



## EFFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN DE SEDIMENTOS POR HAPS SOBRE LOS NUTRIENTES Y EL CRECIMIENTO DE *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*

### EFFECTS OF SEDIMENTS CONTAMINATION BY PAHS ON NUTRIENTS AND GROWTH OF *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*

Rotondo, Leandro<sup>1</sup>; Temporetti, Pedro<sup>1</sup>; Diaz, Mónica<sup>1</sup>; Mora, Verónica<sup>2</sup>; Pedrozo, Fernando<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), Centro Regional Universitario Bariloche-UNCo, CCT-Patagonia Norte, CONICET, S. C. de Bariloche 8400, Argentina, <sup>2</sup>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](mailto:leandrorotondo@comahue-conicet.gob.ar)

#### Resumen

Los sedimentos acuáticos actúan como reservorios de nutrientes así como también de contaminantes, dentro de los cuales encontramos hidrocarburos aromáticos policíclicos como fenantreno, pireno y antraceno. El fitoplancton puede ser indicador de la presencia de contaminantes, por lo que se propone su estudio en el embalse Los Barreales, Neuquén. Se caracterizó el ambiente, y se colectaron muestras para realizar un ensayo incubando sedimentos contaminados y agua filtrada, y otro en presencia de *Scenedesmus quadricauda*. Se observó una disminución en la concentración de nutrientes a partir de 500 ppm de fenantreno y pireno, y efectos tóxicos sobre *S. quadricauda* de los tratamientos con fenantreno a partir de 250 ppm a 2 y 7 días y con pireno a partir de 1000 ppm a 2 días. La contaminación de los sedimentos con Fenantreno o Pireno modifica la concentración de nutrientes en la columna de agua, y afecta el crecimiento de *S. quadricauda*.

**Palabras clave:** sedimentos, hidrocarburos, nutrientes, bioindicador.

#### Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes ubicuos y principales componentes de combustibles fósiles tales como el petróleo, identificándose entre los más tóxicos al Fenantreno (Fn), el Pireno (Pr) y el Antraceno (An) (Peluffo, 2016). Ante la presencia de contaminantes, los sedimentos de los ambientes acuáticos, juegan un importante rol debido a que pueden actuar como sumidero de los mismos, interviniendo, también, en el ciclo de los nutrientes, tales como el fósforo (P) y nitrógeno (N) (Eggleton *et al.*, 2004; Håkanson y Jansson, 1983). Por otro lado, se ha demostrado que las microalgas son indicadores sensibles al estrés contaminante (Munawar y Munawar 1987). Los bioensayos con fitoplancton, tanto en experimentos de microcosmos (Sibley *et al.*, 2001) como de mesocosmos (Nuy *et al.*, 2018) son las técnicas más empleadas para evaluar el impacto potencial de la contaminación. Dada la creciente explotación petrolera en el yacimiento de Vaca Muerta, es de suma importancia contar con herramientas que permitan evaluar de manera rápida y precisa el impacto que los HAPs producirán sobre los ambientes acuáticos y los suelos circundantes (Proyecto FAO UTF ARG 017/2017). Se proponen dos objetivos: 1) Estudiar el efecto que la contaminación por HAPs produce sobre la calidad de sedimentos del embalse Los Barreales (nutrientes). 2) Estudiar el posible uso de *Scenedesmus quadricauda* (microalga autóctona del ambiente bajo estudio previamente seleccionada como potencial bioindicador de contaminación por Fn en este ambiente por Rotondo *et al.* (2018) como indicador de contaminación por HAPs.

#### Área de estudio

El trabajo se desarrolló en el embalse Los Barreales, ubicado en la cuenca del río Neuquén y situado en la zona de explotación petrolera de Vaca Muerta, centrado en 38°33'03"S y 68°49'21"O. En el mismo, se establecieron tres sitios de muestreo (Fig. 1), entre 19 y 39 m de profundidad, seleccionándose las muestras del sitio central para realizar las experiencias de laboratorio.

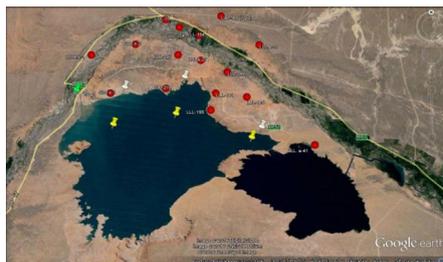


Figura 1: Sitios de muestreo en el embalse Los Barreales (en amarillo).

## Materiales y Métodos

**Obtención y caracterización de las muestras de agua, sedimentos y suelos para la realización de los ensayos en laboratorio:** Se colectaron muestras de agua (botella Van Dorn) y sedimentos (corer tipo UWITEC). Se conservaron de acuerdo con las recomendaciones realizadas por APHA (1995). *In situ*, se midieron pH y potencial redox. En las muestras de agua se determinaron: amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ ), fósforo reactivo soluble (PRS), fósforo total (PT) y nitrógeno total (NT) (APHA, 1995). En sedimentos se determinó capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Summer y Miller, 1996), PT (digestión ácida con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Murphy y Riley, 1962), Carbono total (CT) y NT (Thermo Flash EA 1112). La caracterización geoquímica se analizó por SEM-EDAX. La presencia y concentración de los PAHs se determinó por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (CG-FID).

**Caracterización de las asociaciones de especies fitoplanctónicas:** Se colectaron muestras de agua en superficie, 2, 6, 10, 18 y fondo (39 mts). Las muestras se fijaron con lugol-acético y el recuento algal se realizó mediante microscopio invertido (Utermöhl). Las especies fueron identificadas a partir de la bibliografía específica para cada grupo algal.

**Evaluación de la respuesta (nutrientes) de los sedimentos a la contaminación por HAPs:** Se consideraron como valores iniciales (controles) los determinados en los sedimentos del embalse. Las muestras de sedimentos fueron incubadas por triplicado, en frascos de vidrio con concentraciones crecientes (de 0 a 1000 ppm) de Fn, An o Pr (patrones calidad analítica). La temperatura de incubación fue de 25°C, y los HAPs se incorporaron a los sedimentos de acuerdo a Kulik *et al.* (2006). Los sedimentos contaminados se incubaron con agua del embalse. Se evaluó la disponibilidad de nutrientes en función de las dosis de HAPs a partir de la determinación de la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  y PRS en solución. Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para determinar las diferencias significativas entre sedimentos contaminados y sin contaminar (5 % de significación).

**Bioensayos con *S. quadricauda* utilizando diferentes HAPs:** Se realizaron los ensayos con monocultivos de esta especie y sedimentos contaminados artificialmente como se detalló en la actividad anterior. Los mismos se realizaron por triplicado, a temperatura constante (25 °C) y 12 hs luz, 50  $\mu\text{molfoton}\cdot\text{seg}^{-1}$ . Se cosecharon a los 2 y 7 días de incubación. Se realizó el recuento celular de cada frasco mediante microscopio invertido. Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para determinar las diferencias significativas (5 % de significación).

## Resultados

El embalse es un sistema alcalino (pH = 8,2), con elevada conductividad (265,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), y concentraciones promedio de PT=30,2  $\mu\text{g}/\text{l}$ , NT=123,5  $\mu\text{g}/\text{l}$ , PRS=5  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{NH}_4^+$ =7  $\mu\text{g}/\text{l}$  y clorofila "a"=1,4  $\text{mg}/\text{m}^3$ . Los sedimentos presentaron concentraciones promedio de PT=895  $\mu\text{g}/\text{g}$  d.w., NT=0,06 %, CT=0,7 % y CIC=30  $\text{mg}/100\text{g}$ . La textura arenosa (2-0,05 mm), con alto porcentaje (35%) de arena muy fina (0,25-0,05mm) respecto de las demás fracciones. La composición mineral de los sedimentos, (% de óxidos), resultó en promedio:  $\text{SiO}_2$  (55,4%)> $\text{Al}_2\text{O}_3$  (18,4%)> $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (8,9%)> $\text{CaO}$  (5,3%)> $\text{K}_2\text{O}$  (3,2%)> $\text{MgO}$  (2,9%)> $\text{Na}_2\text{O}$  (2,8%)> $\text{Ti}_2\text{O}$  (1,2%)> $\text{F}_2\text{O}$  (1,2%)> $\text{P}_2\text{O}_5$  (0,4%) >  $\text{SO}_3$  (0,3%). La concentración de Fn, An y Pr en los sedimentos del embalse fueron, en promedio, de 8,11, 0,77 y 0,82 ppm, respectivamente. Los siguientes grupos algales fueron identificados en el promedio anual de sucesión estacional: **Bacillariophyta** (*Cyclotella stelligera*; *Stephanodiscus* sp.; *Melosira granulata*); **Clorophyta** (*Scenedesmus quadricauda*; *Monoraphidium* sp.); **Criptophyta** (*Plagioselmis* sp.); **Dinophyta**: *Ceratium* sp. y **Cianophyta** (*Dolichospermum* sp.; *Merismopedia* sp.).

**Evaluación de la respuesta (nutrientes) de los sedimentos a la contaminación por HAPs:** Las concentraciones de PRS y  $N-NH_4^+$  en la columna de agua para los distintos tratamientos (HAPs y concentraciones en ppm) se muestran en la Fig. 2. Se observó una disminución, significativa, en la liberación de PRS y  $N-NH_4^+$  hacia la columna de agua, en los tratamientos de concentraciones mayores (500 y 1000 ppm) para Fn y Pr (Tabla 1). Los sedimentos contaminados con An no mostraron diferencias significativas para ninguno de los dos nutrientes, respecto al control. Una posible explicación para estos resultados podría estar relacionada a la CIC. Según Liang *et al.* (2006), el incremento de la CIC afecta significativamente la retención de nutrientes cuando el suelo tiene mayor concentración de HAPs. Sin embargo, futuras determinaciones de este parámetro deben ser realizadas para corroborar esta hipótesis.

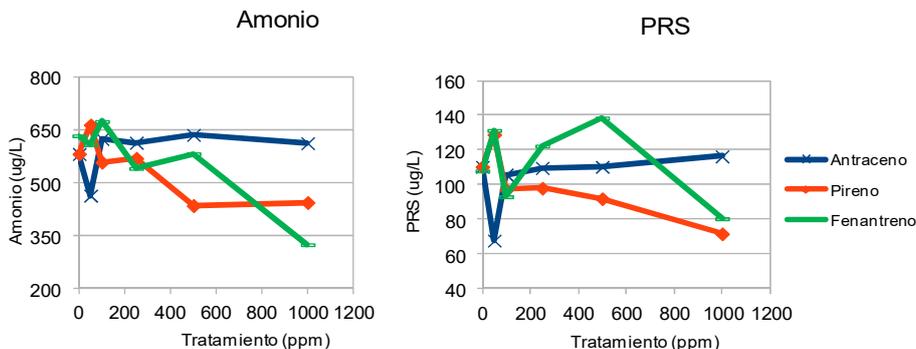


Figura 1: Concentraciones de  $NH_4^+$  y PRS en la columna de agua para los distintos tratamientos (HAPs) y concentraciones de los mismos (50, 100, 250, 500 y 1000 ppm).

Tabla 1. ANOVA de una vía con 5% de significancia para cada tratamiento (HAP), comparando entre las distintas concentraciones de HAPs.

| Compuesto  | Amonio |       |                   | PRS |       |                   |
|------------|--------|-------|-------------------|-----|-------|-------------------|
|            | gl     | F     | p-valor           | gl  | F     | p-valor           |
| Antraceno  | 5      | 4,99  | <b>0,015</b>      | 5   | 2,77  | 0,08              |
| Pireno     | 5      | 30,39 | <b>&lt;0,0001</b> | 5   | 7,8   | <b>0,0031</b>     |
| Fenantreno | 5      | 43,34 | <b>&lt;0,0001</b> | 5   | 48,91 | <b>&lt;0,0001</b> |

**Bioensayos con *S. quadricauda* utilizando diferentes HAPs:** Los valores de abundancia celular en los tratamientos con los diferentes HAPs y las concentraciones de los mismos se muestran en la Fig. 3. Se observaron diferencias significativas para Fn (a los 2 y 7 días y concentraciones superiores a 250 ppm) y Pr (a los 2 días para la concentración de 500 ppm). Sin embargo, no se observaron efectos significativos en ninguno de los tratamientos con An (Tabla 2). Means *et al.* (1980) relacionaron la adsorción de los HAPs en sedimentos de ríos con la solubilidad y coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) de diferentes HAPs. Por otro lado, Seiler *et al.* (2014) vinculan los efectos tóxicos diferenciales de los HAP a estos dos parámetros. Estos autores determinaron una diferente biodisponibilidad de cada HAP, teniendo en cuenta su solubilidad en agua (Fn = 1150 ug/L, An = 43,4 ug/L y Pr = 135 ug/L) y  $\log K_{ow}$  (Fn=5,61, An=5,33 y Pr=5,32). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo podrían relacionarse a la solubilidad de los HAPs ensayados debido a que el  $K_{ow}$  es similar para los tres HAPs. Estudios complementarios deben ser realizados para relacionar estos parámetros con la concentración de carbono orgánico en los sedimentos del ambiente, y con la actividad química de cada HAP en los sistemas propuestos, a fin de obtener un parámetro predictivo de toxicidad de acuerdo a lo propuesto por Engraff *et al.* (2011).

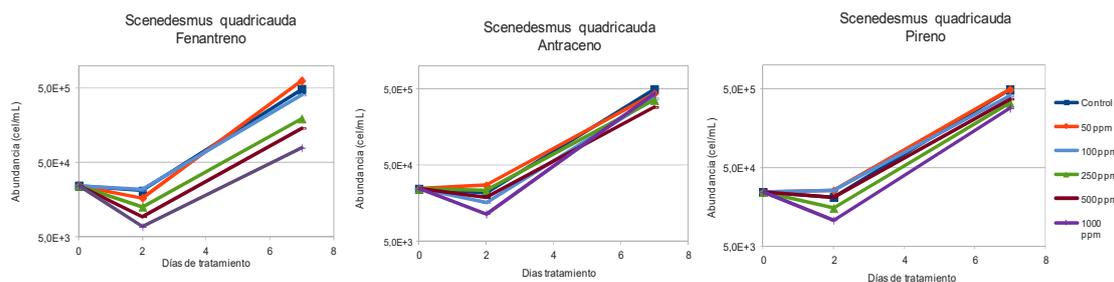


Figura 3: Abundancia de *Scenedesmus quadricauda* para los para los distintos tratamientos (HAPs) y concentraciones.



Tabla 2. ANOVA de una vía con 5% de significancia para la abundancia celular en cada tratamiento (HAP), comparando entre las distintas concentraciones de HAPs.

| Compuesto  | Día | Abundancia |       |               |
|------------|-----|------------|-------|---------------|
|            |     | gl         | F     | p-valor       |
| Antraceno  | 2   | 5          | 2,93  | 0,0638        |
|            | 7   | 5          | 1,65  | 0,2261        |
| Pireno     | 2   | 5          | 6,46  | <b>0,0039</b> |
|            | 7   | 5          | 1,68  | 0,2703        |
| Fenantreno | 2   | 5          | 6,56  | <b>0,0077</b> |
|            | 7   | 5          | 24,45 | <b>0,0001</b> |

## Conclusiones

La contaminación de los sedimentos del embalse Los Barreales con HAPs modifica la liberación de nutrientes desde estos hacia la columna de agua, así como también afecta el crecimiento de *S. quadricauda* a concentraciones mayores a 250 ppm para el Fn y 1000 ppm para el Pr. Estos resultados indican que los bioensayos con especies algales sensibles del ambiente constituyen una herramienta útil y rápida para detectar el efecto de la contaminación por hidrocarburos.

## Bibliografía

- APHA.** 1995. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". **1995. American Public Health Association, Washington, U.S.A. 1134 pp.**
- Eggleton, J., & Thomas, K.** 2004. "A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events". *Environment International* 30, 973-980.
- Engraff, M., Solere, C., Smith, K., Mayer, P. & Dahllöf, I.** 2011. "Aquatic toxicity of PAHs at PAH mixtures at saturation to benthic amphipods" *Aquatic toxicology* 102, 142-149.
- Hakanson, L. & Jansson, M.** 1983. "Principles of Lake Sedimentology". Springer-Verlag, Heidelberg, 316 pp.
- 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.
- Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, B., O'Neill, B., Skjemstad, O., Thies, J., Luizao, F.J., Petersen, J. & Neves, E.G.** 2006. "Black Carbon Increases Cation Exchange Capacity in Soils". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70:1719-1730
- Means, J., Wood, S., Hassett, J. & Banwart, W.** 1980. "Sorption of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Sediments and Soils". *Env. Science & Technology* 0013-936X/80/0914-1524.
- Munawar, M. & Munawar, I.F.** 1987. "Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of in situ sediments contaminants". *Hydrobiologia* 149: 87 -105.
- Murphy, J. & Riley, J.P.** 1962. "A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters". *Anal Chim Acta* 27:31-36.
- Nuy, J. K., Lange, A., Beermann, A. J., Jensen, M., Elbrecht, V., Röhl, O. y Boenigk, J.** 2018. *Science of The Total Environment*, 633, 1287-1301.
- Peluffo, M.** 2016. "Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante oxidación química". Tesis doctoral, UNLaPlata, 203 pp.
- Proyecto FAO UTF ARG 017.** DT N° 9 "Aspectos Ambientales de la provincia del Neuquén". Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Rotondo, L., Mora, V., Diaz, M., Temporetti, P., Beamud, G., Baffico, G. y Pedrozo, F.** 2018. "Respuesta de los sedimentos y el fitoplancton del embalse los barreales a contaminación por fenantreno". VII Congreso SETAC ARG, San Luis, Argentina.
- Seiler, T-B, Best, N., Fernqvist, M.M., 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.
- Sibley, P., Harris, M., Bestari, K., Steele, T., Robinson, R., Gensemer, R., Day, K. y Solomon, K.** 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20, No. 12, pp. 2785-2793.
- Summer, M.E. & Miller, W.P.**, 1996. "Cation exchange capacity and exchange coefficients". En *Methods of Soil Analysis. SSSA Book Series: 5, Part 3. Chemical Methods. Chapter 40: 1201- 1229. Madison, Wisconsin, USA. 1390 p.*