14b(H),17b(H)-stigmastane	3,1595
C29-20R-5a(H),14a(H),17a(H)-stigmastane	3,3095

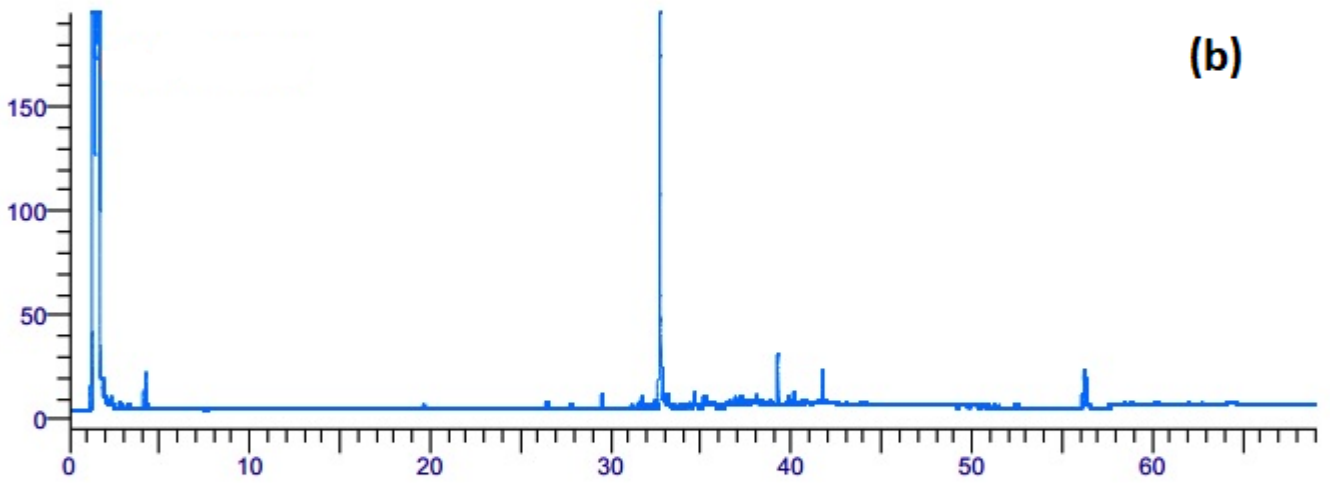
V: Cromatogramas



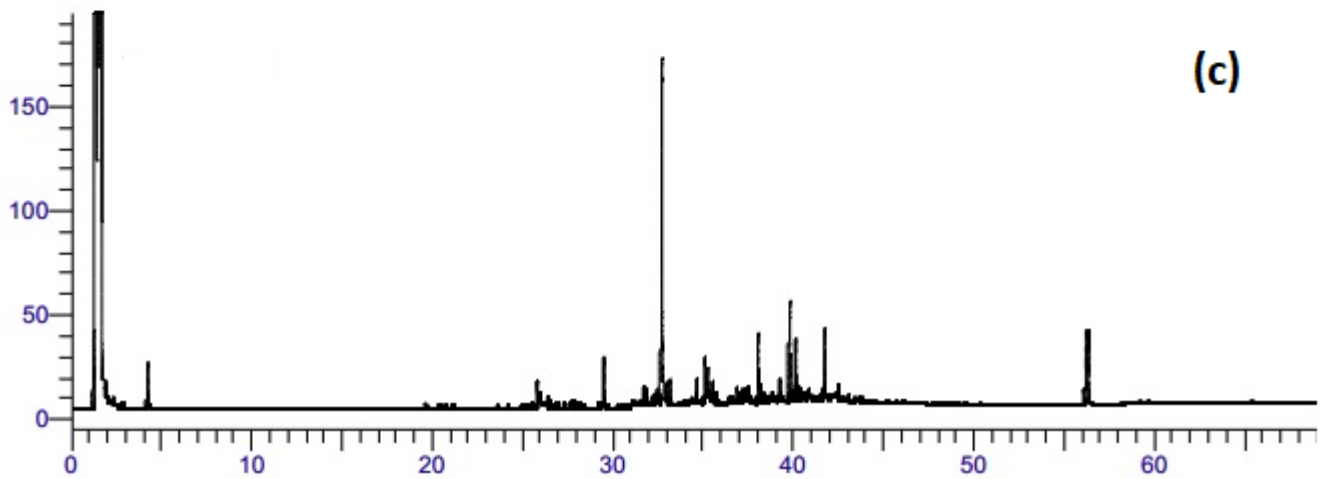
Cromatogramas para ensayos en suelo control (a), con 500 ppm_{ss} de BaA iniciales (b) y 1000 ppm_{ss} de BaA iniciales (c), luego de tratamiento con FN. Tiempo de retención del BaA = 39,8 min.



(a)



(b)



(c)

Cromatogramas del standard de 80 ppm de HAPs (a), suelo con 1000 ppm_{ss} de Fen iniciales, tratado con PS (b) y sedimento con 1000 ppm_{ss} de Fen iniciales, tratado con PM (c). Tiempo de retención del Fen = 32,6 min.