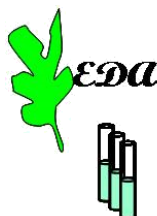


Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud



Especialización en Ciencias Químicas
con Mención en Diagnóstico Ambiental



Trabajo Final

**“Análisis de Procedimientos para el Desarrollo
de Ensayo Fitotóxico en Suelos Empetrolados
de la Provincia del Chubut”**

Alumna: Geól. Analía Soledad Porma

Directora: Farm. Hebe Bibiana Blasetti

Comodoro Rivadavia

Año 2025

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Hebe Blasetti, por el empuje, confianza y motivarme siempre.

A mi FAMILIA por la contención, principalmente a mi hijo Fausto por ceder su tiempo.

A mis compañeras, transitar este camino con ellas fue único.

A docentes de la Especialidad por su dedicación, pero principalmente su TIEMPO.

A Ofelia Katusich, por su paciencia infinita y no dudar de mi capacidad.

A todos los que colaboraron conmigo para que este trabajo sea posible.

¡¡¡Gracias gracias gracias!!!

Indice

RESUMEN	5
1. Introducción	6
2. Procesos y procedimientos	10
2.1. Exploración	11
2.2. Perforación	12
2.3. Producción	12
2.4. Almacenamiento y Transporte	12
2.5. Refinación	13
3. Principales Contaminantes	13
4. Efectos	20
4.1. Efectos sobre plantas	21
4.2. Efectos sobre la salud humana	23
4.3. Efectos sobre animales	24
5. Legislación	25
5.1. Legislación Nacional	27
5.2. Legislación Provincial	28
5.3. Legislación Municipal	29
6. Metodologías analíticas	32
6.1. Muestreo de suelo	34
6.2. Análisis del petróleo	35
6.3. Detección de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) (Cantero <i>et al.</i>, 2005)	36
6.3.1. Determinación de HTP por Cromatografía Gaseosa	36
6.3.2. Determinación de HTP por Espectrofotometría Infraroja (IR)	37
6.3.3. Determinación de HTP por Métodos Gravimétricos	37
6.3.4. Determinación de HTP por Métodos de Inmunoensayos	38
6.3.5. Determinación de Tipos de Hidrocarburos del Petróleo	38
6.4. Determinación de los constituyentes individuales del petróleo	39
6.4.1. Cromatografía Gaseosa con Detector por Fotoionización (GC/PID)	39
6.4.2. Cromatografía Gaseosa con Detector de Ionización de Llama (GC/FID)	39
6.4.3. Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)	40
6.4.4. Cromatografía Gaseosa con Detección Espectrométrica de Masas GC/MS	40
6.5. Determinación de HTP discriminado por Fracciones	41
6.6. Ensayos Fitotóxicos	43

6.6.1. Bioensayos: una herramienta para evaluar toxicidad de HTP	45
6.6.2 Bioensayo con semillas de <i>Lactuca Sativa</i>	49
6.6.3 Curva dosis respuesta	51
6.7 Procedimiento recomendado: Método directo	54
7. Formas de tratamiento	57
7.1. Tratamientos Biológicos	59
7.1.1. Biorremediación	59
7.1.2. Bioaumentación	60
7.1.3. Landfarming y Biopilas	60
7.1.4. Fitorremediación	61
7.2. Tratamientos Físicoquímicos	62
7.2.1. Solidificación/estabilización	63
7.3. Fotodegradación de Hidrocarburos Aromáticos	63
8. Análisis forense ambiental	64
8.1. Compuestos presentes en el petróleo	65
8.2. Compuestos individuales específicos	66
8.3 Teledetección de derrames de petróleo	68
8.3.1 Teledetección de derrames de petróleo asociado a estrés fitotóxico	69
8.4 Comportamiento de las plantas en suelos contaminados con petróleo	71
8.4.1 Estrés vegetal como indicador de derrames de hidrocarburos	72
9. Conclusiones	73
10. Bibliografía	76

Resumen

En la provincia del Chubut, la cuenca del Golfo San Jorge es uno de los principales centros de explotación hidrocarburífera del país, siendo muchas veces el origen de una problemática ambiental asociada a las etapas de exploración, extracción, y transporte de los hidrocarburos. En el presente trabajo final se analizan los procedimientos necesarios para desarrollar un ensayo fitotóxico en suelos contaminados con petróleo en la Provincia del Chubut, con el fin de hacer un enfoque integral del problema, y para ello, se describen las características del contaminante, los principales procesos y procedimientos en los que ocurre la contaminación, el destino del contaminante y los efectos que causa un derrame de petróleo a nivel ecosistema. Se menciona la normativa nacional, provincial y municipal vigente aplicable en este tipo de eventos, se detallan metodologías analíticas que permitirían efectuar el diagnóstico, monitoreo y/o control de los suelos afectados por derrames de hidrocarburos, y se propone específicamente hacer énfasis en analizar procedimientos para la aplicación de un ensayo fitotóxico. Se indican, a su vez, las formas de tratamiento citadas en la bibliografía, y las utilizadas en el lugar de estudio para remediar los sitios afectados. Se describen las diferentes metodologías forenses en la investigación de los contaminantes específicos de la actividad petrolera, tales como imágenes satelitales, teledetección, indicadores de estrés fitotóxico, entre otras. Por todo lo mencionado y más, se concluye que la información proveniente de los ensayos de toxicidad asociada a plantas constituye una valiosa herramienta para evaluar el riesgo ambiental. Es por ello que se propone el uso del método directo, el cual presenta mayor sensibilidad para suelos empetrolados, y se sugiere la posibilidad de su aplicabilidad en la región en función de la utilización de especies vegetales autóctonas.

1. Introducción

El petróleo crudo es una mezcla compleja de hidrocarburos, con pequeñas cantidades de azufre (S), oxígeno (O) y nitrógeno (N), así como diversos componentes metálicos, especialmente vanadio (V), níquel (Ni), hierro (Fe) y cobre (Cu). (Speight, 2001). Es separado en cuatro fracciones principales según solubilidades y polaridades: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos. (Speight, 2015).

En términos de la composición elemental del petróleo crudo, el contenido de carbono es relativamente constante, mientras que los contenidos de hidrógeno y heteroátomos son responsables de las diferencias entre el petróleo de diferentes fuentes. El N, el O y el S pueden estar presentes solo en pequeñas cantidades en algunos. Se clasifica según las propiedades físicas o la composición química, o se dividen en fracciones químicas según el punto de ebullición. La gravedad determina si el petróleo se clasifica como ligero, medio o pesado. El petróleo crudo contiene de 0.2 a 7% de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), con configuraciones que van de dos a seis anillos (Speight, 2006).

En la *Figura 1.1.* (Gomez, 2018) se pueden observar los componentes del petróleo y sus grupos más importantes.

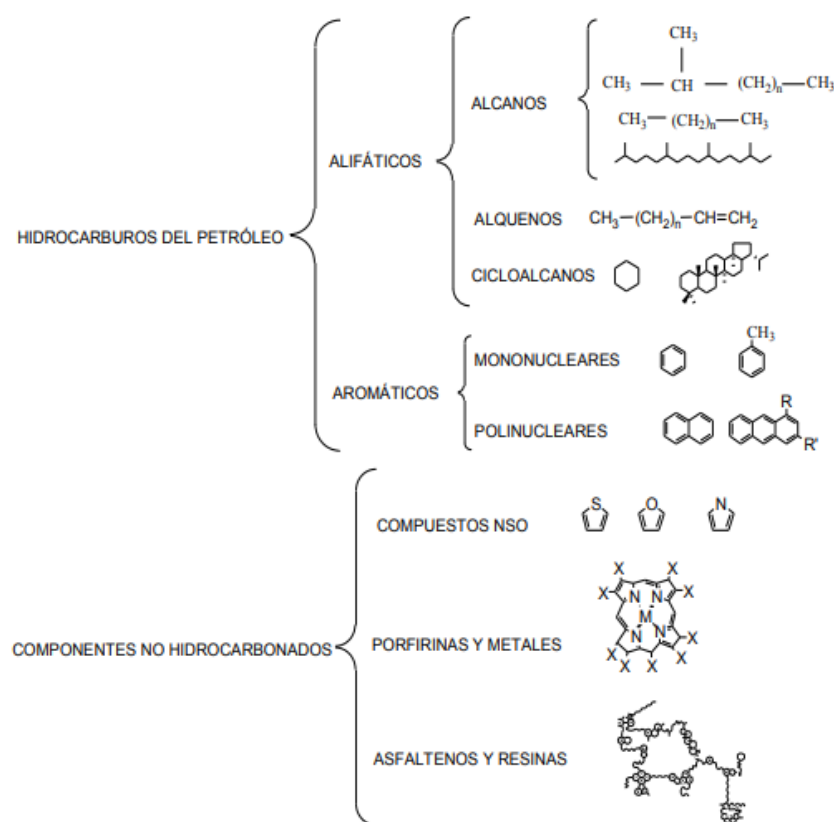


Figura 1.1.: Componentes del petróleo y su estructura química.

El petróleo, es un recurso no renovable, constituye la materia prima para generar energía, y posee un valor mínimo en estado crudo, pero cuando se refina, proporciona combustibles líquidos, solventes, lubricantes y demás productos de alto valor (Speight, 2011).

Beatriz Sevilla menciona en el portal de estadísticas *statista.com*, que la demanda de petróleo a nivel mundial ha aumentado en 101,6 millones de barriles por día, como se puede observar en la *Figura 1.2.*; esto implica por qué la explotación de este recurso se lleva a cabo en una enorme escala a nivel mundial, que, a su vez, trae consigo los riesgos de afectación ambiental en muchos aspectos (Caro Alba, 2020).

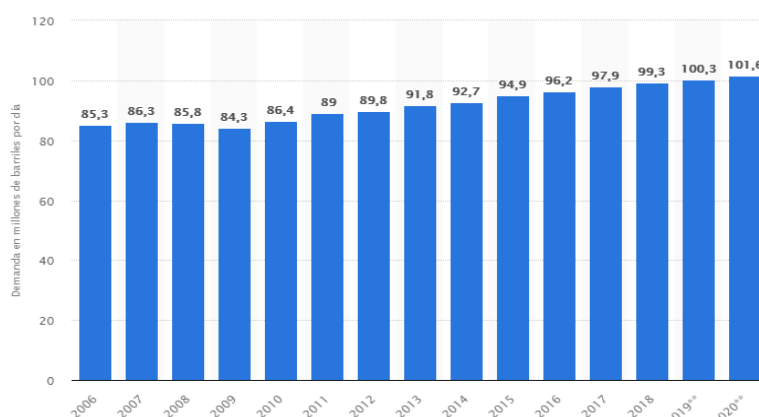


Figura 1.2.: Demanda diaria de petróleo crudo a nivel mundial de 2006 a 2020.

En Argentina la fuente de energía más importante la representan los combustibles fósiles. Según se observa en la *Figura 1.3.* (Zabaloy & Martínez, 2019), el país posee una matriz energética primaria altamente dependiente del petróleo y gas natural, que juntos representan el 84% de la misma. De acuerdo a informes de los Balances Energéticos Nacionales, se puede afirmar que el gas distribuido por redes es la principal fuente energética (37%), seguido de la energía eléctrica (21%) y el diésel oil y gas oil (19%).

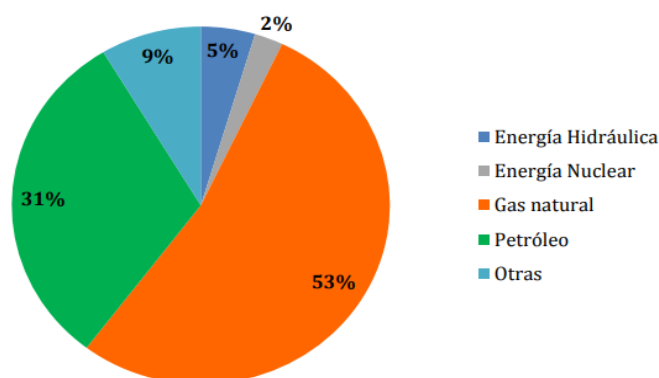


Figura 1.3.: Matriz energética en Argentina para el año 2018.

De un total de 24 cuencas sedimentarias existentes en Argentina, cinco de ellas producen petróleo y gas, tales como la cuenca Austral, Cuyana, Golfo San Jorge, Neuquina y Noroeste, ilustradas en la *Figura 1.4.* (Lovecchio, 2015). En nuestra región, la actividad hidrocarburífera depende principalmente de la cuenca del Golfo San Jorge, que abarca las jurisdicciones provinciales del sur de Chubut y norte de Santa Cruz, y áreas offshore de ambas (De Dicco, 2014).

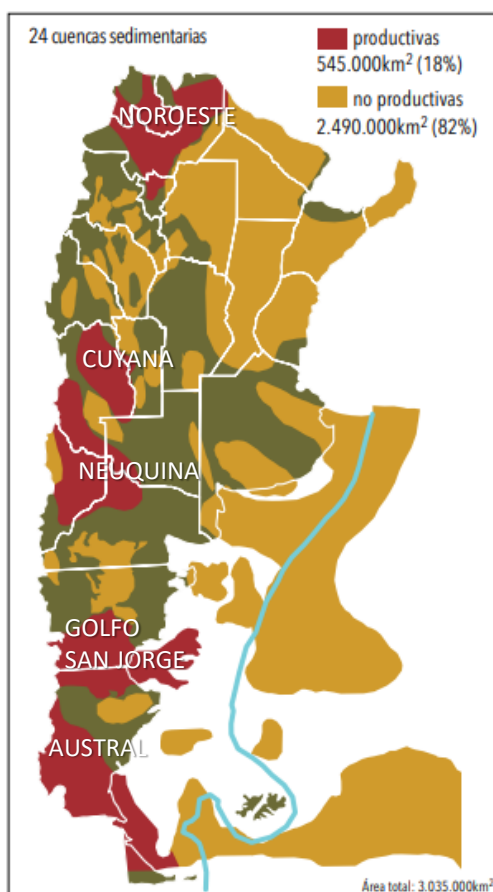


Figura 1.4.: Cuencas productivas y aún no productivas de Argentina.

El enfoque del presente trabajo aplica a la zona de la cuenca del Golfo San Jorge, ubicada en la provincia del Chubut. Caracterizada por bordes irregulares, y elongada en dirección Este-Oeste, desarrollada al este de los primeros contrafuertes de la Cordillera Patagónica entre los 44° y 48° S de latitud (Johnson *et al.*, 2015) y 65° y 71° O de longitud (Figari *et al.*, 2002), y ubicada en la porción central de la Patagonia, que comprende la parte sur de la provincia del Chubut, y norte de Santa Cruz, junto con las áreas offshore de ambas (el golfo San Jorge). Posee una superficie estimada de 180.000 km². Las concesiones de exploración y explotación cubren un área de 40.530 km² onshore y de 18.980 km² offshore (Figari *et al.*, 2002).

La ciudad de Comodoro Rivadavia se encuentra ubicada sobre esta cuenca, donde el principal activo es de la operadora Pan American Energy, conocido como Cerro Dragón, el yacimiento de petróleo más importante del país y el tercero en producción de gas (López Cristeche, 2019). En la extracción petrolera se concentra el 75,2% de la actividad, mientras que en la extracción gasífera solo el 74,8% (De Dicco, 2014).

El parque de refinación argentino cuenta con una capacidad instalada de procesamiento de petróleo de aproximadamente 628980 barriles por día (b/d). El 98% de esa capacidad se concentra en sólo ocho refinerías pertenecientes a seis empresas, de las cuales, YPF posee tres propias (La Plata, Luján de Cuyo y Plaza Huincul), que suman una capacidad de procesamiento de 322000 b/d (51,2% del total). El Complejo Industrial La Plata es uno de los más importantes de América del Sur (Sabbatella, 2018). Por su parte, Pan American Energy posee una refinería ubicada en la ciudad de Campana (Buenos Aires). Además, cuenta con 3 terminales de almacenamiento de combustibles ubicadas en San Lorenzo, Bahía Blanca y Caleta Paula (región de Caleta Olivia).

En la industria del petróleo y el gas, existe la llamada cadena de valor de la industria que consta de tres etapas principales: *upstream*, *midstream* y *downstream*. El *upstream* consta de actividades de exploración, perforación, explotación y producción. El *midstream* involucra actividades de transporte y almacenamiento, y el *downstream*, corresponde al procesamiento y refinación del petróleo, la elaboración de productos químicos derivados, y su comercialización (Aggio *et al.*, 2017).

La problemática ambiental principal vinculada a la industria petrolera se relaciona con las etapas de exploración, extracción, y principalmente en la etapa de transporte de los hidrocarburos (Luque, 2009), ya que, a través de su conducción por oleoductos, se mantiene el riesgo de contaminación de suelos en el caso de eventuales derrames (Blanco *et al.*, 2006; Arias-Trinidad *et al.*, 2017). Cuando esto ocurre, no se suele tomar en cuenta la posible transformación de los contaminantes en compuestos más tóxicos, con lo cual se subestima el verdadero riesgo ambiental (Plaza *et al.*, 2005). Así mismo pocos incluyen dentro de sus exigencias el empleo de los análisis de toxicidad, aplicando bioensayos específicos y estandarizados, ya sea como criterio post remediación o limpieza de suelos afectados. Esta combinación puede ser utilizada para determinar el riesgo ambiental (Díaz Rodríguez *et al.*, 2022).

Mayormente ante un evento de contaminación, se realizan estudios que no contemplan la biodisponibilidad de los contaminantes.

Goya Castro, N. I. (2020) cita varios casos de ensayos efectuados para estudiar el efecto del petróleo como contaminante en parámetros tales como la germinación de semillas, altura de la planta, longitud de las raíces, etc., en los que se concluye que, las principales consecuencias de un derrame son la inhibición en el crecimiento y reducción de la microbiota. Aunque en general la toxicidad disminuye con la biodegradación, se han encontrado casos en donde se forman compuestos de mayor toxicidad que los originales. Por esta razón es necesario evaluar el riesgo de los suelos petrolizados sometidos a procesos de biodegradación empleando ensayos toxicológicos (Sirit *et al.*, 2008).

La propuesta de este trabajo sugiere implementar la realización de bioensayos, más específicamente se trata de ensayos fitotóxicos, que sean enfocados en derrames de hidrocarburo que afecten los suelos de la región, lo cual permitirá integrar la información de la presencia de contaminantes, su biodisponibilidad y los posibles efectos tóxicos sobre los suelos (Pernía *et al.*, 2018).

A su vez, en función de lo mencionado, analizar los procedimientos que serían aplicables para efectuar ensayos fitotóxicos en suelos contaminados por hidrocarburos, con la finalidad de poder evaluar el alcance del daño ambiental generado, ya que se trata de una problemática muy recurrente en la región, y aún no ha sido desarrollada en profundidad la aplicación de este tipo de ensayos para la evaluar riesgos ambientales ante eventos contingentes.

Cabe aclarar que la ley 25.675 en el artículo 27 define “daño ambiental” como toda alteración relevante que modifique negativamente el ambiente, sus recursos, el equilibrio de los ecosistemas, o los bienes o valores colectivos.

2. Procesos y procedimientos

Los procesos y procedimientos involucrados en las tareas de extracción, transporte y tratamiento del petróleo presentan muchas similitudes a nivel mundial, sin embargo, existen algunas variaciones entre unas y otras debidas generalmente al tipo de relieve de la zona, características del petróleo que se va a extraer, condiciones climáticas y al tipo de tecnología utilizada.

La *Tabla 2.1.* resume por etapas los principales procesos que pueden generar contaminación del suelo, la instalación que podría causarla, y los tipos de contaminantes emitidos durante las etapas mencionadas.

Etapa / Proceso	Instalación de ocurrencia	Acción contaminante en suelo	Contaminantes emitidos
Perforación	Perforación de pozos	Derrames de lodo (surgencia de pozo), recortes de perforación (cutting)	Metales pesados (Ba, y niveles bajos de Cr, Fe, Ca, V, Ni y Zn), HAP , COV , HTP
Producción	Pozos productores e inyectores	Derrames de petróleo crudo y agua de producción / agua de inyección	HAP , COV , HTP y salinidad
	Estaciones de rebombeo	Escape de diésel y gas	SO _x , NO _x , CO, COV, H ₂ S, CO ₂ , HC y partículas
	Colectores de petróleo	Derrame de petróleo crudo	HAP , COV , HTP
Transporte	Ductos (transporte de crudo)	Derrame de petróleo crudo, fondos de tanque	HAP , COV , HTP y salinidad
Separación y Almacenamiento	FWKO (Free Water Knock Out)		
	Baterías (e instalaciones auxiliares asociadas)		
	Plantas de tratamiento de crudo		
	Estaciones de embarque		

HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos / **SO_x:** óxidos de azufre / **COV:** compuestos orgánicos volátiles / **CO₂:** dióxido de carbono / **HTP:** hidrocarburos totales del petróleo / **HC:** hidrocarburos / **NO_x:** óxidos de nitrógeno / **H₂S:** ácido sulfhídrico.

Tabla 2.1.: Actividades, instalaciones o causantes de contaminación, y contaminantes emitidos (Modificación personal de tablas tomadas de Cuéllar *et al.*, 2004).

A continuación, se hace un breve resumen de las diversas etapas que suelen estar asociadas a la contaminación de los suelos en esta industria, desde el descubrimiento del recurso en un yacimiento, hasta la entrega del producto tratado a los sectores consumistas.

2.1. Exploración

Usualmente involucra una etapa de mapeo con fotografías aéreas de la superficie de la tierra, seguida por investigaciones sísmicas, gravimétricas y magnéticas para determinar la estructura del suelo. Esto permite determinar si a nivel subsuelo podría existir la acumulación de depósitos de petróleo y gas, siendo necesario realizar perforaciones a fin de probar la existencia real de petróleo. (Olea & Rivera, 2014).

2.2. Perforación

Para perforar un pozo petrolero se debe construir un camino de acceso y una locación, y compensar al dueño de la tierra por la superficie afectada. Una vez perforado el pozo, si se confirma la existencia de petróleo, se procede a la etapa de producción (Villanueva Osuna, 2015).

2.3. Producción

Ocurre una vez finalizada la perforación y terminación del pozo. En la cuenca del Golfo San Jorge la mayoría de los pozos productores utilizan un sistema de bombeo mecánico (AIB, PCP). También es muy común la aplicación de inyección de agua a pozos que se denominan “inyectores”, en proyectos de recuperación secundaria de reservas.

Una vez los fluidos presentes en el reservorio son extraídos (agua, petróleo y gas), son conducidos desde cada uno de los pozos hasta sus correspondientes destinos de producción, que abarcan desde colectores de petróleo o gas, hasta los destinos de subsiguientes en el circuito de producción tales como baterías a través de una red de cañerías (ductos).

2.4. Almacenamiento y Transporte

Los fluidos de los pozos deben ser separados y tratados antes de ser enviados a la refinería o a un sistema de procesamiento de gas. Este primer paso se da generalmente en una batería de tanques localizada cerca de un pozo. Estos tanques de almacenamiento reciben la producción de un determinado número de pozos del yacimiento, generalmente entre 10 y 30, donde se lleva a cabo la separación de los diferentes fluidos y la medición diaria del volumen producido total (Emiliozzi, 2000).

La función de las baterías implica la separación de las fases gas – líquido. En su instalación encontramos un separador general y uno de control. Los líquidos circulan de un tanque general a uno de control, para luego pasar a la planta de tratamiento de crudo del yacimiento (PTC), donde una parte se acumulará en el fondo de los tanques.

El petróleo se somete a tratamientos antes de ser comercializado, cuyo principio de acción consiste en la aplicación de agentes químicos demulsificantes que favorecen o inducen a la formación o estabilidad de la emulsión. Mediante tratamiento térmico se incrementa la temperatura de la emulsión, para facilitar su separación.

El tratamiento mecánico, induce la acción desemulsificante, lo realizan los tanques de sedimentación conocidos como tanques de lavado, y los FWKO (Free Water Knock Out).

Para los casos en los que se emplea el tratamiento eléctrico, consiste en crear un campo eléctrico mediante la utilización de deshidratadores electrostáticos, para cambiarle la polaridad a una parte de la emulsión, y aumentar así la atracción entre las partículas y romperla (Aranda, 2010).

Finalmente, el petróleo pasa a los tanques de despacho, desde donde es bombeado al punto de venta. Para los yacimientos de Comodoro Rivadavia este punto se encuentra en la localidad de Caleta Córdova.

2.5. Refinación

El petróleo crudo producido en la Patagonia se transporta a las refinerías por vía marítima y por oleoductos troncales. Las cuencas Golfo San Jorge y Austral cuentan con una red local de oleoductos, que lleva el crudo hacia las terminales de carga de buques que lo trasladan principalmente a las refinerías de la provincia de Buenos Aires.

3. Principales Contaminantes

Los principales contaminantes provenientes de la industria petrolera se originan en las etapas de perforación, explotación, producción y transporte de petróleo (Mateo, 2019).

La naturaleza química de los hidrocarburos presentes en un derrame depende del origen y del tiempo de permanencia en el ambiente, por lo que su composición química es muy variable. Por este motivo se encuentran como mezclas de diferentes especies y, en conjunto, se determinan como Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).

Los HTP carecen de una composición definida, ya que poseen diferentes propiedades químicas y toxicológicas, debido a que algunos de sus componentes figuran en la lista de contaminantes prioritarios de los organismos internacionales, tales como la Agencia de Protección Ambiental de USA (EPA) (Bojes & Pope, 2007; Ríos & Nudelman, 2008).

La medición de HTP es útil para determinar la cantidad total de componentes del petróleo que se encuentran en una muestra particular de suelo, agua, aire, biota, etc. En las *Figuras 3.1. y 3.2.* se observan las estructuras de algunos de los hidrocarburos saturados y aromáticos del petróleo (Yang et al., 2017).

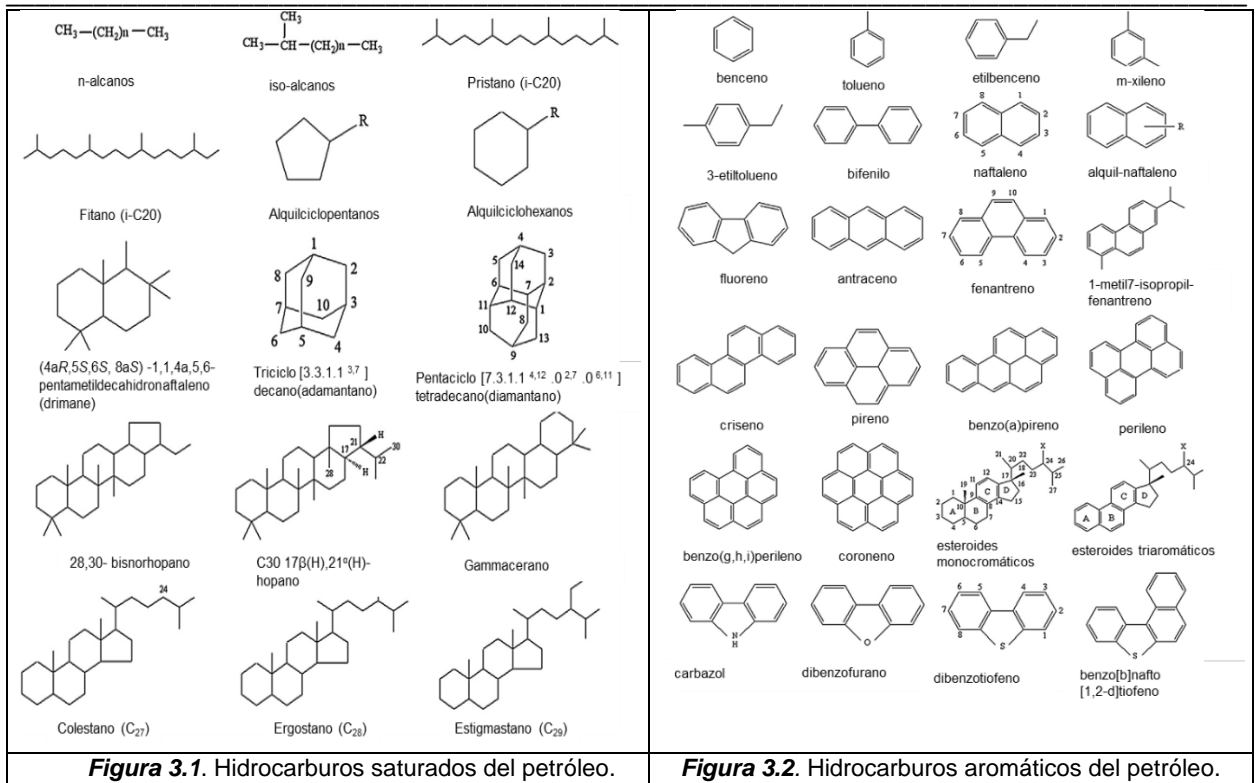


Figura 3.1. Hidrocarburos saturados del petróleo.

Figura 3.2. Hidrocarburos aromáticos del petróleo.

El ecosistema se ve afectado luego de un derrame, pero sus efectos no son permanentes y el ecosistema tiende a restablecerse con el tiempo. El destino de los hidrocarburos provenientes de un derrame es muy difícil de cuantificar, ya que son dependientes de las características del suelo, la vegetación, el clima y la posición geográfica (Brutti *et al.*, 2018). A su vez, al producirse un derrame de petróleo, se producen una serie de cambios en sus propiedades tanto físicas como químicas, lo que se conoce como intemperización, y se debe a que el petróleo al entrar en contacto con condiciones diferentes a las cuales se encontraba durante su formación sufre una serie de cambios en sus propiedades.

Los derrames de hidrocarburos producen una alteración del sustrato original en que se implantan las especies vegetales dejando suelos inutilizables durante años. En la provincia del Chubut, existen sistemas para el control de la red de oleoductos y planes de contingencia diseñados por las empresas productoras y/o transportadoras, lo que ha permitido disminuir la cantidad y magnitud de derrames, pero los incidentes eventuales siguen constituyendo una problemática ambiental de la actividad. La contaminación de suelos se ve agravado en la Patagonia extraandina, dado que es un ecosistema sumamente frágil, lo que limita naturalmente el crecimiento de las plantas debido a la baja disponibilidad de agua y nutrientes, clima árido frío, elevadas amplitudes térmicas, fuertes vientos (Luque, 2009).

Las características determinantes de los hidrocarburos al entrar en contacto con el ambiente son la densidad, presión de vapor, coeficiente de partición suelo-agua, polaridad, solubilidad en agua, hidrofobicidad, entre otras (Brito *et al.*, 2003), y de los procesos de evaporación, disolución, y biodegradación. Su comportamiento en el ambiente también estará dado por las características físicas y químicas de los suelos, los cuales podrían facilitar otros procesos como por ejemplo la fotooxidación (Meudec *et al.*, 2006) y/o la alteración de las poblaciones bacterianas (Maila *et al.*, 2006).

La contaminación que generan en suelos es dinámica, los componentes individuales pueden separarse de la mezcla original por evaporación de los compuestos orgánicos volátiles (COV's), solubilización, por absorción a la superficie de la fase sólida del suelo producto de reacciones químicas, o debido a fuerzas físicas, o por degradación de microorganismos presentes en el suelo (Gonzales Bellido, 2018).

Debido a las características de los suelos de la región patagónica, las precipitaciones escasas y las bajas temperaturas, sólo algunos de los procesos de degradación o transferencia entre suelo, aire y agua cobran mayor relevancia (Ríos & Nudelman, 2005). La volatilización, por ejemplo, es un proceso de transferencia de hidrocarburos que tiene importancia regional debido a los períodos de fuertes vientos característicos de la región. La movilidad de los componentes del petróleo depende de la permeabilidad del suelo y de la presencia de hidrocarburos livianos, generalmente más solubles y de baja viscosidad (Alvaro *et al.*, 2017).

Los hidrocarburos que se evaporan son los más livianos como las naftas, con densidades inferiores a 1, entre ellos los más volátiles son el butano, propano y el conjunto benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, llamados BTEX. A medida que ocurre la evaporación de los compuestos más volátiles, el petróleo va modificando su composición haciéndose más pesado y aumentando su densidad y viscosidad, perdiendo su solubilidad en agua.

La oxidación de los hidrocarburos en presencia de oxígeno molecular provoca una descomposición que aumenta su velocidad de degradación. Cuando ocurre la degradación o transformación del contaminante a productos metabólicos inocuos se trata de una biodegradación, y suele ser efectuada por hongos y bacterias existentes en el suelo. A diferencia de los demás procesos, la biodegradación permite la eliminación del petróleo del entorno (Brutti *et al.*, 2018).

Cuando el contaminante entra en contacto con el suelo, existen características que determinan su comportamiento, tales como el contenido de materia orgánica, la permeabilidad, profundidad del nivel freático, porosidad y tipo de suelo, y todas ellas se resumen a continuación en la *Figura 3.3.* (Mamani Cariapaza & Vargas Villalva, 2019).



Figura 3.3.: Transporte y distribución de contaminantes a través del suelo.

Al ocurrir un derrame de petróleo crudo, se produce una descarga de líquidos en fase no acuosa (NAPL), seguida de flujo por la superficie e infiltración hacia el subsuelo. Posteriormente, el crudo es evaporado y/o degradado biológica y químicamente. La infiltración ocurre en función de parámetros como la porosidad del suelo, donde una parte del contaminante es retenida en el material geológico, pero la mayor parte del volumen migra verticalmente gracias a la gravedad, y en algunas ocasiones alcanza el agua subterránea (Hernández *et al.*, 2015).

En la siguiente tabla (Loya del Angel, 2013) se presentan los parámetros que influyen en el transporte de los contaminantes a través del suelo.

Parámetros del contaminante	Parámetros del suelo	Parámetros ambientales
Solubilidad	Contenido y retención de agua	Temperatura
Presión de vapor	Profundidad, densidad y permeabilidad	Precipitación
Número y tipo de grupos funcionales	Contenido de arcilla	Evapotranspiración
Polaridad	Contenido de materia orgánica	
	Profundidad de agua subterránea	

Tabla 3.1.: Parámetros que influyen en el transporte de contaminantes en el suelo.

Cuanto mayor sea el tiempo de permanencia del petróleo en el medio ambiente, mayor será el cambio en su composición química (Brutti *et al.*, 2018), y más difícil será obtener resultados analíticos precisos que reflejen la identidad de la liberación original.

El modo de transporte y destino de los hidrocarburos está controlado por parámetros fisicoquímicos como la solubilidad, el coeficiente de partición octanol-agua (Kow), el coeficiente de distribución Kd, coeficiente de distribución aire-agua (Kaw) que depende de la constante de Henry, y la presión de vapor que a su vez están relacionadas con el peso molecular (Lexow *et al.*, 2016). El coeficiente de reparto carbono orgánico-agua (Koc) describe la afinidad de un compuesto orgánico a particionarse entre el agua y el carbono orgánico presente en el suelo (ATSDR, 1999).

Según afirma La Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, 1999), existe una clasificación para la movilidad, basado en el Koc que indica que los compuestos que tienen valores de Koc <50 L/kg, 50-150 L/kg, y 150-500 L/kg se consideran muy móviles, móviles y medianamente móviles, respectivamente. Utilizando este esquema, analizando los BTEX, el benceno (Koc = 60 L/kg) se clasifica como móvil; mientras que el tolueno, etilbenceno y xilenos totales (Koc = 182 L/kg, Koc = 363 L/kg, y Koc = 400 L/kg, respectivamente) se consideran de movilidad intermedia. Sin embargo, debido al bajo contenido en materia orgánica que caracteriza a los suelos de la región, este coeficiente no podría considerarse como aplicable.

Los suelos regionales se han desarrollado sobre las areniscas limo-arcillosas de la Formación Patagonia, y presentan un contenido de materia orgánica en el rango de 0.02 - 1 % p/p. En estos suelos, el coeficiente de distribución de los residuos de petróleo entre el agua y el suelo en condiciones de equilibrio (Kd) depende en gran medida de la fase acuosa iónica y de las características del suelo (Nudelman *et al.*, 2008).

La mayoría de los hidrocarburos que componen el petróleo, son relativamente insolubles en agua. Sin embargo, en el caso de los BTEX, se trata de hidrocarburos monoaromáticos de alta volatilidad y solubilidad en el agua (Cárdenas Sánchez, 2015).

En el caso de los HAP's, se encuentran presentes tanto en aire, suelo como en el agua, en diversas cantidades; algunos de ellos pueden ser contaminantes persistentes, particularmente en la matriz del suelo y sedimentos. Es por ello, que organismos internacionales tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) han regulado el control de estas sustancias en el medioambiente (Romaniuk *et al.*, 2018).

Cuando un derrame entra en contacto con el suelo, algunos de los hidrocarburos que contiene se adhieren a su superficie quedando inmobilizados, mientras que otros se evaporan rápidamente. Los que no se evaporan, suelen permanecer en el suelo durante mucho tiempo, ya que no se disuelven en agua y generalmente no se degradan (Romaniuk *et al.*, 2018).

Los hidrocarburos líquidos en fase no acuosa (LNAPL) pueden clasificarse en base a su densidad en DNAPL's si su densidad es mayor a la del agua, y LNAPL's a aquellos más livianos que el agua. Entre los LNAPL's están los hidrocarburos derivados del petróleo como la nafta, el diesel, los BTEX. Estos flotan sobre el nivel freático del acuífero; sus fases solubles se pueden apreciar en la *Figura 3.4.* (Huaiquilaf, 2008). Ante un derrame de estos compuestos, su movilidad y transporte está controlado por varios parámetros, principalmente la densidad, viscosidad, solubilidad, presión de vapor y volatilidad, así como también las propiedades del suelo en el que se propagan.

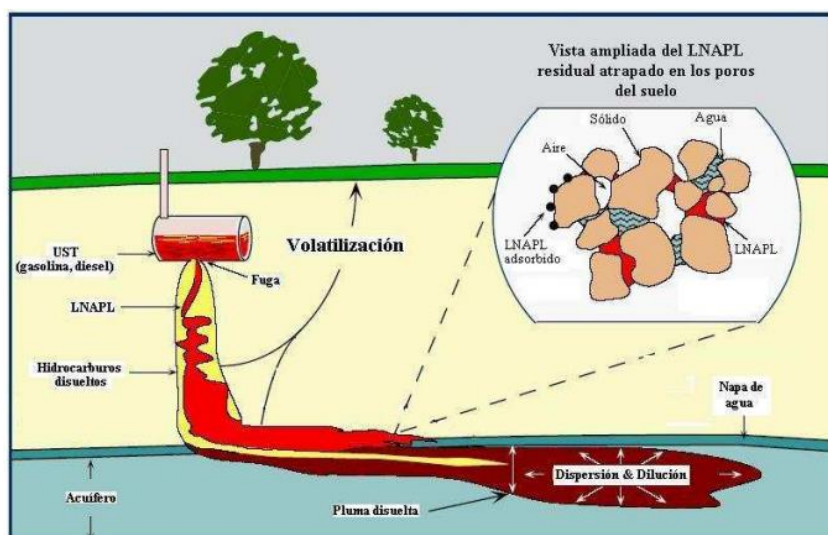


Figura 3.4.: Dispersión de LNAPL's a partir de una fuga de HC en suelo.

Cuando ocurre un derrame de LNAPL, a medida que avanza su infiltración en el suelo va quedando retenido dentro de los poros y fracturas, debido a las fuerzas capilares, lo que significa que una fracción del LNAPL quedará atrapado como LNAPL residual, mientras el LNAPL no atrapado y móvil puede continuar migrando. Mientras ello ocurre, se genera una pluma gaseosa conteniendo los compuestos volátiles del LNAPL residual y del LNAPL móvil que continúa avanzando en profundidad (Wanner *et al.*, 2019; Kacem *et al.*, 2019).

Los DNAPL's cuando son liberados al ambiente, también se propagan rápidamente en el suelo y sus diferentes capas por influencia de la gravedad.

Esta propagación y distribución residual de DNAPL's no es uniforme ni predecible en el subsuelo a causa de las imperceptibles variaciones en la distribución del tamaño de los poros, la textura, la mineralogía y estructura de este. La migración y destino de los contaminantes será diferente en la zona no saturada y saturada como puede observarse en la *Figura 3.5.* (Avilan Ayala, 2007) por la existencia en ésta última de contaminantes en fase sólida (adsorbida), y líquida inmisible (DNAPL libre).

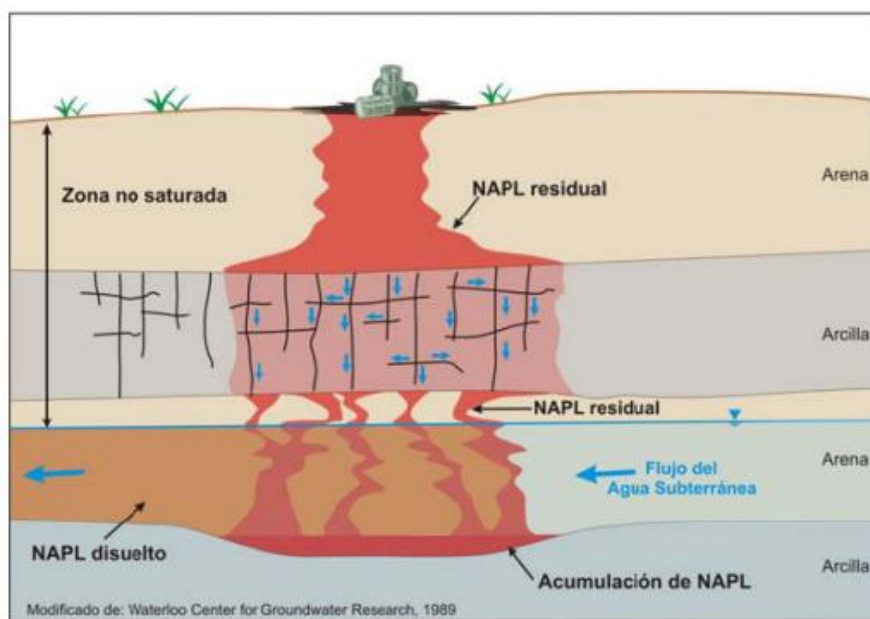


Figura 3.5.: Migración de un DNAPL.

Como consecuencia de estas liberaciones al medio ambiente, las comunidades vegetales se modifican tanto en estructura como en composición florística. Toda destrucción regresiva actúa produciendo pérdida de biomasa, de riqueza florística, de estructura, etc. Estos procesos van acompañados a su vez de pérdida de suelo, aumento del escurrimiento y disminución de la infiltración que hacen aún más difícil la supervivencia de las plantas. Se debe tener en cuenta qué vegetación y qué suelo constituyen una unidad, ya que, destruida la primera, la segunda sufre consecuencias que pueden llevar hasta su desaparición (Fortunato, 2018).

Es posible mediante el conocimiento del comportamiento de las especies ante su interacción con hidrocarburo (Fortunato, 2018), orientar a través de propuestas de implementación de ensayos fitotóxicos, la determinación de los procedimientos aplicables para ejecutarlos en suelos contaminados, y así evaluar el alcance del daño ambiental generado y el riesgo ambiental que implica.

Se presenta a continuación la *Tabla 3.2.*, donde se resumen los diferentes estados de ocurrencia de contaminación a causa de derrames de petróleo, y su capacidad de afectación a los diferentes compartimentos ambientales.

Es importante considerar, que la transferencia de los compuestos a los diferentes compartimentos depende también de la extensión de la superficie y el tiempo de contacto con el petróleo.

	Compartimento Suelo	Compartimento Agua	Compartimento Aire	Compartimento Biota
HC en estado sólido	HAP's de alto peso molecular Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), Asfaltenos	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) por adsorción sobre los sedimentos de un sistema acuático.	HAP's de bajo peso molecular	Contacto directo de HAP's con las raíces de plantas por presencia en los sedimentos del suelo (son muy persistentes). Contacto indirecto con organismos que consumen plantas en sitios de suelos contaminados.
HC en estado líquido	* LNAPL (nafta, diesel, BTEX). * DNAPL	* LNAPL (nafta, diesel, BTEX). * DNAPL	HAP's de alto peso molecular	Contacto directo con los organismos acuáticos cuando ingresa un derrame en un cuerpo de agua, y/o con la fracción disuelta como podría ser el caso de los BTEX (alta solubilidad en agua).
HC en estado gaseoso	Pueden estar ocluidos en el subsuelo.	BTEX, por su alta solubilidad en agua.	Hidrocarburos de bajo peso molecular, en estado gaseoso, a presión y temperatura ambiente, tales como butano, propano, metano, etano, BTEX.	Puede ocurrir en organismos acuáticos por contacto con la fracción disuelta en agua. En el caso de organismos terrestres, ocurre tanto por contacto directo como por vías respiratorias.

Tabla 3.2.: Componentes del petróleo y su ocurrencia en cada compartimento ambiental (adaptado y modificado de Pujana L., 2019).

4. Efectos

La explotación del petróleo ha originado un impacto negativo en el ambiente debido a derrames ocasionales del mismo y/o sus subproductos, modificando las propiedades físicas y químicas de los suelos, por lo que pueden verse favorecidos los procesos de salinización, fototoxicidad, y alteración en las comunidades microbianas, entre otros (Ríos & Nudelman, 2008).

Cuando los hidrocarburos se filtran, se produce una separación natural de los distintos constituyentes, permaneciendo los compuestos de alto peso molecular cerca de la fuente por tener menor movilidad, mientras que los más livianos migran hacia sectores más profundos del perfil por su mayor solubilidad en agua (Gutiérrez Ramírez, 2017).

Los principales efectos que causan en el suelo dependen del tipo de hidrocarburo derramado, el volumen del derrame, características físicas, químicas y microbiológicas del suelo, y los factores ambientales (humedad, temperatura, factores climatológicos); todas las variables en su conjunto definen el tamaño de la distribución de la contaminación en una zona específica (Gutiérrez Ramírez, 2017).

El tipo de suelo, tal como arenoso, limoso y arcilloso, y la cantidad de materia orgánica existente determina el destino del petróleo y la extensión del daño que puede generar en las plantas (Yu *et al.*, 2013).

Serrano Guzmán *et al.*, (2013) afirma: “la contaminación por hidrocarburos de petróleo ejerce efectos adversos sobre las plantas, generando minerales tóxicos en el suelo disponible para ser absorbidos, además, conduce a un deterioro de la estructura del suelo; pérdida del contenido de materia orgánica; y pérdida de nutrientes minerales del suelo, tales como potasio, sodio, sulfato, fosfato, y nitrato” de igual forma, el suelo se expone a la lixiviación y erosión.

4.1. Efectos sobre plantas

El petróleo y sus derivados pueden afectar la disponibilidad de agua, oxígeno y nutrientes en el suelo (Adenipekun *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2011). En consecuencia, estas sustancias pueden alterar la germinación de las semillas, el crecimiento y la producción de biomasa vegetal (Sharifi *et al.*, 2007).

En general, la presencia de hidrocarburos en el suelo interfiere negativamente en el desarrollo de las plantas, sin embargo, en algunas especies la germinación no se ve afectada por este tipo de contaminación. La misma puede incluso hasta aumentar el crecimiento y la producción de biomasa de algunas especies de plantas (Merkl *et al.*, 2004), esto ocurre porque el estrés que causa este contaminante puede estimular la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento (Nogueira *et al.*, 2011).

Las especies vegetales presentan diferente sensibilidad frente a la contaminación por tóxicos debido a sus diferentes características biológicas, fisiología, morfología, estructura, hábitat y rol ecológico, además de la variación asociada a las diferentes vías de exposición (contacto directo, a través del agua o suelo) (Mohan & Hosetti, 1999). En las plantas, altera el crecimiento y reproducción (Plaza *et al.*, 2005).

En el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), estos se acumulan en los tejidos lipídicos de las plantas, pero no tienden a acumularse en los tejidos vegetales con un alto contenido de agua, por lo que se trata de una transferencia limitada del suelo a las hortalizas de raíz (Abdel-Shafy & Mansour, 2016).

Los crudos livianos contienen mayor proporción de componentes volátiles, capaces de entrar fácilmente a través de las paredes celulares de las plantas y afectar las membranas celulares (Pezeshki *et al.*, 2000). La toxicidad en general aumenta a medida que disminuye su peso molecular (Velásquez Arias, 2017).

Las pequeñas moléculas de hidrocarburos tienen mayor capacidad de penetrar en la semilla, y pueden ser tóxicas para el embrión y afectar su germinación (Hernández-Valencia *et al.*, 2017). La germinación y el crecimiento inicial son etapas claves para el establecimiento de una planta en una comunidad vegetal. Debido al efecto fitotóxico de los hidrocarburos, no cualquier especie puede germinar y crecer en su presencia (Pettenello y Feldman, 2012).

Pernía *et al.*, (2018) observaron que los HAP's que más afectan el crecimiento de las plantas son aquellos que presentan menos de tres anillos aromáticos por ser más volátiles, solubles en agua y de bajo peso molecular. En cambio, los de mayor peso molecular, que poseen de tres a cinco anillos aromáticos, son menos fitotóxicos.

Mediante ensayos de fitotoxicidad con la especie *Lactuca Sativa*, Pernía y Col. (2018) demostraron que a altas concentraciones de hidrocarburos el crecimiento del hipocótilo fue el parámetro más afectado, lo que sugiere la importancia de utilizar un índice de toxicidad modificado que considere el crecimiento de este segmento. El orden de toxicidad que obtuvieron de los hidrocarburos según el índice propuesto IIF fue el siguiente: naftaleno (100) > fenantreno (65) > pireno (64) > aromáticos (27) > CEP (7) > saturados (1).

En nuestra región patagónica, existen estudios previos donde se ha evaluado la toxicidad de derrames de petróleo en suelos, como ocurre con la especie *Grindella chiloensis* (botón de oro) (Ríos & Nudelman, 2008), donde se encontraron valores de EC₅₀, respecto a la etapa de germinación o más precisamente de emergencia de la planta, del orden del 10% p/p y de 18 mg L⁻¹, para contacto directo con la matriz mineral y con extracto acuoso, respectivamente.

Por otro lado, Barquín *et al.*, (2011) contemplan que es necesario considerar para la región patagónica, además de HTP, el contenido de sales del suelo ya que dicho factor afecta los ensayos biológicos, con lo que se podrá reforzar los criterios de selección, seguimiento y determinación del punto de final de una remediación, basado fundamentalmente en criterios ecotóxicos y no simplemente químicos. Además, afirman que la especie *Atriplex lampa* podría ser adecuada como una especie fitoindicadora de la toxicidad del petróleo en estos tipos de suelo, por la buena correlación que se llevó a cabo entre esta especie y la lechuga (*Lactuca sativa*), siendo esta última una especie reconocida por su sensibilidad al estrés tóxico producido por los contaminantes ambientales.

El bioensayo realizado con esta planta está avalado internacionalmente por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) y la USEPA (Pernía *et al.*, 2018).

La estandarización de los bioensayos permitiría contar con una valiosa herramienta para complementar la evaluación de los HTP.

4.2. Efectos sobre la salud humana

Los hidrocarburos presentes en el crudo tienen una conocida toxicidad para el ser humano, pero, de la mayoría de ellos se desconoce el grado de peligrosidad (Varjani, 2017). Entre estos compuestos destacan por sus efectos en la salud los hidrocarburos aromáticos simples y los HAP's (López *et al.*, 2016). Dependiendo de la composición del crudo, estos pueden encontrarse en mayor o menor cantidad.

Las vías de ingreso de los hidrocarburos al cuerpo humano pueden ser por vía respiratoria y por contacto directo. Luego son ampliamente distribuidos por la sangre y se transforman rápidamente en compuestos químicos, pudiendo resultar más dañinos, así como menos peligrosos, esto en función de factores como el tipo, composición y la cantidad expuesta de hidrocarburos; la mayoría abandonan el cuerpo a través de la orina o con el aire exhalado.

La *Tabla 4.1.* muestra los órganos afectados en la intoxicación por hidrocarburos de acuerdo con la vía de ingreso y las afecciones que causa.

Vía de ingreso	Organos afectados	Causan
Aspiración	Aparato respiratorio	Lesión directa de los capilares y el tejido pulmonar, vértigo, somnolencia, vómitos, pérdida del conocimiento.
	Aparato respiratorio	Tos, ahogo, sibilancias y ronqueras.
Ingesta	Aparato gastrointestinal	Irritación, vómitos, náuseas, diarrea, eructos y flatulencia, dolor abdominal, sensación de quemazón, shock o colapso.
	Sistema nervioso	Letargia, aturdimiento estupor y coma.
Contacto	Piel	Absorción, enrojecimiento, irritación y picazón, quemaduras cutáneas, riesgo de cáncer de piel.
	Ojos	Irritación de los ojos, enrojecimiento, dolor, quemaduras profundas graves.

Tabla 4.1.: Intoxicación por hidrocarburos de acuerdo con las vías de ingreso en el ser humano.

4.3. Efectos sobre animales

La contaminación por hidrocarburos afecta a los animales desde los mamíferos, aves, peces, las almejas, los moluscos e insectos y se produce destrucción de los hábitats, de especies endémicas, pérdida de la diversidad de las comunidades faunísticas que habitan cerca de lugares contaminados con hidrocarburos (Velásquez Arias, 2017).

En cuerpos de agua superficiales los hidrocarburos tienden a flotar debido a la diferencia de densidad que presentan con respecto al agua; por este motivo bloquean la penetración de la luz y el intercambio de gases, favoreciendo así la solubilización de materiales que afectan a las distintas poblaciones como el plancton o los microinvertebrados que viven en el fondo de ríos y pantanos (Adams *et al.*, 2008).

Como se menciona en apartados anteriores, el impacto de la industria petrolera sobre el ambiente tiene incidencia en las diversas fases de la actividad. Estos efectos se prolongan en el tiempo ya que los procesos de recuperación de los ambientes suelen ser muy lentos, en función de las características desérticas de la región, sumado a procesos de erosión hídrica, la salinización / alcalinización y el deslizamiento de suelos que no sólo afectan el desarrollo de actividades productivas, sino que impactan sobre el ejido urbano de los núcleos de población, así como sus infraestructuras.

Dado que no es posible establecer patrones generales de respuesta frente a una muestra ambiental o compuesto determinado, y que los efectos fitotóxicos no pueden extrapolarse a partir de la respuesta evaluada en organismos animales, es importante la aplicación de ensayos en los que se consideren, además de especies animales y microalgas, bioensayos estandarizados con plantas vasculares (Sobrero, 2010), para disponer de una herramienta adicional a la hora de evaluar suelos empetrolados en complemento con la determinación de HTP.

5. Legislación

Las bases para el desarrollo de una legislación ambiental moderna fueron impulsadas por las Conferencias de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente realizadas en 1972 y 1992, en el informe del Programa de las Naciones Unidas para el Ambiente (PNUMA 1972): a) primero, se establece el deber del Estado de proteger el medio ambiente; b) luego, este deber se extiende a la sociedad en su conjunto y se autorizan restricciones al ejercicio de los derechos fundamentales; c) al mismo tiempo, se comienza a incorporar el derecho a un medio ambiente apropiado junto con los demás derechos fundamentales y a garantizar el ejercicio de este derecho; d) más tarde, se inicia el establecimiento de la vinculación que existe entre el medio ambiente y el desarrollo, prescribiéndose que la economía debe orientarse hacia un modelo de desarrollo sustentable; y e) finalmente, se establecen ciertas bases constitucionales en temas específicos para ser desarrolladas por la legislación ambiental.

La Constitución Nacional dispone en su artículo 41: "todos los habitantes gozan del derecho a un ambiente sano, equilibrado, apto para el desarrollo humano y para que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes sin comprometer las de las generaciones futuras". Establece que "el daño ambiental generará prioritariamente la obligación de recomponer, según lo establezca la ley." Es así que todo daño ambiental debe ser reparado, cualquiera sea su naturaleza. La reparación comprende, de manera prioritaria, la obligación de restablecer las cosas al estado en que estaban antes de la generación del daño, si ello fuera posible; además de la obligación de indemnizar los daños y perjuicios causados, incluidos aquellos que no queden cubiertos por la recomposición que se haga del daño.

La Constitución Nacional dispone en su artículo 43 que: "Toda persona puede interponer acción expedita y rápida de amparo, siempre que no exista otro medio judicial más idóneo, contra todo acto u omisión de autoridades públicas o de particulares, que en forma actual o inminente lesione, restrinja, altere o amenace, con arbitrariedad o ilegalidad manifiesta, derechos o garantías reconocidos por esta Constitución, Podrán interponer esta acción en lo relativo a los derechos que protegen al ambiente, el afectado, el defensor del pueblo y las asociaciones que propendan a esos fines".

Durante La Reforma Constitucional de 1994 trajo consigo la incorporación de normas provinciales "complementarias" a los estándares mínimos que el Congreso de la Nación establece para todo el territorio nacional. Se introducen las llamadas "normas de presupuestos mínimos de protección ambiental" como una nueva categoría legislativa por el constituyente reformador.

En lo que a la materia ambiental respecta, se encuentra en el tercer párrafo del artículo 41, que expresa: "Corresponde a la Nación dictar normas que contengan los presupuestos mínimos de protección, y a las provincias, las necesarias para complementarlas, sin que aquéllas alteren las jurisdicciones locales". La Constitución Nacional también prescribe que la competencia nacional tiene jerarquía superior a la provincial, por lo que se considera suprema (Stinco, 2018)

La Constitución Nacional adhiere a un “federalismo de concertación” entre la Nación y las provincias, en el cual la Nación fija las bases-contenidos mínimos- y luego las provincias las complementan con leyes locales reglamentarias, que atienden las particularidades provinciales de la protección ambiental. En todos los casos deben ser las Legislaturas de cada provincia las encargadas de dictar las leyes complementarias (López Alfonsín, 2017).

Actualmente, las normativas se fijan tomando en cuenta las principales características de los compuestos químicos que las hacen peligrosas para el ambiente, su toxicidad, su persistencia en el ambiente y su potencial de bioacumulación (Planes & Fuchs, 2015).

En la legislación de varios países como Estados Unidos, Canadá y los de la Comunidad Europea, entre otros, se han incluido los ensayos con organismos vivos para cuantificar el grado de toxicidad de efluentes industriales, aguas residuales y/o residuos sólidos, para determinar los límites de descarga y los efectos tóxicos sobre la biota (Planes & Fuchs, 2015; Echeverry & Pinilla, 2007). Sin embargo, aún no se encuentra regulada su aplicación en suelos contaminados con hidrocarburos.

A continuación, se recopila la Legislación vigente Nacional, Provincial y Municipal en lo que respecta a la actividad hidrocarburífera y contaminación de suelos, detallando: norma, tema, breve descripción y autoridad de aplicación

5.1. Legislación Nacional

Norma	Tema	Descripción	Autoridad de aplicación
CONSTITUCIÓN NACIONAL		<p><i>Art 41.</i> Todos los habitantes gozan del derecho a un ambiente sano, equilibrado, apto para el desarrollo humano y para que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes sin comprometer las de las generaciones futuras; y tienen el deber de preservarlo. El daño ambiental generará prioritariamente la obligación de recomponer, según lo establezca la ley. Corresponde a la Nación dictar las normas que contengan los presupuestos mínimos de protección, y a las provincias, las necesarias para complementarlas, sin que aquéllas alteren las jurisdicciones locales.</p> <p><i>Art 43.</i> Toda persona puede interponer acción expedita y rápida de amparo, siempre que no exista otro medio judicial más idóneo, contra todo acto u omisión de autoridades públicas o de particulares, que en forma actual o inminente lesione, restrinja, altere o amenace, con arbitrariedad o ilegalidad manifiesta, derechos y garantías reconocidos por esta Constitución, un tratado o una ley.</p>	
Ley N° 24.051/92 y Decreto 831/93	Residuos Peligrosos	<p>Residuos peligrosos. Generación, manipulación, transporte y tratamiento.</p> <p>Decreto Reglamentario N°831/93, se definen:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anexo II, Tabla 9 “Niveles guía de calidad de suelos”. - Anexo IV, identifica un residuo como peligroso en base a características de riesgo, como por ejemplo si cumple con la característica de TOXICIDAD: identifica aquellos residuos o sus productos metabólicos que poseen la capacidad provocar por acción química o químico-física un daño en la salud, funcional u orgánico, reversible o irreversible, luego de estar en contacto con la piel o mucosas o de haber penetrado en el organismo por cualquier vía. Las determinaciones de toxicidad se pueden subdividir en Toxicidad humana y en Ecotoxicidad 	Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable.
Resolución 619/98	Residuos Peligrosos	Los generadores y/u operadores de residuos peligrosos, sin perjuicio de sus responsabilidades sobre la disposición final de los residuos tratados y los establecimientos alcanzados por los Decretos Nros. 674/89, 776/92 y 999/92 que empleen productos de origen microbiano para el tratamiento total o parcial de afluentes, deberán utilizar productos con certificados oficiales de ecotoxicidad neutra o con Informe técnico de evaluación ecotoxicológica	Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable
Resolución SAyDS 897/02	Residuos Peligrosos	Gestión de residuos contaminados.	Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable
Resolución SAyDS 830/08	Residuos Peligrosos	Modificación de la resolución 897/02 con relación a la categoría sometida a control Y 48.	Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable
Ley N°22.428/81 y Decreto 681/81	Suelos	Declara de interés general la acción pública y privada tendiente a la conservación y recuperación de la capacidad productiva de suelos. Destinada a prevenir y controlar la degradación de las tierras, provocada por la acción del hombre y manifestada por la aparición de la erosión, la salinización y alcalinización en áreas de riego y la desertización en regiones áridas y semiáridas.	Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca

Resolución 341/93	Hidrocarburos	Establece cronograma y normas, a las empresas operadoras, para el reacondicionamiento de piletas y la restauración de suelos. Se distinguen cuatro tipos de piletas según el uso que se les haya dado y el grado de exposición al riesgo de recursos naturales. Para cada tipo de pileta se fija un plazo para adecuar las de uso habitual y para eliminar las piletas o con sus usos prohibidos. En los casos de los suelos contaminados por operaciones incorrectas que no presenten riesgos de afectar los recursos naturales fija plazo para su restauración.	Secretaría de Energía de la Nación
Ley 17.319	Hidrocarburos	Resolución SE 252/93: Las empresas operadoras de áreas de exploración y explotación, en función de los Estudios Ambientales, deben presentar Planes de Contingencia que evalúen los daños potenciales, detallen las medidas preventivas y la organización de respuesta prevista, así como los medios de control a proveer. En complemento la Resolución SE 25/04 estipula las Normas para la Presentación de los Estudios Ambientales Correspondientes a los Permisos de Exploración y Concesiones de Explotación de Hidrocarburos", descriptas en el Anexo I que forma parte integrante de la presente resolución. Las referidas normas serán de aplicación tanto para los estudios ambientales correspondientes a las nuevas obras, trabajos e instalaciones, como asimismo para las que se hallen en ejecución o ya se hayan ejecutado, en relación con los informes que deban presentarse a partir de la fecha de entrada en vigencia de la presente resolución.	Secretaría de Energía de la Nación
Resolución SE 24/04	Hidrocarburos	Incidentes ambientales.	Secretaría de Energía de la Nación

5.2. Legislación Provincial

Norma	Tema	Descripción	Autoridad de aplicación
Constitución Provincial		Capítulo VI "Medio Ambiente". Toda persona tiene derecho a un medio ambiente sano que asegure la dignidad de su vida y su bienestar y el deber de su conservación en defensa del interés común. Dicta legislación destinada a prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental, impone las sanciones correspondientes y exige la reparación de los daños.	
Decreto 1003/16	Sistema ambiental	Modifica los Artículos 9°, 12°, 15°, 17°, 27°, 30°, 34°, 35°, 36°, 45°, 52°, 53° y 54° del Anexo I del Decreto N° 185/09 , y deroga en un todo el Decreto Provincial N° 1476/11 .	MAYCDS
Decreto 1540/16	Sistema ambiental	Reglamentación parcial de la Ley XIN°35 "Código Ambiental de la Provincia del Chubut"	MAYCDS
Decreto 1005/16	Residuo Petrolero	Considera todo material sólido afectado por hidrocarburo que supere los valores umbral para la remediación de suelos o sedimentos contaminados establecidos en el Anexo I, tabla N°1 del presente decreto, como resultado de derrames en suelo o agua dentro de yacimientos continentales.	MAYCDS

Ley XVII N° 9	Suelos	(Antes Ley 1119, 1974) Conservación de los suelos. Declara de interés público en todo el territorio de la Provincia de Chubut la conservación del suelo, entendiéndose por tal el uso racional del mismo con miras al mantenimiento y/o mejoramiento de su capacidad productiva.	MAyCDS
Decreto 439/80	Suelos	Reglamenta la Ley XVII N° 9 .	MAyCDS
Ley N° 1921	Suelos	Adhiere a la Provincia a la Ley Nacional N° 22.428 de conservación de los suelos.	MAyCDS
Res. 3/2008	Hidrocarburos	Las empresas que realicen perforaciones de pozos para la extracción de petróleo y/o gas o ambos en conjunto en el ámbito de la Provincia del Chubut, deberán adoptar un sistema cerrado de procesamiento de fluidos que utilice el concepto de “locación seca”.	MAyCDS
Res. 1/2008	Hidrocarburos	Las empresas operadoras de las áreas hidrocarburíferas y gas, y las que cumplen servicios en las etapas de exploración, perforación, workover y pulling de pozos deberán proteger el suelo con mantas orgánicas oleofílicas colocándolas en la explanación donde se ubiquen los equipos, subestructuras y accesorios, o aplicar otro sistema superior previamente autorizado por la Autoridad de Aplicación, para la prevención de los derrames que pudieran suceder en este tipo de operaciones.	SHM
Ley XI N° 35 (antes Ley 5439/06)	Residuos peligrosos	Adhiere a los términos de la Ley N° 24.051 que regula la generación, manipulación, transporte y disposición final de residuos peligrosos. Disposición DPGA 95/02 adhiere a la Res. SA y DS 897/02 que incorpora al Anexo I de la Ley 24051 la categoría Y48.	MAyCDS
Decreto 1151/15	Hidrocarburos	Actividad Hidrocarburífera. Incidentes ambientales. Procesos, operaciones, o actividades desarrolladas dentro de las tareas de exploración, explotación, perforación, producción, transporte y almacenaje de hidrocarburos. Procedimiento a seguir.	PEP

5.3. Legislación Municipal

Norma	Tema	Descripción	Autoridad de aplicación
-------	------	-------------	-------------------------

Carta Orgánica		Art 31. El Municipio procura para los vecinos un ambiente sano y equilibrado que asegure la satisfacción de las necesidades presentes, sin comprometer las de generaciones futuras. Instrumenta un proceso de ordenamiento territorial y ambiental participativo y permanente que propende a proteger el ecosistema humano, natural y biológico, y en especial el aire, el agua, el suelo y el subsuelo; eliminar o evitar todos los elementos contaminantes no aceptables que puedan afectarlo. El daño ambiental genera prioritariamente la obligación de recomponer según lo establezca la legislación.	
Ordenanza 8095/04	Sistema Ambiental	Se sanciona en desarrollo de la competencia del Municipio de Comodoro Rivadavia en materia ambiental, conforme con las previsiones de la Constitución de la Nación Argentina, la Constitución de la Provincia del Chubut y la Carta Orgánica Municipal. Tiene por objeto la preservación, conservación, defensa y mejoramiento del ambiente del Municipio de Comodoro Rivadavia, incluida la Zona Franca y los lugares y establecimientos de utilidad nacional mediante el establecimiento de las normas que, en el ámbito de la autonomía municipal, configuran el sistema de defensa, protección, conservación y restauración, en su caso, del ambiente en la jurisdicción municipal y aseguran una utilización racional de los recursos naturales.	Subsecretaría de Ambiente
Ordenanza 13.190/17	Hidrocarburos	Regular el procedimiento de constatación, control y gestión de los incidentes ambientales que den lugar a derrames de hidrocarburos, aguas de producción, aguas de inyección y/o cualquier otra sustancia involucrada en los procesos de explotación de hidrocarburos en yacimientos del Ejido Municipal.	Consejo Deliberante
Ordenanza N° 7002/00	Residuos Peligrosos	Establece las condiciones para el registro de generadores y operadores de residuos peligrosos.	Subsecretaría de Ambiente
Ordenanza N° 7283/00	Residuos Peligrosos	La generación, manipulación, transporte, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos quedaran sujetos a las disposiciones de la presente ordenanza, cuando se tratare de residuos generados o ubicados en lugares sometidos a jurisdicción MUNICIPAL.	Subsecretaría de Ambiente

En cuanto al Marco Legal para metodologías analíticas de HTP, la regulación en la provincia del Chubut, en su **Decreto Reglamentario N°1005/16** indica valores umbrales para considerar luego de un derrame en suelo o agua, a un suelo o sedimento como residuo petrolero. Estos límites están establecidos en la *tabla N°1 del Anexo I* del mencionado Decreto. También implica aquel resultante de la limpieza o saneamiento de hallazgos ambientales y/o pasivos ambientales; generados en forma eventual, no programada o accidental, en los procesos, operaciones o actividades desarrolladas dentro de las tareas de exploración, explotación, producción, transporte y almacenaje de hidrocarburos; y aquellos sólidos y semisólidos generados en forma habitual como resultado de las tareas de terminación e intervención de pozos; y que no se encuentre

expresamente incluido dentro de las categorías de control establecidas en el Anexo I de la Ley Nacional N°24.051/92.

Tanto en Chubut como en la provincia aledaña Santa Cruz, existen decretos que definen la metodología que se debe utilizar para la detección de HTP, en los cuales a su vez se encuentran detallados los límites permitidos para el control de sitios contaminados. En cuanto a la legislación sobre evaluaciones ecotoxicológicas, se consideran bioensayos de toxicidad, ya sea para el control ambiental o en la certificación de productos nuevos.

La Ley Nacional N° 24.051/92 de residuos peligrosos y su **Decreto Reglamentario 831/93** establece en su Anexo IV que entre las características de riesgo que permiten identificar a un residuo como peligroso se debe considerar la toxicidad humana, ecotoxicidad, teratogenicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad de este. La **Resolución 619/98** de esta misma ley, reglamenta la habilitación del uso de productos biológicos en el tratamiento de residuos peligrosos, estableciendo los ensayos de toxicidad (alga-crustáceo-pezo) necesarios para certificar que dichos productos no son ecotóxicos. Sin embargo, para el caso de la provincia del Chubut, hay una clara falta de legislación respecto a los tipos de bioensayos o metodologías que se pueden aplicar, y no se encuentran establecidos criterios o niveles guía para la evaluación del riesgo ecotoxicológico.

Implementar el uso de ensayos fitotóxicos, permite identificar las sustancias tóxicas y las concentraciones potencialmente dañinas de las mismas, pero al conocer esto es necesario limitar mediante regulaciones la cantidad de estas sustancias presentes en el ambiente (Planes & Fuchs, 2015), en este caso, debiera ser aplicable a los suelos contaminados por hidrocarburo.

Ante la falta de una regulación que incluya los bioensayos específicamente en suelos empetrolados, este trabajo aporta información de base que permitiría establecer los niveles de toxicidad del suelo luego de efectuadas tareas de remediación en un determinado sitio contaminado.

De esta manera, el enfoque de una remediación no sería únicamente en base a los límites de las concentraciones de los contaminantes provenientes de fugas o derrames de hidrocarburo, sino que también aportaría información respecto de la toxicidad presente en los suelos afectados luego de efectuada la misma.

6. Metodologías analíticas

Cuando se va a realizar un estudio ambiental de un sitio que ha sufrido contaminación con petróleo, generalmente se procede a la obtención de muestras de suelo, seguida de la extracción, fraccionamiento y cuantificación mediante diferentes métodos analíticos y/o espectroscópicos de los hidrocarburos. De esta manera se logra caracterizar al sitio contaminado desde el punto de vista químico, considerándose estos resultados en las evaluaciones de riesgo ambiental, para establecer criterios de punto final de una remediación (Salinas-Martínez *et al.*, 2008).

Esta caracterización no resulta ser completa, ya que cualquier sustancia expuesta en el ambiente es capaz de modificar su comportamiento debido a la interacción con el suelo, el agua, el aire y con los componentes bióticos del mismo. Esto podría ocasionar una sub o sobre estimación del daño o riesgo real (Fernández *et al.*, 2005) al no considerar a los subproductos de su degradación química o biológica, los cuales podrían ser aún más tóxicos que el contaminante primario, según el caso, también podría implicar una sobrestimación del riesgo ya que no todo el petróleo sorbido en un suelo se encuentra igualmente biodisponible, hecho que se hace más importante a medida que pasa el tiempo de contacto (Salomón, 2020).

Como los datos químicos no son suficientes para evaluar los efectos tóxicos de los contaminantes sobre el medio ambiente, por no tomar en cuenta las interacciones que pueden existir entre ellos, se debieran complementar métodos químicos con biológicos y toxicológicos para poder estimar el riesgo que implicaría la presencia del petróleo en el suelo (Leitgib *et al.*, 2007).

Por ejemplo, para evidenciar la eficacia de los procesos de biorremediación, en la mayoría de los casos se realizan evaluaciones basadas sólo en análisis químicos de reducción en la concentración de contaminantes. No se toma en cuenta la posible transformación de los químicos en compuestos más tóxicos, con lo cual se subestima el verdadero riesgo ambiental (Plaza *et al.*, 2005). En algunos casos este tipo de estudios subestima los posibles daños, al no considerar la biodisponibilidad de los contaminantes. Por ello, se ha propuesto la realización de bioensayos que permitan integrar la información de la presencia de contaminantes, su biodisponibilidad y los posibles efectos tóxicos sobre los organismos vivos (Pernía *et al.*, 2018).

Una de las especies más estudiadas en ensayos de toxicidad ha sido *Lactuca sativa* L. (lechuga), ya que es una planta de crecimiento rápido, de pequeño tamaño, fácil de mantener en el laboratorio y de bajo costo.

En el caso de los hidrocarburos, se ha seleccionado trabajar con *L. sativa* debido a las siguientes evidencias: el bioensayo con esta planta está avalado internacionalmente por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) y la USEPA (Wang & Freemark, 1995).

Los análisis ecotoxicológicos se recomiendan para estimar el riesgo para los receptores ecológicos asociados con contaminantes en el suelo (Fernández *et al.*, 2005) y se consideran una herramienta eficaz de diagnóstico, adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba, bajo condiciones experimentales específicas y controladas; incluyendo los hidrocarburos.

Plaza y colaboradores (2005) pudieron determinar que para la realización de un monitoreo de suelos contaminados con crudos, efectuado al concluir un proceso de bioremediación, la realización de bioensayos es indicador de la toxicidad del suelo pero que específicamente, aquel realizado con la especie de planta superior *Lactuca Sativa* a comparación de utilizar otros bioindicadores, demuestra que esta especie es más sensible y eficiente cuando se trata de evaluar la toxicidad de un suelo asociado a contaminación con hidrocarburo. Su afirmación se debe al hallazgo enfocado en el alargamiento de la raíz a modo de indicador de la toxicidad del suelo estudiado.

Es por ello por lo que, si se tiene la posibilidad de desarrollar bioensayos de toxicidad con especies autóctonas, se podría tener una mejor aproximación del efecto que causa 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 mono-específicos que reproduzcan, en el laboratorio, las condiciones del ambiente en estudio (Menone *et al.*, 2021).

La concentración inicial de hidrocarburos presentes en muestras de un determinado sitio será de importancia junto con los análisis de toxicidad en la caracterización inicial y los monitoreos posteriores, y en el caso de aplicada una técnica de remediación, indicarán si cumple con las exigencias de saneamiento. Entonces, los criterios para bioensayos de ecotoxicidad son relevantes para estimar los impactos de los hidrocarburos de petróleo y para la evaluación de riesgos (Plaza *et al.*, 2015), y también como parámetro post-remediación del sitio afectado.

6.1. Muestreo de suelo

Se puede definir como muestra a aquella porción de material lo suficientemente pequeña en volumen y peso para ser transportada y manipulada de forma conveniente en el laboratorio, pero que mantiene todas las características del material del que se ha tomado.

La confiabilidad de los resultados obtenidos, sin perjuicio de la idoneidad del laboratorio de suelos, depende en gran medida de que la muestra sea representativa del sitio a caracterizar. Para ello se deben considerar los siguientes aspectos 1) delimitación de áreas homogéneas de muestreo, 2) elementos y materiales a utilizar para la toma de muestras, 3) tipo de muestra, 4) extracción de las muestras/submuestras, 5) acondicionamiento, conservación y transporte de la muestra e 6) identificación de la muestra (Red de Buenas Prácticas Agropecuarias, 2021).

La técnica del muestreo a aplicar depende, entre otros, del objetivo del estudio, de las condiciones edáficas, meteorológicas, geológicas e hidrogeológicas en el sitio, la profundidad y accesibilidad de la contaminación en estudio y de los requerimientos analíticos acerca de la cantidad y calidad de las muestras. Para muestreos superficiales de suelo (hasta 1 m de profundidad) se pueden aplicar sondeos manuales. Se recomienda en particular la toma de muestras superficiales compuestas para la evaluación de riesgos a la salud humana (en caso de contacto directo) o para la flora y fauna. En estos casos se recomienda un muestreo bidimensional, es decir, la toma de sub-muestras (10–25 unidades) en un área y una capa determinada y unir las sub-muestras individuales en una muestra compuesta.

Para la toma de muestras de suelo en profundidad, la profundidad del muestreo dependerá del tipo de suelo y contaminante a estudiar, y debe ser debidamente justificado, siendo necesario el muestreo a lo largo de la perforación, incluyendo su documentación geológica. En casos de perforaciones a diferentes profundidades, las muestras deben ser tomadas por cada metro de profundidad que se perfore, considerando la estratigrafía local. Se recomienda evitar el uso de fluidos de perforación y la utilización de equipos y recipientes para las muestras, que ocasionen la pérdida de hidrocarburos volátiles y la contaminación cruzada.

En la provincia del Chubut, al ocurrir un evento contingente asociado a derrames de petróleo en suelos, la Autoridad de Aplicación solicita la toma de muestras en el sitio afectado. Estos muestreos deben ser georreferenciados y se debe llevar su correspondiente registro fotográfico.

En la *Tabla 6.1.* se presentan los parámetros que debieran monitorearse en caso de contingencias, así como los métodos analíticos aplicados según la legislación vigente en la provincia del Chubut, los cuales serán descriptos en apartados posteriores.

Parámetros	Unidad	Método de Análisis	Referencia
HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP)	mg/kg MS	Metodo TNRCC 1005	Anexo I, Tabla I del Decreto N° 1005/16 (10.000 mg/kg)
CONDUCTIVIDAD (in situ)	µS/cm	Conductividad (SM 2510 B)	---

Tabla 6.1.: Parámetros a medir con su correspondiente técnica analítica según legislación de la Provincia del Chubut.

La legislación provincial establece que en el caso de registrarse concentraciones de HTP mayores a las estipuladas por el Anexo I, Tabla I 'Valores umbral para la remediación de suelos o sedimentos contaminados, definidos como residuos petroleros' del Decreto N° 1005/16, se saneará el área y se repetirá el muestreo para corroborar la efectividad de las tareas.

6.2. Análisis del petróleo

Es importante destacar que el petróleo es una mezcla compleja que contiene principalmente hidrocarburos, la naturaleza química de los mismos va a depender del origen y del tiempo de permanencia en el ambiente, con el cual interactúa y modifica su composición química (Ríos & Nudelman, 2008).

Por este motivo a la hora de realizar un análisis químico, lo que se analiza no son componentes individuales, sino que se determina como HTP (Hidrocarburos Totales del Petróleo). Existen diversos métodos para hacer esta determinación, y cada uno de ellos proporciona diferente tipo de información, por lo cual en base al uso que se les dará a los resultados obtenidos, se deberá escoger la técnica correcta. Es aquí donde surge la utilidad de la implementación de bioensayos para complementar estos tipos de análisis.

Los HAP forman parte de la mezcla compleja llamada HTP y la toxicidad no solo es función de la concentración total en suelos, sino de su biodisponibilidad, la cual depende de características tales como el tipo de hidrocarburo, tipo de suelo, y de las posibles interacciones (“weathering”) que aquellos pueden sufrir en el ambiente (Leitgib *et al.*, 2007).

Barquín *et al.*, (2011) mencionan que el valor de HTP no indica necesariamente que la muestra es tóxica y la toxicidad de una muestra no siempre indica un elevado contenido de HTP. Debido a esto la principal ventaja de los bioensayos es la de favorecer el contacto directo, a través de la interacción suelo-organismo de prueba, de manera que la movilidad, la biodisponibilidad de los contaminantes y las características del suelo se incluyen en el resultado, logrando evaluar la toxicidad de todos los constituyentes en una mezcla compleja considerando el total de efectos aditivos, sinérgicos y antagónicos (Maila & Cloete, 2005).

A continuación, se describen las técnicas más utilizadas a nivel nacional para la medición de HTP con fines ambientales.

6.3. Detección de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) (Cantero *et al.*, 2005).

6.3.1. Determinación de HTP por Cromatografía Gaseosa

Los métodos basados en cromatografía gaseosa (GC), definidos para cualquier solvente extractante o purga de gases y detectables por cromatografía de ionización de llama, GC/FID, permiten obtener un rango específico de carbonos. La mayor ventaja del método es la de proporcionar información sobre el tipo de petróleo presente en la muestra, además de medir su concentración. La identificación de los componentes no siempre está disponible directamente, sin embargo, para ello se requiere un analista experto de los productos del petróleo. Los límites de detección del método dependen de la matriz de la muestra, para suelos es de 10 mg/Kg.

Es una técnica adecuada para separar mezclas. Una mezcla de compuestos químicos es separada en sus componentes individuales, al atravesar una columna cromatográfica. La separación se produce por una combinación de factores, incluidos el punto de ebullición, polaridad y afinidad diferenciada sobre los diferentes componentes de la muestra. El tiempo de retención en la columna cromatográfica es característico de cada componente bajo diferentes condiciones o parámetros experimentales y de la especificidad de la columna. Así los diferentes componentes eluyen de la columna en distintos tiempos para ser detectados en un detector de ionización de llama. La señal del detector es proporcional a la concentración del componente presente. La suma de todos los compuestos dentro de un rango específico son comparados con la concentración de hidrocarburos de un patrón estándar de referencia.

Dos técnicas son las más comúnmente usadas para ingresar las muestras en la columna. El sistema de Purga y Trampa indicado para gasolinas y condensados (entre C5 y C12) y la técnica de Inyección Directa, que puede usarse para cualquier tipo de hidrocarburos, pero en general para destilados, aceites lubricantes y crudos.

También para detectar hidrocarburos livianos y para monitoreo de campo, puede usarse la técnica de Headspace. Es de aplicación bajo este método la Norma EPA SW-846 Method 8015 y 8015 A utilizada para la determinación de HTP y comúnmente conocida como 8015 modificada.

6.3.2. Determinación de HTP por Espectrofotometría Infraroja (IR)

Se define HTP por IR, a cualquier hidrocarburo extractable por un solvente, el cual no es removido por la sílica gel y que puede ser detectado por un espectrómetro de rayos infrarrojos. La principal ventaja del método es que resulta simple, rápido y económico.

37

La espectroscopía IR mide la vibración que se produce cuando una molécula absorbe energía calórica de la región infrarroja del espectro electromagnético. Los diferentes grupos funcionales y los tipos de enlaces tienen diferentes frecuencias e intensidad de absorción. El método para determinar HTP por IR mide la absorbancia del enlace carbono – hidrógeno.

El solvente específico de la técnica es el freón. Pero actualmente no se lo utiliza debido a los efectos ambientales que genera. El método de espectroscopia infrarrojo más frecuentemente usado es el EPA Method 418.1 (EPA – 600 / 4-79-020 Método para análisis químico de aguas y aguas residuales) solamente es apropiado para muestras de agua. Para adaptar este método para muestras de lodos y suelo se efectúa una técnica de extracción en equipo Soxhlet. El método IR con simple frecuencia puede medir cadenas lineales parafínicas, cicloalcanos y con respuesta atenuada pueden cuantificar alquenos, aromáticos sustituidos y HAP's si tienen grupos alquilos en sus extremos.

La absorbancia IR es una medida de la suma de todos los compuestos contribuyendo al resultado, por lo que no provee información sobre el tipo de hidrocarburos presentes en la muestra. El contenido de HTP por IR no es una medida ideal para caracterizar la magnitud de la contaminación de un sitio o para establecer niveles de limpieza. La mayor dificultad está en que la misma concentración de HTP puede contener diferentes contaminantes y por lo tanto presentar diferentes riesgos a la salud humana y al ambiente.

6.3.3. Determinación de HTP por Métodos Gravimétricos

Estos métodos determinan analitos extractados por un solvente, no removidos durante la evaporación del solvente y capaces de ser pesados. Algunos métodos gravimétricos remueven materia orgánica o biogénica polar no constituyentes del petróleo. Presentan ventajas por su simplicidad, rapidez y economía.

No son métodos adecuados para determinar hidrocarburos livianos que volatilizan a temperaturas inferiores a 75 – 80 °C, pero pueden ser útiles para la determinación de hidrocarburos totales del petróleo en barros muy aceitosos, que contienen hidrocarburos de alto peso molecular. No brindan información sobre el tipo de hidrocarburos presentes ni del riesgo asociado a la contaminación.

La EPA propone el Método 1664 como un método para la determinación de material extractable con n-hexano, que no es absorbido por sílica gel en aguas y efluentes industriales.

6.3.4. Determinación de HTP por Métodos de Inmunoensayos

Este método correlaciona HTP con la respuesta de anticuerpos específicos de los compuestos del petróleo. Se obtienen contenidos de HTP mediante un número diferente de kits testigos disponibles para la determinación de HTP, BTEX y HAP's. Generalmente son usados como técnicas de análisis en campo (screening), debido a que su exactitud y precisión son bajos con respecto a los métodos de laboratorio. Se pueden obtener rangos de concentración o un valor simple. El límite de detección es bajo tanto en agua como en suelo y las concentraciones de hidrocarburos presentes en las muestras deben ser bajas. Generalmente se utilizan para la determinación de hidrocarburos aromáticos, contenidos en matrices de suelo no arcilloso. EPA Method 4030 “Petroleum Hydrocarbons by Immunoassay”.

6.3.5. Determinación de Tipos de Hidrocarburos del Petróleo

Estos métodos separan hidrocarburos por categorías tales como: saturados, aromáticos y polares /resinas, o bien se los conoce por parafinas, isoparafinas, aromáticos, naftenicos y olefinas. Se trata de Cromatografías Líquidas de Alta Performance (HPLC) y cromatografías gaseosas que se emplean generalmente para monitorear procesos de refinado o controlar la calidad de compuestos orgánicos sintéticos, pero que actualmente han encontrado un campo de aplicación en las disciplinas ambientales. Las columnas cromatográficas utilizadas para separar hidrocarburos saturados de aromáticos pueden usarse como una etapa previa de posteriores análisis por cromatografía gaseosa con selector de masas. Ocasionalmente se usan las Cromatografías de Capa Fina conocidas como “Thin Layer Chromatography” (TLC), como técnicas de screening para identificar productos del petróleo.

6.4. Determinación de los constituyentes individuales del petróleo

Muchos métodos analíticos usados en disciplinas ambientales determinan constituyentes individuales del petróleo o compuestos “indicadores, guía o de referencia” en lugar de señales completas de hidrocarburos totales del petróleo. La selección de un método sobre otro es determinada por la naturaleza de las muestras y de la condición particular del programa de saneamiento o limpieza por el cual la muestra es puesta a analizar. La mayoría de los métodos para determinar compuestos específicos o constituyentes individuales del petróleo usa una técnica por GC con detector selectivo, HPLC o CG con selector de masas (GC/MS). Las técnicas por GC y HPLC identifican analitos basándose en los tiempos de retención y pueden estar sujetas a interferencias. Por esta razón las técnicas requieren el uso de detector selectivo.

39

6.4.1. Cromatografía Gaseosa con Detector por Fotoionización (GC/PID)

El detector de fotoionización es adecuado para determinar compuestos aromáticos selectivamente. Este método presenta la ventaja de ser selectivo y sensible. El límite de detección típico para compuestos aromáticos es de 0.5 µg/l para agua y de 5 µg/kg para suelos. El detector PID se utiliza para determinar BTEX, mientras que el FID determina la señal de HTP total, el cual incluye las concentraciones de BTEX. Para compuestos volátiles generalmente el detector es conectado con un sistema de purga y trampa. El método EPA 8020 “Targets Volatile Aromatics” se usa frecuentemente para la determinación BTEX. La incorporación de la muestra es mediante un sistema de purga y trampa (EPA 5030). Las muestras que contienen compuestos destilados e hidrocarburos pesados no se analizan por GC/PID ya que el detector PID se contamina fácilmente y pierde su sensibilidad.

6.4.2. Cromatografía Gaseosa con Detector de Ionización de Llama (GC/FID)

El FID es un detector no selectivo que emplea una llama combustible de hidrógeno para ionizar los compuestos orgánicos. La ventaja de este sistema es su sensibilidad a un amplio rango de compuestos hidrocarbonados. Se puede utilizar para la separación y determinación de compuestos orgánicos no polares y compuestos semivolátiles como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP's) con un límite de detección de 10 µg/l en agua y de 330 µg/kg en suelos. Para compuestos semivolátiles el cromatógrafo es equipado con un paquete de columnas capilares. Los líquidos orgánicos límpidos o diluidos pueden analizarse por inyección directa y los compuestos son separados durante el movimiento dentro de la columna. Para ionizar la muestra utiliza llama de hidrógeno y muchos compuestos son detectados por un FID. Las moléculas ionizadas producen una corriente proporcional a la concentración de la muestra y esa corriente es registrada como una señal que, comparada con un patrón estándar, puede ser convertida en concentración del analito.

La determinación de HAPs se realiza según el método EPA 8100, mediante la inyección directa de un extracto de la muestra en el interior de la columna empacada que pueda separar los pares de compuestos como antraceno y fenantreno; criceno y benzo(a)antraceno, etc.

6.4.3. Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)

Un sistema HPLC se usa para determinar concentraciones de constituyentes semivolátiles y no volátiles del petróleo. Los diferentes sistemas cromatográficos requieren una completa volatilización de la muestra, de modo que pueda atravesar el cromatógrafo, el sistema LC solo requiere que la muestra se disuelva en un solvente que sea compatible con el usado en la separación. El detector más usado en análisis ambientales de petróleos por HPLC es el detector de fluorescencia. Este detector es particularmente sensible a moléculas aromáticas, especialmente de HAP's.

Los límites de detección para HAP's, por el método 8310 es de 0.013 - 203 µg/l. Los HAP's son extraídos de la muestra con un solvente adecuado para ser inyectados en el equipo luego de ser filtrado. El método EPA 8310 que usa una columna de octanodécilo y una fase acuosa móvil de acetonitrilo permite identificar 16 HAP's. Los métodos que utilizan HPLC con detector de fluorescencia pueden determinar cualquier compuesto que eluya en un adecuado rango de tiempos de retención y emitan ondas de fluorescencias. En el método EPA 8310 la onda de excitación actúa sobre el mayor número de compuestos aromáticos, esto incluye los HAP's de referencia, pero también muchos derivados aromáticos como los alquil aromáticos, fenoles, anilinas y compuestos heterocíclicos aromáticos que incluyen pirroles, piridinas, furanos y tiofenos.

6.4.4. Cromatografía Gaseosa con Detección Espectrométrica de Masas GC/MS

Un sistema GC/MS se puede utilizar para determinar concentraciones de compuestos volátiles y semivolátiles, pero no para la determinación de HTP. Es un método de alta selectividad y puede confirmar la identidad de un compuesto a través del tiempo de retención, brindando un único patrón espectral. Debido a la complejidad de su manejo e interpretación y a los tiempos involucrados en la corrida de una muestra, esta técnica resulta mas costosa que la GC/ FID y GC/PID. Para analitos volátiles su límite de detección es de 1.5 µg/l en agua y de 20 µg/kg en suelo y para compuestos semivolátiles es de 5 µg/l en agua y de 50 µg/kg en suelos. Es un sistema diseñado para ionizar compuestos y los separa como iones específicos según la relación carga – masa. Este sistema puede separar los constituyentes de una mezcla, ionizarlos en sus compuestos e identificarlos por sus fragmentos. Cada compuesto con excepción de sus isómeros determina un único espectro, aunque las diferencias pueden ser sutiles.

Los cromatogramas de iones pueden utilizarse para determinar concentraciones de trazas de un tipo específico de compuestos de una mezcla compleja. El cromatograma total de una GC/MS es similar a un cromatograma GC/FID.

Esta técnica permite cuantificar compuestos presentes en muy baja concentración de una matriz compleja de hidrocarburos. Por GC/MS se determinan compuestos volátiles según el método SW-846 8260, el método más común para determinar compuestos semivolátiles es SW-846 8270, incluye una lista de 16 HAP's. No es una técnica adecuada para determinar HTP.

6.5. Determinación de HTP discriminado por Fracciones

Se ha comenzado a desarrollar un nuevo método analítico que cuantifica HTP como fracciones discriminadas de hidrocarburos. En lugar de cuantificar con un simple número una compleja mezcla de hidrocarburos como lo hacen los métodos tradicionales, el método por fracciones divide la mezcla de hidrocarburos en discretas fracciones, de este modo se obtienen datos que pueden ser útiles en la caracterización de compuestos, variaciones de su composición e implicancias en los estudios de riesgos a la salud humana y al ambiente.

El método por fracciones se puede usar tanto para determinar hidrocarburos extractables como volátiles. Este método tiene como antecedente el método EPH/VP Method, desarrollado por el Massachusetts Department of Environmental Protection (MA DEP). El método HTP discriminado por fracciones es un método apropiado para la determinación de hidrocarburos en el rango que va de C6 a C28. Las concentraciones de Hidrocarburos muy livianos o muy pesados, fuera del rango indicado, pueden sufrir algunas variaciones, pero su detección es posible y puede efectuarse por el método modificado.

El MA DEP fue el primero en usar una aproximación a la obtención de fracciones de hidrocarburos del petróleo para la caracterización y evaluación de riesgos a la salud humana, asociados a sitios contaminados con petróleo. Las fracciones obtenidas se dividen de acuerdo a la toxicidad específica de los constituyentes individuales del petróleo.

El TPHCWG Method se basa en el comportamiento ambiental esperado de los constituyentes del petróleo. Estas divisiones o clasificaciones de hidrocarburos por fracciones simplifican los modelos ambientales necesarios para valorar el riesgo a la salud humana por exposiciones a la contaminación con petróleo.

De la propuesta efectuada por estos dos métodos, surge que los constituyentes del petróleo son, en primer lugar, divididos en fracciones de compuestos alifáticos y aromáticos y luego son subdivididos de acuerdo con la clase química a que pertenecen y a su temperatura de ebullición.

En contraste con los métodos tradicionales para la determinación de HTP que reportan un simple número de concentración para una mezcla compleja de hidrocarburos, este método provee concentraciones separadas por fracciones discretas de compuestos alifáticos y aromáticos. La identificación y cuantificación de fracciones alifáticas y aromáticas permite identificar productos del petróleo, evaluar la intemperización producida y evaluar el riesgo a la salud humana por la exposición a compuestos no cancerígenos.

El riesgo de exposición a compuestos cancerígenos es evaluado independientemente, utilizando la concentración de constituyentes individuales del petróleo considerados cancerígenos como el Benceno y diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Los dos métodos de fracciones de HTP han ganado uso regular y han alcanzado un amplio desarrollo con la asistencia de importantes empresas petroleras, el método de fracciones EPH/VPH de Massachussets es promulgado para la limpieza y saneamiento de sitios contaminados con hidrocarburos de ese estado. La transición a esta metodología a transcurrido en los últimos años y se han ido obteniendo estándares estatales a partir de la medición de fracciones EPH/VPH, tanto para la limpieza de suelos contaminados, como de aguas subterráneas.

Metodología analítica TPCWG: El método de separación se basa en la norma SW-846 EPA Method 3611 (Limpieza y separación de los residuos empetrolados en columna de alúmina) y la limpieza del extracto según la norma SW-846 EPA Method 3630 (limpieza con sílica gel). Las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos son analizadas separadamente por cromatografías gaseosas y cuantificadas por la suma de señales que producen una serie de rangos específicos de carbonos.

Esta metodología ha sido especialmente diseñada para resolver y cuantificar las 13 fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos seleccionados por el TPHCWG según su movilidad y transporte en el medio.

El Working Group asignó un criterio de toxicidad para cada fracción. Con estos criterios de toxicidad se pueden usar los datos y propiedades de movilidad y transporte de las fracciones para calcular el riesgo a la salud humana asociados con el medio ambiente contaminado.

El método no solo separa y cuantifica fracciones aromáticas y alifáticas, sino que se puede obtener un cromatograma con los hidrocarburos presentes en la muestra, desde el cual un analista experimentado puede identificar el tipo de petróleo liberado al ambiente y su grado de intemperización.

El cromatograma puede utilizarse como una evaluación preliminar de la naturaleza y extensión de la afectación ambiental causada por derrames de petróleo crudo. El método es versátil, de buen rendimiento y ha sido exitosamente aplicado para la caracterización de muestras de petróleo crudo limpias y productos del petróleo, así como suelos contaminados con gasolinas, y petróleos crudos con diferentes grados de intemperización.

Metodología analítica Massachusetts EPH /VPH: Este procedimiento presenta dos etapas que consisten en la cuantificación de los hidrocarburos volátiles del petróleo (VPH) y la cuantificación de hidrocarburos extractables del petróleo (EPH). El método para cuantificar hidrocarburos volátiles (VPH) incluye los siguientes compuestos: Benceno; Tolueno; Etilbenceno y los tres Xilenos, así como Naftaleno y Metilterbutileter (MTBE); todos los alcanos / cicloalcanos comprendidos en los rangos que van de C5 a C8 y de C9 a C12 y los compuestos aromáticos / alquenos en el rango C9 y C10. El método para hidrocarburos extractables (EPH) incluye los siguientes compuestos: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's); alcanos / cicloalcanos en los rangos de C9 a C18 y C19 a C36 y compuestos aromáticos / alquenos comprendidos en un rango de carbonos que van de C10 a C22. Para las fracciones de hidrocarburos volátiles (VPH), el protocolo para muestras de suelo implica una extracción con metanol con captura de compuestos volátiles en un sistema de purga y trampa. La metodología para hidrocarburos volátiles se realiza con una GC/PID en serie con una GC/FID. Luego utilizando hexano como solvente, el extracto es separado mediante un cartucho separador de sílica gel en las fracciones aromáticas y alifáticas y sus concentraciones son detectadas mediante una GC/FID. Los estándares de limpieza han sido promulgados basándose en fracciones EPH/VPH según la toxicidad de los compuestos de referencia y se ha recomendado el uso de cualquiera de los dos métodos o de ambos (EPH y VPH) para una variedad de mezclas de petróleo.

6.6 Ensayos Fitotóxicos

La ecotoxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayos biológicos estandarizados (bioensayos de toxicidad) que puedan ser utilizados como herramientas de diagnóstico y predicción temprana que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladores para la toma de decisiones, además de su aplicación en la evaluación de riesgo ecológico de los efectos adversos de las actividades antrópicas en ambientes naturales (Sobrero, 2010).

Los bioensayos (agudos o crónicos), han sido utilizados por décadas como herramientas de evaluación y monitoreo en procedimientos de remediación de toxicidad ambiental y en general son sensibles y de bajo costo (Biancucci Fiorenza, 2009).

Los bioensayos de toxicidad son definidos como el método o herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre un organismo vivo, a través de comparaciones de este agente con el efecto de una solución patrón o estándar, bajo condiciones experimentales específicas y controladas; estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, cuyo objetivo principal es caracterizar la relación concentración-respuesta del agente. Permiten determinar los efectos tóxicos de una sustancia, su repercusión en una población y su medio ambiente.

44

Es importante utilizar procedimientos estandarizados que permitan una comparación de los resultados obtenidos intra e interlaboratorios. Existen metodologías estandarizadas recomendadas por ciertos Organismos internacionales como Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. Environmental Protection Agency-US EPA), la Agencia Ambiental Canadiense (Environmental Canada-EC), la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (Organization for Economic Cooperation and Development-OECD), junto a organismos de estandarización y racionalización como American Society for Testing and Materials (ASTM), y además, en nuestro país se encuentran disponibles las normas Argentinas IRAM, para llevar a cabo ensayos de toxicidad. Estos procedimientos también proporcionan recomendaciones para la toma, manipulación y conservación de muestras y selección de tóxicos de referencia para ser utilizados en los ensayos de toxicidad (Carriquiriborde, 2021).

Para poder desarrollar un ensayo de toxicidad y estandarizarlo, este debe cumplir ciertos requisitos como, por ejemplo:

- Debe ser aceptado por la comunidad científica
- La prueba debe tener una buena base estadística, y debe ser repetible y generar resultados similares entre laboratorios.
- Los datos obtenidos deben incluir efectos en un amplio rango de concentraciones dentro de tiempos de exposición realistas.
- La prueba debe ser capaz de predecir lo que sucede en campo para organismos similares.
- El ensayo debe ser de fácil ejecución y económico.
- Debe ser lo más sensible y realista posible en relación con su diseño para detectar y medir el efecto.

Las pruebas de toxicidad más utilizadas han sido diseñadas en su mayoría para evaluar respuestas de unos pocos individuos de una única especie.

Debido a la menor complejidad y mayor facilidad en el desarrollo e interpretación de los resultados de las pruebas de toxicidad en laboratorio y monoespecíficas, se han desarrollado y estandarizado numerosas pruebas de este tipo, sobre todo para especies acuáticas como algas (*Selenastrum capricornutum*) y plantas vasculares (*Lactuca sativa*). En Argentina, existen trabajos que utilizan especies tanto estandarizadas como especies nativas, utilizando protocolos existentes o adaptaciones de estos.

45

Los vegetales juegan un rol fundamental, tanto en los ecosistemas acuáticos como terrestres, por su importancia en la productividad primaria, en la cadena alimenticia, en el reciclado de nutrientes, además de proporcionar alimento y hábitat para otros organismos. Constituyen una eficiente herramienta por ser más sensibles al estrés ambiental, fáciles de manipular y almacenar, de bajo costo y tienen buena correlación con otros sistemas de pruebas (Huanca Arocutipa, 2016).

Con el fin de aprovechar las características de los vegetales para evaluar el nivel de toxicidad se llega al concepto de fitotoxicidad, cuya definición es la acumulación de sustancias dañinas en el tejido de una planta en niveles que afectan su crecimiento y normal desarrollo, existiendo distintos síntomas y niveles de daño por acumulación de sustancias tóxicas o factores medioambientales.

El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie; en las últimas décadas se han desarrollado bioensayos rápidos con el empleo de plantas, con semillas de prueba, las que como se mencionó en oportunidades anteriores, funcionan como buenas herramientas de trabajo para el monitoreo ambiental.

6.6.1. Bioensayos: una herramienta para evaluar toxicidad de HTP

Para la contaminación de ecosistemas por hidrocarburos tóxicos y carcinogénicos derivados del petróleo, se han desarrollado técnicas como la biorremediación para sanear lugares contaminados utilizando microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos; sin embargo, algunos pueden biotransformar estos compuestos generando metabolitos más tóxicos. Por ello, se ha propuesto la realización de bioensayos que permitan integrar la información de la presencia de contaminantes, su biodisponibilidad y los posibles efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Una de las especies más estudiadas en ensayos de toxicidad ha sido *Lactuca sativa* L. (lechuga), ya que es una planta de crecimiento rápido, de pequeño tamaño, fácil de mantener en el laboratorio y de bajo costo (Pernía *et al.*, 2018), características que le han permitido ser un ensayo estandarizado.

Se ha demostrado que la toxicidad de un hidrocarburo es el resultado de una interacción compleja y variable entre las características propias del crudo y del suelo (Tarache, 2011).

Las características o tipo de suelo afectan significativamente la toxicidad. En general, suelos y desechos con hidrocarburos livianos presentan mayor toxicidad en comparación con crudos pesados y extrapesados o meteorizados (Salanitro *et al.*, 1997; Dorn & Salanitro, 2000). Cuando la toxicidad suele ser menor, existe un efecto físico sobre las propiedades del suelo, como es la disminución de la capacidad de campo e incremento de la repelencia al agua, entre otras propiedades, que merman su fertilidad (Adams *et al.*, 2008).

Aquellos suelos con mayor capacidad de intercambio, materia orgánica o contenido de arcilla exhiben mayor adsorción del hidrocarburo, y habrá menor efecto tóxico sobre el ecosistema (McBride, 1994). Los suelos con mayor contenido de materia orgánica y textura arcillosa pueden adsorber los hidrocarburos, reduciendo su solubilidad y presión de vapor efectivas, debido al reparto entre las fases lipofílicas. De esta manera, disminuye su biodisponibilidad y movilidad (El-Tarabily, 2002; Eibes *et al.*, 2006), lo que se traduce en una menor toxicidad (Dorn *et al.*, 1998). En suelos de textura arenosa, los hidrocarburos no son fácilmente retenidos, aún en presencia de la materia orgánica, por lo que el efecto tóxico es más marcado (Labud *et al.*, 2007).

Plaza y colaboradores (2005) estudiaron la tecnología de remediación de biopilas sometidas a diferentes condiciones, determinándose el efecto tóxico sobre diversos organismos de prueba, entre ellos seis especies vegetales: *Lactuca sativa* L. (lechuga), *Lepidium sativum* L. (berro de agua), *Zea mays* L. (maíz), *Triticum vulgare* L. (trigo), *Secale cereale* L. (centeno) y *Brassica oleracea* L. (col). Encontraron que, si bien el tratamiento de biopila reducía la toxicidad en relación con la inicial, luego de finalizado el tratamiento, poseían aún sustancias fitotóxicas.

A causa de los efectos dañinos que puede producir el petróleo crudo y sus derivados se han desarrollado bioensayos con especies de distintivo nivel de organización (Freites *et al.*, 2012), que permitan determinar los efectos tóxicos de una sustancia, su repercusión en una población y su medio ambiente. Estos ensayos de fitotoxicidad son pruebas estáticas de toxicidad aguda en la que se puede evaluar los efectos fitotóxicos de distintos compuestos en el proceso de germinación de una determinada semilla y en el desarrollo de la plántula durante los primeros días de crecimiento.

Se evalúan los parámetros de inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas, para ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que, a pesar de no ser suficientes para inhibir la germinación, pueden llegar a retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo. Por ello, constituyen indicadores muy sensibles a la hora de evaluar los efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la que proporciona el estudio del efecto en la germinación (Sobrero & Ronco, 2004).

Comprender los efectos y riesgos del suelo contaminado en relación con los receptores ecológicos es importante, y constituyen un área en pleno desarrollo. Como fue mencionado en apartados anteriores, las herramientas de evaluación de riesgos para los ecosistemas terrestres están menos desarrolladas, pero son esenciales para la protección de estos.

En cuanto a los datos bibliográficos existentes en la zona de estudio, Ríos (2005), en su trabajo de tesis doctoral, estudió la incidencia de hidrocarburos en suelo sobre la etapa de germinación de una especie vegetal *Grindelia chiloensis*, en el mismo muestra una disminución de la germinación de dicha especie a medida que aumenta el contenido de petróleo, observando que existe una ligera disminución de la CE_{50} al aumentar la cantidad de arcillas en suelos (9,21 y 11,27 % p/p de petróleo en suelo).

Se concluyó además que en las pruebas ecotóxicas realizadas con la fracción soluble de petróleo, la capacidad de retención de agua no cambia apreciablemente con la presencia de fracciones solubles suponiendo en este caso que la disminución de los porcentajes de germinación se debe, en forma más directa solamente a los efectos tóxicos de la fracción soluble del petróleo.

En estudios previos donde se ha evaluado la toxicidad de derrames de petróleo en suelos, como ocurre con la especie *Grindella chiloensis* (Ríos & Nudelman, 2008), se encontraron valores de EC_{50} , respecto a la etapa de germinación o más precisamente de emergencia de la planta, del orden del 10% p/p y de 18 mg L^{-1} , para contacto directo con la matriz mineral y con extracto acuoso, respectivamente. Según mencionan Ríos y Nudelman (2008), al llevar a cabo la caracterización de un sitio contaminado, desde el punto de vista químico, se pueden llegar a establecer criterios de punto final para llevar a cabo una remediación durante la evaluación de riesgo ambiental. Sin embargo, no es información suficiente a la hora de estimar el riesgo del sitio, ya que cualquier sustancia que entra en contacto con el ambiente, tiende a modificar su comportamiento al interactuar con los diferentes compartimentos ambientales, llevando a una sub o sobre estimación del riesgo real.

Pentreath *et al.*, (2015) realizaron ensayos de germinación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando especies endémicas de la Patagonia tales como *Atriplex lampa* y *Prosopis denudans*, que son especies que habitan en ambientes alterados por la actividad petrolera, por ello se consideran de gran importancia para ser utilizadas en ensayos de toxicidad, principalmente en suelos de la región. Evaluaron el Índice de Germinación (IG) de la especie resultando ser más resistente la germinación de *Atriplex lampa* y *Prosopis denudans* que el bioindicador de referencia utilizado (*Lactuca sativa* L.). Esto se podría evaluar como una posibilidad para la implementación de estas especies en el desarrollo de ensayos de fitotoxicidad cuando se trate de suelos regionales, ya que resultan ser especies autóctonas de la región, con alta tolerancia al déficit hídrico y salino, por lo que podrían ser aprovechadas a la hora de llevar a cabo el procedimiento del ensayo.

Blasetti *et al.*, (2019) en el trabajo Evaluación ecotoxicológica de sorbentes para petróleo presentado en el IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, mostraron el análisis ecotoxicológico del material híbrido, utilizado como sorbente de petróleo, formado a partir de la combinación de arcillas locales (principalmente montmorillonita) y un alga (*Codium fragile*), que habita la región patagónica, por dos técnicas distintas de calentamiento, horno convencional y de microondas. El ensayo de toxicidad se realizó exponiendo semillas de *Lactuca sativa* a distintas concentraciones de los extractos acuosos de los sorbentes, durante 120 horas (IRAM 29114, 2008). Los parámetros medidos, para evaluar los efectos fitotóxicos fueron la germinación y el crecimiento de la radícula, los cuales permitieron el cálculo del índice de germinación (IG). Obtuvieron valores de IG mayores a 50%, lo que sugiere un desarrollo aceptable de las semillas en el amplio rango de las concentraciones ensayadas.

Blasetti & Katusich (2021) estudiaron la fitotoxicidad de las fracciones solubles de petróleo en muestras de suelo contaminado con petróleo y tratado con un material híbrido sorbente. Los materiales híbridos se prepararon a partir de una arcilla natural y el alga *Codium fragile*, utilizando distintos métodos de calentamiento (estufa y microondas). Se realizaron dos tipos de ensayos, ensayo directo sobre suelo y ensayo sobre elutriados, con semillas de *Lactuca sativa*. Los resultados evidencian que el agregado del material híbrido a muestras de suelo contaminados con petróleo (20-30% m/m), produce un aumento en el porcentaje de germinación. El índice de germinación muestra una toxicidad moderada o nula por ensayo directo sobre suelo y ensayo sobre elutriados, los valores indicarían un efecto beneficioso para el crecimiento de la semilla. Además, se evidencia mayor sensibilidad a los agentes tóxicos del suelo en el ensayo directo sobre suelo, en comparación con el ensayo realizado con el elutriado.

6.6.2 Bioensayo con semillas de *Lactuca Sativa*

La determinación de hidrocarburo en el suelo se puede complementar con la incorporación de los bioensayos, considerando el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado (Sobrero & Ronco, 2004).

El bioensayo con semillas de *Lactuca sativa* es un ensayo estático de toxicidad aguda (120 h de exposición), que es utilizado para evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas. Esta especie ha sido calificada como óptima para realizar estudios de toxicidad en suelos impactados con crudos por su sensibilidad a este tipo de compuestos (Banks & Schultz, 2005).

La obtención de las semillas de lechuga se realiza en semillerías locales, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo. Previo a la implementación de la prueba, es recomendable verificar que cada lote nuevo de semillas que se utilice tenga un porcentaje de germinación superior al 90%, sincronización en la germinación y baja variabilidad de la elongación de la radícula e hipocotilo (coeficiente de variación < 30%). Es necesario además caracterizar las condiciones de germinación del lote de semillas, evaluando la respuesta frente a la luz (fotoblastismo positivo o negativo: germinación en presencia o ausencia de luz, respectivamente) y la temperatura óptima de germinación.

Con el fin de reducir la variabilidad en los resultados, para el caso de semillas no seleccionadas y que presenten gran heterogeneidad en el tamaño, es conveniente realizar una selección previa descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando solamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio. La fracción de menor tamaño puede presentar un alto porcentaje de semillas vanas, mientras que las semillas de mayor tamaño pueden ser más vigorosas, variando la sensibilidad frente a los compuestos tóxicos.

Si no es posible obtener lotes de semillas con poder germinativo igual o mayor al 90%, se debe aumentar el número de semillas por caja para obtener un número mínimo de 18 semillas germinadas. Por otra parte, si se desea aumentar la confiabilidad de los resultados, o en caso de contar con semillas que posean una alta variabilidad en la elongación de la radícula de los controles negativos, aún habiéndolas seleccionado de tamaño uniforme, se recomienda aumentar el número de réplicas por tratamiento (Sobrero & Ronco, 2004).

La interpretación de los resultados en algunos casos es compleja, ya que se puede presentar inhibición en el crecimiento de la radícula y estímulo en el crecimiento del hipocótilo o viceversa. Por ello, se establecen parámetros a partir de los ensayos de toxicidad. El efecto por la respuesta de los organismos determina el tipo de análisis a aplicar sobre los datos y pueden ser de tipo cuantitativo (el organismo muestra o no muestra un efecto) o de tipo cuantitativo (reducción en el crecimiento, reducción de peso, performance reproductiva). La *Tabla 6.2.* muestra los parámetros calculados con los bioensayos de fitotoxicidad.

Parámetro	Detalle
CI 50 (Concentración inhibitoria 50)	Concentración de la sustancia que causa un 50% de inhibición de la variable estudiada con respecto al control.
CE 50 (Concentración efectiva 50)	Concentración a la cual se observa efecto sobre el 50% de los organismos expuestos, de acuerdo al criterio de ensayo.
NOEC (Concentración para la que no se observa efecto)	Es la mayor concentración de tóxico para la cual no se observa un efecto estadísticamente significativo respecto del control en un determinado tiempo de exposición.
LOEC (Menor concentración para la que se observa efecto)	Es la menor concentración de tóxico para la cual se observa un efecto estadísticamente significativo en un determinado tiempo de exposición.
GRS (Porcentaje de la germinación relativa de semillas)	Es una relación entre las semillas germinadas en la muestra y las germinadas en el control.
CRR (Porcentaje el crecimiento relativo de la radícula)	Es una relación entre la longitud promedio de la raíz de la muestra y la longitud promedio de la raíz de la muestra.
IG (Índice de germinación)	Es el porcentaje que tiene en cuenta la germinación de las semillas (GRS) y la elongación de la raíz (CRR).

Tabla 6.2. Parámetros calculados en ensayos de fitotoxicidad

En general, como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo (Sobrero & Ronco, 2004). El índice de Germinación (IG) es uno de los más utilizados para los reportes, y se basa en la cantidad de semillas germinadas y la longitud de la radícula. Valores de IG inferiores a 50% indican una alta fitotoxicidad; entre 50% y 80%, fitotoxicidad moderada y valores superiores a 80% indicarían que la muestra no presentaría fitotoxicidad (Fain Binda *et al.*, 2018).

La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal, siempre y cuando podamos corroborar que, finalizada la exposición a una muestra, las semillas no hayan germinado por muerte del embrión, y que no existe simplemente un retraso en el proceso de germinación, manteniéndose la viabilidad de la semilla. No obstante, la inhibición en la germinación registrada al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad, aunque el efecto en la germinación sea reversible (Sobrero & Ronco, 2004).

La inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar los efectos en la germinación. La respuesta tóxica en los diferentes puntos finales por exposición a los contaminantes se puede expresar como CI_{10} , CI_{25} o CI_{50} (concentración de tóxico que produce el 10, 25 o 50 % de inhibición en el parámetro considerado como punto final, respectivamente).

Con el fin de establecer el intervalo de concentraciones finales de exposición en el cual se verifique efecto inhibitorio y así poder elaborar las curvas de toxicidad, se realizan ensayos preliminares seleccionando concentraciones de exposición según escala logarítmica. A partir de estos resultados, se realizan las exposiciones definitivas, ajustando el intervalo de concentraciones en el diseño experimental, según la sensibilidad de la especie estudiada. Este procedimiento se aplica de manera general a la evaluación de la toxicidad, no sólo de compuestos puros, sino también a mezclas complejas, lixiviados o muestras ambientales (Sobrero, 2010).

6.6.3 Curva dosis respuesta

Para realizar una curva dosis respuesta se recomienda preparar un mínimo de 5 o 6 diluciones de la muestra a estudiar de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para la preparación de cada dilución se utiliza agua dura reconstituida (es posible el uso de agua mineral dura para consumo humano), realizando el control negativo con el agua de dilución empleada. Es importante establecer cuáles son los valores de elongación en el control negativo, así como la sensibilidad de las semillas frente al compuesto tóxico de referencia (control positivo), determinando para cada lote de semillas el valor de CE_{50} .

Se realizan cartas control (*Figura 6.1.*) para evaluar el crecimiento en los controles negativos (promedio $\pm 2\sigma$ de la elongación de la radícula) y de la sensibilidad frente al compuesto tóxico de referencia (promedio $\pm 2\sigma$ de la CE_{50} para el Zn (II) preparado a partir de sulfato de zinc).

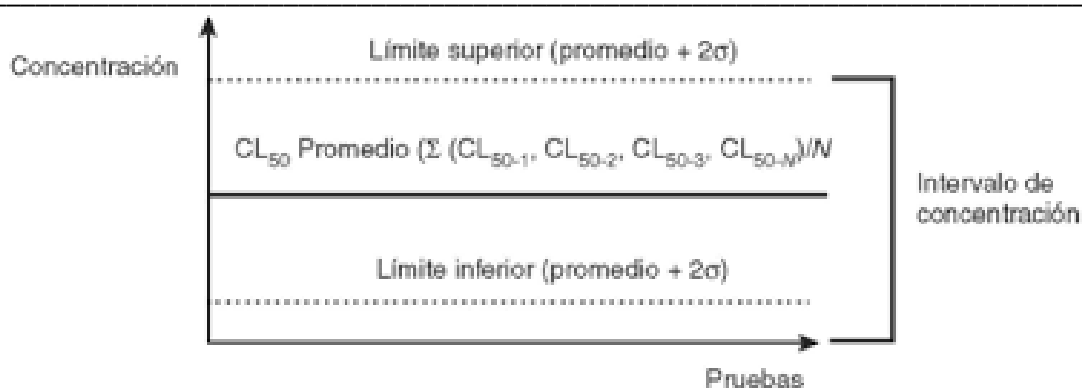


Figura 6.1.: Modelos de carta control. IRAM 2014

El procedimiento consiste en colocar en cada caja Petri un disco de papel de filtro, marcando correctamente cada caja con la dilución correspondiente. Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire, con la ayuda de una pinza colocar cuidadosamente 20 semillas, dejando espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces. Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri deben cubrirse de la luz inmediatamente después de colocarlas las semillas en su interior y durante el período de ensayo. Incubar por 120 horas (5 días) a una temperatura de 24 ± 2 °C. Realizar repeticiones para cada dilución ensayada. Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo, sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra. Terminado el período de exposición se debe registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula. Es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etc.). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación, consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocótilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

Una vez terminada la observación detallada se procede a cuantificar el efecto en la germinación y la elongación de la radícula y del hipocótilo, para lo cual utilizar una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada una de las plántulas, correspondientes a cada concentración del compuesto tóxico o dilución de muestra y a los controles.

La medida de elongación de la radícula (*Figura 6.2.*, tomado de Martin & Pozo, 2018) se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocótilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones.

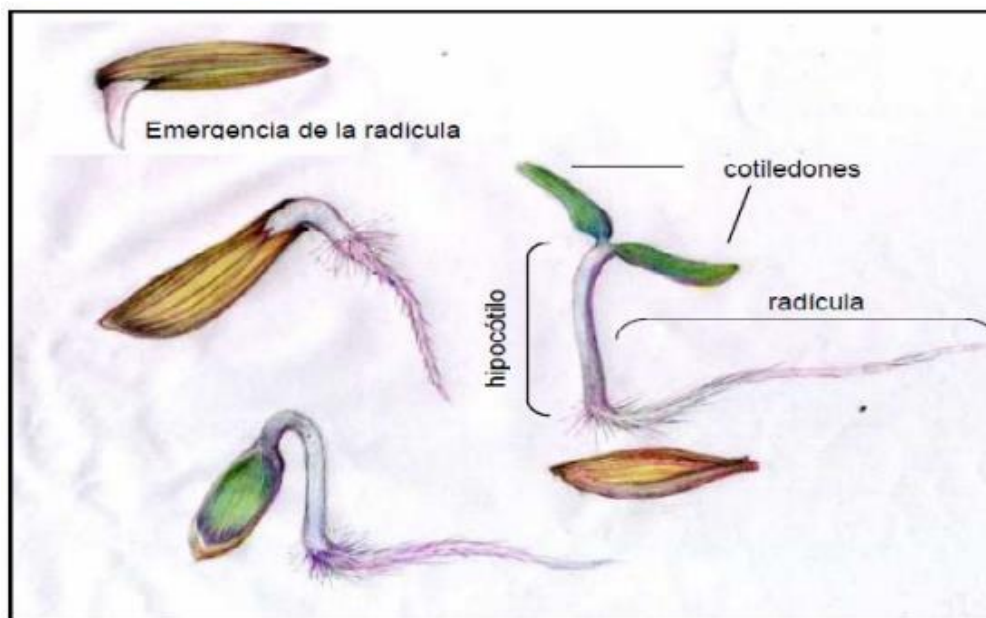


Figura 6.2.: Esquema de la plantula de *Lactuca sativa*.

Un procedimiento factible de realizar para facilitar la medición de la radícula e hipocótilo, es proceder a congelar las cajas Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar el material luego de ser descongelado).

De esta manera las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición. Si se procede a evaluar el efecto sobre las plantas descongeladas es importante proceder de igual manera con todas las réplicas de la prueba.

Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo. Por otro lado, antes de congelar el material se debe realizar previamente la observación general de efectos fitotóxicos en las plantas vivas al finalizar el período de exposición. Se realizan los siguientes cálculos:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas de cada repetición.
- Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo.
- Porcentaje de inhibición en la germinación.
- Con los datos anteriores, se elabora la gráfica dosis-respuesta, colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa la concentración.
- Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, se calcula la concentración que produce el 50% de inhibición (CI_{50}/CE_{50}) para cada punto final evaluado. Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (t Student, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto.

6.7 Procedimiento recomendado: Método directo

En base a lo mencionado en apartados anteriores, en este trabajo se recomienda el bioensayo por método directo, por presentar mayor sensibilidad en muestras contaminadas con hidrocarburos. Para el mismo se recomienda la utilización de semillas de *Lactuca sativa* (L), variedad cuatro estaciones. Su potencial de germinación debe examinarse a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ antes de los ensayos como un control de la viabilidad (90% garantizada) de las semillas. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos se recomiendan la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula.

En la *tabla 6.3* se muestran las características de distintos protocolos utilizados para bioensayos, incluido el método (recomendado).

Condiciones de la prueba	Protocolo 208 de la OECD*, 1984	IRAM 20117	IRAM 29114	Recomendado
Duración de la prueba	14 días	5 días	5 días	5 días
Temperatura	22 ± 2 °C	24°C ± 2°C	24°C ± 2°C	24°C ± 2°C
Condiciones de iluminación	Oscuridad hasta germinación	Oscuridad Primeras 48hs	Oscuridad	Oscuridad hasta germinación
Recipientes de prueba	Cajas de Petri con papel filtro humedecido	Macetas	Cajas de Petri	Cajas de Petri, con papel de germinación humedecido
Cantidad de extracto de suelo requerida por réplica	2 mL	300-400g	4 a 5 mL	20 g de cada muestra
Especie de prueba	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>), sorgo (<i>Sorghum vulgare</i>), maíz (<i>Zea mays</i>), soya (<i>Glycine max</i>), lenteja (<i>Lens culinari</i>) o jitomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> (L)), variedad cuatro estaciones. Su potencial de germinación debe examinarse a 24±2°C	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> (L)), variedad cuatro estaciones. Su potencial de germinación debe examinarse a 24±2°C	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> (L)), variedad cuatro estaciones. Su potencial de germinación debe examinarse a 24±2°C
Número de semillas por réplica	15	40	10 a 20	10
Número de réplicas	3	3	3 a 6	3
Respuesta a medir	Inhibición de la germinación, de la elongación de la radícula y el hipocótilo, y de la producción de biomasa	Plántulas emergentes CE ₅₀	Inhibición de la germinación, de la elongación de la radícula CE ₅₀ CI ₅₀ % de Inhibición	Inhibición de la germinación, de la elongación de la radícula
Control negativo	Agua destilada y el disolvente empleado en la extracción	Agua destilada	Agua destilada	Agua destilada y muestra de suelo sin contaminar
Control positivo	Ácido bórico	Ácido bórico	Sal de Zn (II)	Sulfato de cinc

Tabla 6.3.: Comparación de las características de los distintos métodos utilizados en los bioensayos.

El protocolo recomendado (Plaza *et al.*, 2005; Sirit *et al.*, 2008) consiste en colocar 20 g de cada muestra en placas de Petri (Figura 6.3.), se cubren con papel de germinación, humedecido con agua destilada en una relación de 2:1 de agua/masa de muestras secas.

Posteriormente se colocan 10 semillas sobre el papel de germinación y se incuban a 24°C±2°C en la oscuridad. Todas las experiencias se realizan por triplicado.

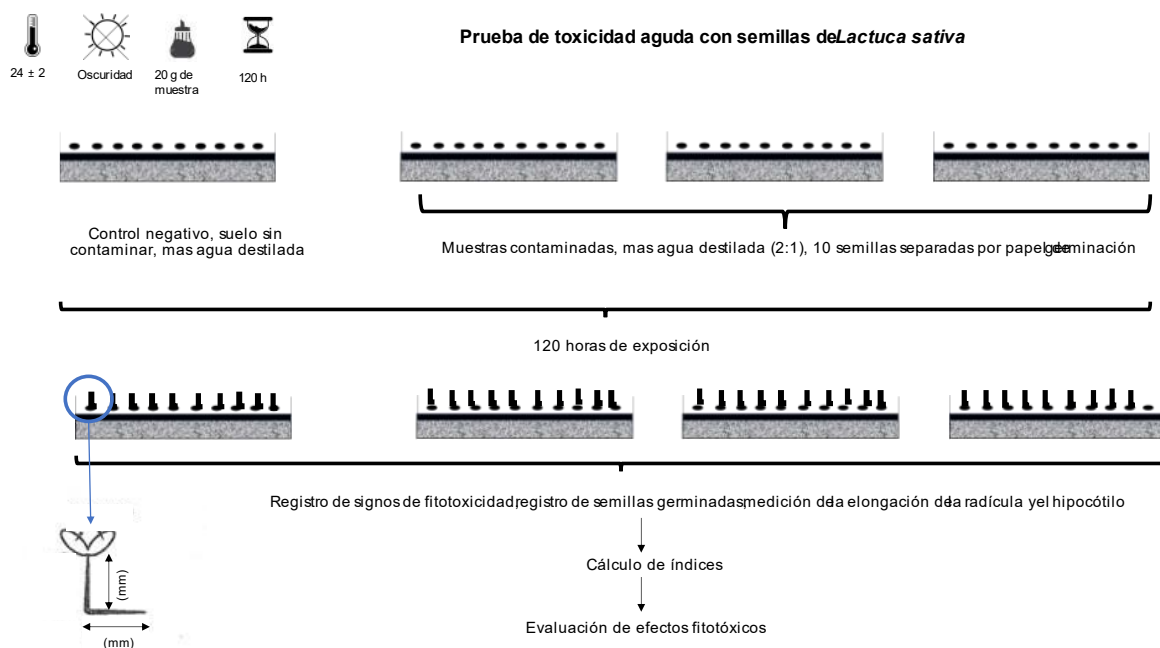


Figura 6.3.: Esquema general del procedimiento para la prueba de toxicidad aguda, método directo.

Cumplido el tiempo de germinación se cuantifica el efecto sobre la germinación, el crecimiento de la radícula y los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de la germinación relativa de semillas (GRS), el crecimiento relativo de la radícula (CRR) y el índice de germinación (IG) de acuerdo con Hoekstra *et al.*, (2002) y Walter *et al.*, (2006), según las siguientes ecuaciones.

$$GRS = (\text{Número de semillas germinadas de la muestra}) / (\text{Número de semillas germinadas en agua (testigo)}) \times 100$$

$$CRR = (\text{Longitud promedio de la radícula de la muestra}) / (\text{Longitud promedio de la radícula en agua (testigo)}) \times 100$$

$$IG (\%) = \frac{GRS \times CRR}{100}$$

Se recomienda un test de fitotoxicidad sobre la fracción de petróleo soluble en agua por la dinámica de equilibrio entre las fases agua y suelo; este test determina que los compuestos que ejercen su efecto tóxico se encuentren biodisponibles en la fase acuosa y permite valorar su toxicidad (Lavarías, 2005).

La inhibición de la elongación de la raíz y del hipocotilo puede reflejar sustancias tóxicas en bajas concentraciones, que no son suficientes para prevenir la germinación, pero pueden retrasar o inhibir el crecimiento de la raíz y del hipocótilo. Evaluar estos parámetros para evaluar la toxicidad de suelos contaminados con petróleo permite indicar la toxicidad potencial de los contaminantes de acuerdo con el tiempo de biodegradación en el suelo (Cruz *et al.*, 2014).

La estandarización de los ensayos con la especie *Lactuca sativa* L. un método rápido, preciso y de bajo costo para la predicción de efectos adversos sobre el ecosistema, una gran cantidad de estudios realizados justifican la elección (Freites, *et al.*, 2012).

Se propone la realización de bioensayos de toxicidad que incluyan la utilización de especies autóctonas de acuerdo con las necesidades locales, lo que permitiría la cuantificación de la toxicidad de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera y la evaluación del riesgo ambiental asociado a la misma. A su vez, permitiría el establecimiento de niveles guía para la contaminación de los suelos regionales por derrames de crudo.

7. Formas de tratamiento

El término «tecnología de tratamiento» implica cualquier operación unitaria o serie de operaciones unitarias que altere la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado. Pueden clasificarse de diferentes maneras, basado en la estrategia de remediación, el lugar en que se realiza el proceso de remediación, y el tipo de tratamiento que se va a aplicar. La destrucción o modificación de los contaminantes busca alterar su estructura química. Durante su extracción o separación, los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, aprovechando sus propiedades físicas o químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica). En el caso del aislamiento o inmovilización del contaminante, estos son estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos (EPA, 2001; Loya Del Ángel, 2013).

Según la forma en la que se apliquen las técnicas de recuperación de suelos se habla de tratamientos *in situ*, que actúan sobre los contaminantes en el lugar en el que se localizan, y tratamientos *ex situ*, que requieren la excavación previa del suelo para su posterior tratamiento, ya sea en el mismo lugar (tratamiento *on-site*) o en instalaciones externas que requieren el transporte del suelo contaminado (tratamiento *off-site*) (Bernard *et al.*, 2017).

Con respecto al tipo de tratamiento, se trata de una clasificación que se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos de tratamiento. Para tratamientos biológicos se utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos. En los tratamientos fisicoquímicos, se utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes para destruir, separar o contener la contaminación. Y en los tratamientos térmicos, se usa calor para incrementar la volatilización, quemar, descomponer o fundir los contaminantes en un suelo (EPA, 2001; Loya Del Angel, 2013).

En la *Tabla 7.1.* se muestran las principales ventajas y desventajas del uso o aplicación de los métodos biológicos, fisicoquímicos y térmicos (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2002), teniendo en cuenta los tratamientos involucrados (Bernard *et al.*, 2017).

	Tratamientos	Ventajas	Desventajas
Tratamientos Biológicos	<ul style="list-style-type: none"> - Biodegradación - Biotransformación - Fitorremediación - Bioventing - Landfarming - Biopilas - Compostaje - Lodos biológicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Son efectivos en cuanto a costos. - Son tecnologías más benéficas para el ambiente. - Los contaminantes generalmente son destruidos. - Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requieren mayores tiempos de tratamiento. - Es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos. - No pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano.
Tratamientos Físicoquímicos	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción - Lavado - Electrocinética - Barreras permeables activas - Pozos de recirculación - Inyección de aire - Oxidación UV 	<ul style="list-style-type: none"> - Son efectivos en cuanto a costos. - Pueden realizarse en periodos cortos. - El equipo es accesible y no se necesita de mucha energía ni ingeniería. 	<ul style="list-style-type: none"> - Los residuos generados por técnicas de separación, deben tratarse o disponerse: aumento en costos y necesidad de permisos. - Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación.
Tratamientos Térmicos	<ul style="list-style-type: none"> - Incineración - Desorción térmica 	<p>Permite tiempos rápidos de limpieza.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Es el grupo de tratamientos más costoso. - Los costos aumentan en función del empleo de energía y equipo. - Intensivos en mano de obra y capital.

Tabla 7.1.: Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación, clasificadas de acuerdo con el tipo de tratamiento.

La selección de la mejor tecnología de remediación debe surgir como consecuencia de estudios ambientales y de una valoración de los costos del proyecto. Los estudios ambientales se dividen en estudios Fase I y de Fase II. Los de Fase I constituyen un registro histórico que no implica muestreos del lugar. Los estudios Fase II derivan en la instalación de pozos freáticos para la evaluación del estado ambiental del subsuelo (Coria, 2007), lo cual correspondería si se estuviese analizando el compartimento agua.

A continuación, se detallan algunas de las tecnologías de tratamiento aplicadas específicamente en suelos que citan la región.

7.1. Tratamientos Biológicos

7.1.1. Biorremediación

La biorremediación es el proceso mediante el cual diversos tipos de microorganismos degradan contaminantes como los hidrocarburos, en moléculas más simples o compuestos no tóxicos (Imam *et al.*, 2019). Esta técnica se considera eco-amigable ya que no se requieren la aplicación de productos químicos para degradar los compuestos por lo que no se generan residuos como subproductos (Lee *et al.*, 2019), sino que utilizan bacterias, hongos y plantas para detoxificar las sustancias de riesgo para el hombre y el medio ambiente (Bernard *et al.*, 2017).

El tratamiento puede ser *ex situ* o *in situ*. *Ex situ* abarca una excavación para la extracción del material contaminado, y su transporte a otro lugar donde pueda ser aplicado el tratamiento, facilitando el control de los parámetros asociados al proceso, y ofreciendo una medición exacta de la eliminación del contaminante al final del proceso (Lens *et al.*, 2005). Las técnicas *in situ* buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes con suministro de aire u oxígeno (bioventeo), nutrientes (bioestimulación), microorganismos (bioaumentación) y/o humedad, además del control de temperatura y pH (EPA, 2001).

Existen datos sobre la aplicación de biodegradación "*in situ*" en la Patagonia, inmediatamente después de ocurrido un derrame de petróleo, en la que se identificó a las especies de los géneros *Arthrobacter* y *Pseudomonas*. Este tratamiento se acompaña con fertilización y laboreo. Al momento del primer muestreo, los hidrocarburos iniciales pasaron de 12,8 a 15,3 %, y a los meses, el porcentaje de hidrocarburos totales en el suelo fue disminuyendo, hasta llegar a 5-7 % en el verano. Con los trabajos de investigación llevados cabo, se demostró que, para las condiciones de clima y suelos de la Patagonia, es factible la biodegradación del petróleo proveniente de los derrames, mediante la combinación de laboreo y fertilización, realizados en época primavera estival (Luque *et al.*, 2012).

7.1.2. Bioaumentación

Consiste en la adición de microorganismos vivos, nativos y no nativos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación. No siempre este proceso favorecerá la remoción del contaminante, y la bioestimulación puede ser suficiente para realizar la biorremediación del suelo impactado (Islas-García *et al.*, 2018). Se ha usado para tratar suelos contaminados con herbicidas (2.4-D, clorofam), insecticidas (lindano, clordano, paratión), clorofenoles (PCP) y nitrofenoles, bifenilos policlorados (BPC), hidrocarburos totales del petróleo (HTP) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Antes de llevar a cabo este proceso en un sitio, deben realizarse de manera *ex situ* cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Alexander, 1994).

En la provincia del Chubut se efectuaron trabajos de bioestimulación para que bacterias y hongos presentes naturalmente en el suelo degraden los hidrocarburos, según una metodología desarrollada por el INTA Chubut. Oliva (2004) menciona que utilizando esta metodología se logra disminuir la proporción de contaminantes hasta un nivel en el cual es posible el desarrollo normal de las plantas.

7.1.3. Landfarming y Biopilas

En el método de landfarming se realiza una excavación, y se dispone una capa de tierra cuya profundidad no debe exceder los 50-60 cm de espesor sobre la superficie del lugar donde se realiza la recuperación y se estimula la actividad microbiana aeróbica mediante aireación, es decir, se realiza un proceso de arado del terreno donde se puedan desarrollar las bacterias, se procede añadir abono para proveer de nitratos o fosfatos y activar el crecimiento de los microorganismos (Yagual Barzola, 2020), la *Figura 7.2.* muestra el método. Debido a que es un procedimiento *ex situ*, el suelo a tratar es trasladado a un terreno que debe ser totalmente plano, tratados en espacio abierto y con un fondo compuesto por una capa de arcilla, evitando que el contaminante se filtre (Celorio Zurita, 2016).

La biopila está basada en el incremento de la actividad biológica mediante excavación y adición de O₂ con nutrientes, más la extracción de compuestos volátiles en el suelo. Su principal aplicación es en compuestos orgánicos biodegradables, teniendo una efectividad entre 80% para hidrocarburos y 97% para hidrocarburos ligeros (González-Rojas, 2011; Osoria Villa, 2018).

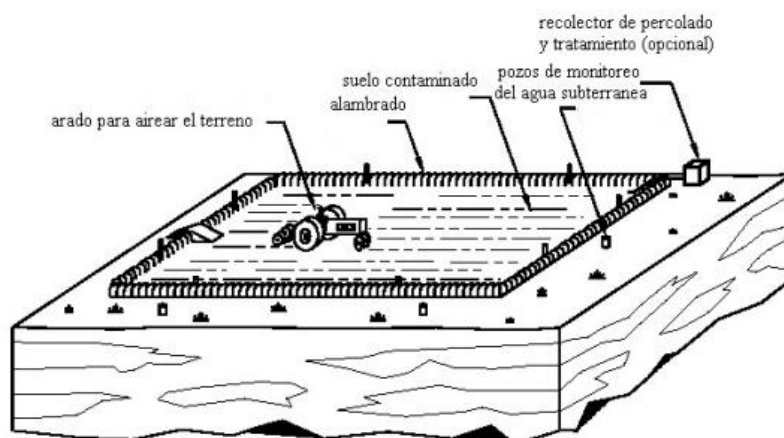


Figura 7.2.: Esquema de un landfarming. Tomada de Contaminación y remediación de suelos. <http://www.ingenieroambiental.com/> US Environmental Protection Agency (EPA) (1994). Recuperado de: https://www.epa.gov/oust/pubs/tum_ch5.pdf

El tratamiento con biopilas ha sido muy utilizado en derrames de petróleo en Chubut, con la aplicación sistemática de las bacterias aeróbicas, anaeróbicas y facultativas junto con enzimas y nutrientes en el residuo, regado a través de un camión regador, mezclado, homogeneización y aireación del residuo. La evolución del contenido de (HTP) en los sólidos tratados en repositorios, medidos según la técnica EPA 418.1 para un volumen de 3500 m³ de suelo empetrolado, mostró que, al cabo de 14 semanas de tratamiento, el material presentaba una concentración de HTP apta para su disposición final (Sameghini & Barquín, 2011).

7.1.4. Fitorremediación

La contaminación de los suelos por HC tiene un pronunciado efecto sobre las propiedades de los suelos, con procesos de salinización, de toxicidad sobre los microorganismos y mortandad de la vegetación por efectos fitotóxicos. Esto se ve agravado en la Patagonia, por tratarse de un ecosistema sumamente frágil ya que tiene condiciones que limitan naturalmente el crecimiento de las plantas. En los últimos años ha cobrado una gran importancia la utilización de métodos biológicos para la limpieza de sitios contaminados, dentro de ellos se incluye la fitorremediación. Es el uso de plantas y sus microorganismos asociados para extraer, secuestrar, detoxificar, degradar, contener o tornar inocuos a los contaminantes en suelo, por alteración de las condiciones químicas y físicas del mismo. Las tecnologías que utilizan los principios de la fitorremediación, y que son útiles para tratar gran variedad de contaminantes, sólo han sido evaluadas en nuestro país a escala de laboratorio para el tratamiento de suelos contaminados con HC de petróleo (Luque, 2009).

En términos de definición, la fitoremediación (FR) es el uso de plantas y sus microorganismos asociados para extraer, secuestrar, detoxificar, degradar, contener o tornar inocuos a los contaminantes en suelos o aguas. Las plantas y sus raíces influyen en la degradación por alteración de las condiciones químicas y físicas del mismo. La exploración del suelo por parte de las raíces pone en contacto a plantas, microorganismos y nutrientes, con los contaminantes.

Una característica adicional muy positiva respecto a la implementación de la FR es que una rápida **recomposición de la cobertura vegetal** permite la **estabilización y protección de los suelos**, disminuyendo el riesgo de ocurrencia de los procesos de erosión hídrica y eólica, característicos de la Patagonia extrandina, y de todas las zonas áridas y semiáridas del mundo (Luque, 2009).

Es una tecnología in situ, no destructiva, de bajo costo, para limpiar suelos contaminados con petróleo. Se basa en el uso de plantas que tienen la propiedad de extraer y acumular el contaminante y disminuir su concentración (Chan-Quijano *et al.*, 2015). La eficacia de esta tecnología está condicionada por el tipo de plantas utilizado para determinar la profundidad a tratar, las altas concentraciones de contaminantes que pueden resultar tóxicas y la estación del año.

No es una técnica efectiva para tratar contaminantes fuertemente sorbidos. La toxicidad y biodisponibilidad de los productos de la degradación no siempre se conocen y pueden movilizarse o bioacumularse en animales (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2002). Este método se restringe a sitios de contaminación superficial dentro de la rizosfera de la planta, y se puede aplicar tanto in situ como ex situ (Yagual Barzola, 2020).

7.2. Tratamientos Físicoquímicos

Este tipo de tratamientos aprovechan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación. La mayoría de estas tecnologías se aplica in situ. Son efectivas en cuanto a costos y pueden concluirse en periodos cortos, en comparación con las tecnologías de biorremediación. Las tecnologías fisicoquímicas incluyen tres estrategias básicas de acción sobre el contaminante, destrucción, separación e inmovilización (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2002).

7.2.1. Solidificación/estabilización

Las técnicas de confinamiento o también conocidas como estabilización/solidificación, se basa en mitigar la movilidad de los contaminantes en el suelo mediante procesos físicos y químicos, ya que estos se convierten en formas solubles y menos tóxicas (estabilización) o son encapsulados en una estructura sólida (solidificación). Esta técnica es adecuada para el tratamiento de suelos contaminados con compuestos inorgánicos (en especial los metales pesados), puesto que si se tratase de componentes orgánicos volátiles no se tendría la capacidad de poder estabilizarlos y se emitirían a la atmósfera durante el proceso de tratamiento (Yagual Barzola, 2020).

63

En la provincia del Chubut, existe un caso en el cual se describe el tratamiento de un derrame de hidrocarburos causado por la surgencia imprevista de petróleo y gas durante la terminación de un pozo, y el uso de un absorbente orgánico derivado de la turba extraída en la zona de la localidad de El Hoyo, provincia del Chubut. Su estructura porosa le permite encapsular el hidrocarburo por contacto. Es por ello por lo que se decidió aplicarlo en sitios puntuales, donde persistía una capa de hidrocarburo sobrenadante que no pudo ser recuperada mediante el camión de vacío; se lo mezcló con el terreno, con el fin de encapsular el hidrocarburo por contacto y evitar su migración. Luego de varios días de laboreo manual, la mezcla fue llevada al repositorio para que complete su biodegradación allí, lo que dejó al suelo limpio y libre del contaminante, logrando la remoción de los hidrocarburos (Sameghini & Barquín, 2011).

7.3. Fotodegradación de Hidrocarburos Aromáticos

Se sabe que este tipo de compuestos son altamente resistentes y persistentes en el medio ambiente, debido a la estabilidad del anillo aromático, por lo que los tratamientos convencionales no son del todo efectivos.

La fotocatalisis o fotodegradación es un proceso avanzado de oxidación que puede ser empleado para degradar moléculas orgánicas debido el efecto de los radicales OH^{\bullet} (López González *et al.*, 2018). Existen procesos tales como la oxidación húmeda, o la oxidación catalítica, con alta eficacia de eliminación, ya que tiene la capacidad de romper compuestos orgánicos, haciéndolos más simples y por lo tanto más biodegradables. Son procesos que se llevan a cabo mediante el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), una especie altamente oxidante y reactiva.

Para reducir la severidad de las condiciones de reacción de estos procesos, una alternativa es utilizar el proceso de oxidación húmeda catalítica con peróxido de hidrógeno, donde actualmente se está utilizando mucho como reactivo, tanto el óxido de hierro (Fe_2O_3) u óxido de titanio (TiO_2) (Valero Muñoz, 2018).

En la provincia del Chubut, los derrames de petróleo a veces se dejan dispersar y degradar naturalmente, y los tratamientos de limpieza se inician cuando el derrame ocurre en áreas de importancia económica o biológica. Las acciones de respuesta ante un derrame de petróleo incluyen remoción mecánica, tratamiento químico, biodegradación mejorada y restauración, adición de productos químicos al petróleo flotante con el propósito de gelificar, agrupar o dispersar el aceite y modificar sus efectos esperados. Los productos químicos en sí mismos a menudo tienen cierta toxicidad, y en el caso de los dispersantes, el movimiento del petróleo hacia la columna de agua se acelera enormemente.

Las prácticas de biodegradación están evolucionando a través de la experimentación, pero la práctica más común, es la estimulación de poblaciones microbianas autóctonas mediante la aplicación de nitrógeno suplementario, o fósforo a petróleo en tierra o agua. Cuando el sitio a remediar no posee usos conocidos, o el agua subterránea no se utiliza para consumo humano, se presentan las discusiones con relación a la realización de la remediación o al punto final que debe alcanzar una remediación.

8. Análisis forense ambiental

El análisis forense ambiental es una multidisciplina, donde se integran los métodos químicos, físicos y biológicos dentro de un marco legal, para determinar el origen y alcance de la contaminación ambiental que se está estudiando (Mudge, 2008).

Al momento de buscar determinar responsabilidades respecto a un evento contingente ocurrido durante actividades asociadas a la industria petrolera, existen diversos puntos de partida para recopilar la información requerida. Es necesario reconstruir la historia del sitio donde haya ocurrido el derrame, para poder así determinar las condiciones del lugar previas al evento y poder hacer un análisis comparativo respecto a las condiciones luego del evento que lo afectó. La historia del lugar puede brindar información clara acerca del origen del problema, y permitir vincular de alguna manera la presencia de los contaminantes y condiciones actuales del sitio, con los eventos ocurridos en el pasado.

En principio, cuando se requiere llevar a cabo el análisis forense en un sitio determinado afectado por contaminación, entre las técnicas forenses utilizadas para investigar estos problemas se pueden mencionar a modo resumen la interpretación de fotografías aéreas, digitalización de imágenes para la ubicación del lugar, trabajar con superposición en algunos casos de mapas catastrales, el uso de la línea de tiempo en el Google Earth para ver imágenes tanto actuales como históricas (Morrison, 2000a).

Los datos de imágenes satelitales pueden proporcionar una alternativa rentable a las costosas imágenes aéreas o las campañas de campo intensivas en mano de obra para monitorear los efectos de los derrames de petróleo (Khanna *et al.*, 2018).

Las fotografías aéreas son herramientas valiosas para la evaluación ambiental porque brindan documentación objetiva y detallada de las condiciones de la superficie en un momento específico. Además, por lo general se pueden obtener incluso en los casos en que se deniega el acceso a los investigadores sobre el terreno. Se puede recopilar información cuantitativa precisa mediante fotogrametría. Dichos datos de medición y posición se pueden producir en formato digital para ingresarlos en un Sistema de Información Geográfica (SIG) para su análisis y visualización computarizados.

65

Otra información derivada de fotografías aéreas requiere experiencia y habilidades fotointerpretativas especializadas. Estos incluyen el reconocimiento de la mortalidad de la vegetación, el daño por derrames de petróleo y la calidad ecológica de los cuerpos de agua.

La ubicación, la extensión y el cambio histórico de los sitios de desechos peligrosos se pueden documentar en mapas topográficos. Estos mapas a menudo se crean a partir de fotografías aéreas y muestran la extensión y la ubicación de las características del mundo real simbolizándolas; su principal ventaja es que pueden mostrar cosas que no son visibles desde el aire, mientras se omite información innecesaria y que distrae. Debido a que los mapas son productos derivados, pueden contener sesgos en el contenido y la presentación, y deben estar respaldados por una documentación cuidadosa y protocolos de control de calidad (Brilis *et al.*, 2000).

8.1. Compuestos presentes en el petróleo

La estructura química de los diferentes petróleos es similar, ya que todos están formados por cadenas de carbono e hidrógeno, sin embargo, las cantidades relativas de estos componentes es lo que varía en cada uno de ellos, y va a depender del origen de cada crudo. Esta variación se conoce como “huella digital”, y es única, debido a la variedad de condiciones geológicas y a la edad de la materia orgánica que le dio origen al petróleo (Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2017).

Conociendo la “huella digital” de una muestra de petróleo, se puede conocer su origen; estas huellas permiten llevar a cabo la comparación de características químicas entre las muestras de hidrocarburos (tanto del derrame como del petróleo de origen), y las muestras del sitio impactado, y en base a esto, evaluar el riesgo y hacer un seguimiento de los efectos ecológicos del evento contaminante (Wang & Stout, 2010).

Los diferentes tipos de petróleos pueden tener en su composición cantidades relativas de parafinas, hidrocarburos aromáticos y asfaltenos. Sus derivados se pueden identificar fácilmente a partir de sus trazas de GC durante las primeras etapas del derrame, especialmente cuando el petróleo es pesado y los niveles de hidrocarburos de fondo son bajos en un entorno afectado. Además de medir los HTP en las muestras, los cromatogramas GC-FID proporcionan la huella digital de los principales componentes del petróleo e información sobre su grado de meteorización (Wang & Fingas, 1997).

El siguiente paso, es la identificación del origen del derrame de petróleo. Por ejemplo, si se está investigando un derrame de petróleo crudo y se determina que una de las posibles fuentes sería combustible diésel, no hay necesidad de realizar más análisis ya que el CG/FID es suficiente para considerarlo como fuente del derrame. En los casos en que eso no pueda afirmarse, es preferible sumar otro tipo de análisis para que quede bien constatado. Lo mismo ocurre en los casos en que las semejanzas/diferencias entre el petróleo derramado y la fuente sospechosa no son evidentes, o hay un gran número de posibles fuentes involucradas, o el petróleo derramado ha sufrido gran intemperización y, por lo tanto, una alteración significativa en su composición química. En cualquiera de estos casos, el enfoque cualitativo es difícil de sostener; es preferible realizar un análisis cuantitativo de “fingerprints” y biomarcadores (Wang & Fingas, 2003).

8.2. Compuestos individuales específicos

Cuando se produce un derrame, inicia un mecanismo de defensa natural en los ecosistemas afectados conocido como meteorización, el cual promueve la remediación de las zonas afectadas por los componentes del crudo (Wang & Fingas, 1997; Tomas & Acuña, 2022).

Esto conlleva la reducción de las concentraciones de los hidrocarburos derramados en los sedimentos, y la alteración de su composición química. Estos cambios tienen profundos efectos sobre la toxicidad del petróleo derramado, y provocan un impacto biológico a lo largo del tiempo y, por lo tanto, dificulta su identificación residual en el medio ambiente afectado (Wang *et al.*, 1997).

En general, los analitos más específicos del petróleo que pueden ser utilizados para la identificación del origen de un derrame incluyen (Wang & Fingas, 2003):

- *Hidrocarburos saturados individuales*: incluyen n-alcenos (C₈ a C₄₀) e isoprenoides seleccionados, pristano y fitano.

- *Hidrocarburos volátiles*: se incluyen los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y tres isómeros de xileno) y bencenos alquilados (bencenos C₃ a C₅), parafinas e isoparafinas volátiles y naftenos (principalmente compuestos de ciclopentano y ciclohexano).
- *HAP parentales prioritarios de la EPA*: en particular, los homólogos alquilados (C₁-C₄) específicos del petróleo de HAP seleccionados (es decir, series de naftaleno alquilado, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno y criseno). Estos homólogos de HPA alquilados son la columna vertebral de la caracterización química y la identificación de las evaluaciones de derrames de hidrocarburos.
- *Biomarcadores de compuestos de terpano y esterano*: el análisis de los picos de iones seleccionados producidos por estos compuestos característicos y persistentes en el medio ambiente genera información de gran importancia para determinar la(s) fuente(s), el estado de meteorización y la tratabilidad potencial.

En muchos casos también se incluyen las mediciones de los HTP, las mezclas complejas no resueltas (UCM) y la relación de isótopos de carbono estable ($\delta^{13}\text{C}$).

En el caso de los biomarcadores, se trata de un grupo de moléculas que tienen la capacidad de permanecer estables y resistir las agresivas condiciones bajo las cuales se ha formado el petróleo que las contiene (Tomas & Acuña, 2022), por lo tanto, resistentes a los procesos de meteorización, tales como biodegradación, evaporación y demás. En general, los biomarcadores retienen gran cantidad de información del crudo original, lo cual revela información específica sobre la fuente del crudo derramado. Por lo tanto, las características químicas de la fuente y de los biomarcadores persistentes a la meteorización, proporcionan información de gran importancia para las investigaciones forenses ambientales al momento de determinar la fuente, diferenciar y correlacionar crudos (Wang & Stout, 2010; Tomas & Acuña, 2022).

Tomas & Acuña (2022) analizaron durante 9 meses la estabilidad ambiental de los biomarcadores de un crudo sometido a intemperización artificial en agua de mar y suelo, y probaron su utilidad en problemáticas vinculadas a derrames de petróleo, mediante el análisis de perfiles de biomarcadores por GC/MS a partir de un crudo previamente tratado con sílica gel en primer lugar y de su fracción alifática obtenida mediante separación por cromatografía sólido-líquido en columna en segunda instancia. Los resultados más el análisis de los cromatogramas obtenidos, indicaron que el proceso de meteorización predominante sobre la composición general del crudo fue la evaporación, sin embargo, los biomarcadores permanecieron inalterados a lo largo del tiempo de estudio, lo que demuestra su efectividad en la identificación de petróleos derramados ya que constituyen una huella química fiable y única para cada crudo.

8.3 Teledetección de derrames de petróleo

Una de las necesidades fundamentales para una rápida respuesta y limpieza luego de ocurrido un derrame de petróleo, es determinar su ubicación y distribución espacial. Como una herramienta económica y eficiente en tiempo, la técnica de teledetección es una buena opción (Li *et al.*, 2005). La teledetección se define como la observación a distancia de los objetos, sin estar en contacto directo con ellos. Las características químicas de los hidrocarburos posibilitan su identificación a través de su firma espectral (Cloutis, 1989; Montesdeoca, 2018).

La teledetección aplicada a derrames de petróleo se puede complementar con la ciencia forense y así poder documentar la hora y el lugar exactos del evento de derrame. Un instrumento muy útil es el fluorosensor láser, debido a su capacidad única para identificar positivamente el petróleo en los fondos de agua, suelo, hierbas, hielo y nieve, y permite diferenciar entre aceites ligeros y combustibles.

Otro sensor común y económico es un sistema infrarrojo/ultravioleta, es el sensor de menor costo, pero incapaz de detectar el petróleo bajo ciertas condiciones de iluminación. Por otra parte, los sensores de radar satelitales son útiles, especialmente para mapear grandes derrames, como por ejemplo aquellos ocurridos en alta mar (Fingas & Brown, 2016).

Extraer petróleo puede impactar seriamente las condiciones ambientales del paisaje, alterando patrones de drenaje, de uso y cobertura del suelo, así como contaminar el suelo y agua de las áreas en donde se desarrollan estas actividades.

El uso de técnicas de percepción remota (PR) y sistemas de información geográfica (SIG) en combinación con muestreo, análisis químicos de compuestos y otras técnicas geoambientales, han sido muy útiles para identificar y cuantificar los impactos creados por la actividad humana sobre la superficie terrestre. Las imágenes satelitales se han usado como un complemento para realizar inventarios de las zonas contaminadas en aquellos lugares en donde se carece de una información fidedigna sobre la extensión de las áreas afectadas.

En ocasiones, cuando los contaminantes tienen respuestas evidentes en las ventanas espectrales que manejan los sensores remotos, las técnicas de PR permiten obtener resultados más confiables que otras herramientas (particularmente trabajo de campo) y facilitan la ubicación geográfica de los lugares contaminados, lo que hace más sencillo su incorporación a los SIG para su posterior análisis (Bremer Bremer *et al.*, 2016).

Permiten visualizar áreas de grandes dimensiones de la superficie de la tierra. Estas imágenes no solo indican lo visible al ojo humano, sino que también revelan variaciones en la humedad del suelo, distribución de minerales o tipo de material, distribución de vegetación, tipo de suelo, entre otras (Galindo Ortiz & Rueda Bravo, 2015).

Los datos de PR incorporados a un SIG representan una poderosa herramienta para el manejo, estudio y modelación de áreas contaminadas. Asimismo, facilitan la obtención de mapas de los niveles de contaminación por las distintas actividades de la industria de las zonas que deben ser restituidas para permitir la ocupación humana o la restauración de los ecosistemas anteriormente presentes en el área. Con la disponibilidad de datos de alta resolución espacial del tipo Ikonos o Quickbird, se facilita la identificación de pequeñas zonas impactadas, que al sumarse pueden llegar a representar un porcentaje importante del área afectada y por tanto un volumen considerable para su remediación. (Bremer Bremer *et al.*, 2016).

Los avances de las tecnologías de sensado remoto pueden dar un soporte para acceder oportunamente a la información que prevenga que una situación de pequeña magnitud tome escalas impredecibles. Las técnicas que utilizan sensores ópticos son las más comunes para el sensado remoto por sus bajos costos, aunque también existen los sensores hiperespectrales para la identificación de firmas espectrales, sensores infrarrojos, tecnología UV, entre otros.

Las imágenes SAR tienen características que las diferencian de aquellas obtenidas desde sensores ópticos. Estas son propias de la generación de una imagen radar. En relación con las alternativas de monitoreo, el radar presenta ventajas principalmente para el monitoreo de grandes áreas y en condiciones nocturnas (Marzioletti, 2012).

8.3.1 Teledetección de derrames de petróleo asociado a estrés fitotóxico

En la utilización de teledetección el análisis de características espectrales de plantas contaminadas es una herramienta que permite evaluar y detectar de forma indirecta fugas de hidrocarburos (Sanchez *et al.*, 2013).

Las imágenes hiperespectrales de teledetección brindan suficiente resolución espectral para describir las firmas de absorción de diagnóstico (posición de la banda, profundidad, ancho y simetría) y permiten la diferenciación entre especies de vegetación y la separación de la vegetación de diferentes tipos de suelos y minerales.

La teledetección aplicada a la detección del estrés en la vegetación se basa en la respuesta de la vegetación a la radiación solar. En plantas sanas el efecto de la radiación solar es en general similar. Presentan una alta reflectancia de diagnóstico en la región del infrarrojo cercano de la radiación solar, debido a la fuente de dispersión interna de la luz incidente, desde las paredes celulares y los espacios intercelulares. Sin embargo, cuando las plantas se vuelven estresadas, el tejido del mesófilo comienza a secarse y las paredes celulares se colapsan, lo que da como resultado una superficie intercelular y un espacio de aire sustancialmente reducidos. Las plantas senescentes y estresadas reflejan más luz roja, pero mucho menos en la región del infrarrojo cercano en comparación con las plantas verdes sanas (Li *et al.*, 2005).

Se recomienda utilizar especies de plantas que se adapten a condiciones ambientales muy diferentes, siendo una posible propuesta plantarlas a lo largo de tuberías y otras instalaciones relacionadas con el petróleo, para detectar posibles fugas (Sanches *et al.*, 2013).

Para detectar y llevar un seguimiento del impacto generado ante un derrame de hidrocarburo en el suelo y como consecuencia, que afecte la vegetación, es viable la aplicación de técnicas espectrales de vegetación. Un ejemplo es la reflectancia espectral de la vegetación, tomando datos desde Landsat 8 para llevar a cabo el cálculo de índices de vegetación, y así llevar a cabo un análisis espacial y temporal de los sitios que han sufrido derrames de petróleo.

Se han utilizado varias técnicas de detección remota para detectar los impactos de derrames de petróleo en la vegetación, incluidos los índices de vegetación (Li *et al.*, 2005). Khanna *et al.*, (2013) utilizó índices de vegetación para detectar el estrés de la misma en una zona de humedales de EEUU, y demostraron su factibilidad al momento de determinar la variación en los espectros de la vegetación afectados por contaminación con petróleo.

Adamu *et al.*, (2018) consideran que existe un gran potencial en el uso de índices de vegetación derivados de Landsat 8 para la detección y el seguimiento de derrames de petróleo en entornos dedicados a la explotación de este recurso. A su vez, podría también ser útil para monitorear el cumplimiento ambiental en áreas productoras de petróleo donde los sitios contaminados puedan llegar a requerir tareas de remediación, saneamiento o limpieza de los suelos.

También se requiere considerar otros factores, tales como variaciones en el entorno físico local, el tipo de especies que dominan la región ya que todas responden de manera diferente ante un derrame de petróleo, y también considerar el tipo de petróleo ya que de esto depende la severidad de afectación en las plantas.

Es una opción más que viable la de aplicar esta técnica ya que podría aplicarse para una respuesta de mitigación temprana y de esta manera, reducir el impacto en el medio ambiente antes de que cause un daño a gran escala (Adamu *et al.*, 2018).

Khanna *et al.* (2018) mencionan que, si bien los datos multiespectrales pueden ser suficientes para detectar la extensión del sitio afectado por derrames de hidrocarburos, la alta resolución espectral y espacial, las características del sensor de alta calidad y la capacidad de controlar el tiempo de adquisición de imágenes pueden mejorar la evaluación y el seguimiento del estrés de la vegetación y recuperación post derrames de petróleo. Aseguran que las imágenes de sensores multiespectrales son relativamente más económicas que las imágenes hiperespectrales y ahora suelen estar disponibles con una resolución espacial fina, lo que las convierte en una excelente herramienta para mapear el impacto y monitorear la recuperación de los ecosistemas después de desastres ambientales como derrames de petróleo.

Dado que ningún sensor tiene todas las características necesarias para detectar el alcance, el impacto y la recuperación de los derrames de petróleo, es importante determinar qué sensor es mejor para los objetivos de un proyecto en particular.

Si el objetivo es mapear el alcance del impacto del petróleo, sensores como WorldView2 y RapidEye, o incluso Landsat, son suficientes si el impacto es generalizado.

Si el objetivo fuera detectar el estrés de la vegetación, y delimitar el área afectada para el tratamiento, entonces sería importante tener una alta resolución espectral y espacial recolectada en el momento óptimo para revelar el estrés, ya que estas características permiten detectar incluso diferencias sutiles en la condición de la vegetación (Khanna *et al.*, 2018).

8.4 Comportamiento de las plantas en suelos contaminados con petróleo

En las plantas, los hidrocarburos reducen la germinación de las semillas y la translocación de nutrientes, e inducen estrés oxidativo, alteran la actividad metabólica e inhiben su fisiología y morfología, que, en última instancia, reducen el rendimiento de la planta (Haider *et al.*, 2021).

Rivera-Cruz & Trujillo-Narcía (2004) indican que el estudio del comportamiento de plantas en suelos contaminados con petróleo permite identificar y seleccionar especies fitoindicadoras de tal contaminación. Determinaron experimentalmente cuales eran las mejores especies fitoindicadoras de niveles tóxicos en un suelo afectado por petróleo, enfocado en la diversidad, cobertura y productividad de una pradera en México.

Realizaron tres experimentos secuenciales en plántulas durante 32 días de exposición al petróleo, y en plantas durante 150 días de exposición, en arreglo factorial y diseño al azar, con las especies *Echinochloa polystachya*, *Brachiaria mutica*, *Cyperus articulatus*, *Cyperus sp.* y *Mimosa pigra*.

Se prepararon tres concentraciones (50000, 100000 y 150000 mg·kg⁻¹) para compararlas con el petróleo intemperizado (79457mg·kg⁻¹). Se evaluaron germinación, altura, longitud de raíz, biomasa y número de nódulos. Hubo diferencias significativas en todas las variables en las plántulas y plantas de las cinco especies. La germinación se asoció positivamente con las mayores concentraciones de petróleo intemperizado, pero se redujeron crecimiento, longitud de la raíz, biomasa y número de nódulos en plántulas. En plantas todas las variables fueron reducidas. Concluyen que las especies más sensibles, mejores fitoindicadoras de niveles tóxicos, fueron *E. polystachya* y *B. mutica* en plántulas, y *M. pigra* en plantas.

8.4.1 Estrés vegetal como indicador de derrames de hidrocarburos

No existe en abundancia información referente a monitoreos crónicos a largo plazo que investiguen el cambio o afectación que se produce sobre la cubierta vegetal inducido por el petróleo, posiblemente debido a la falta de una serie temporal de datos hiperespectrales y métodos confiables para extraer información acerca de cambios/estrés para el análisis de datos de detección remota.

Además, se suma a las complicaciones que existen para llevar a cabo análisis en suelos debido a la existencia de heterogeneidad espacial en la cubierta y el tipo de vegetación, y la posibilidad de una variabilidad considerable en el crecimiento entre años debido a las condiciones climáticas (Li *et al.*, 2005).

La detección del estrés de la vegetación que es inducido por el petróleo se puede utilizar para localizar la distribución espacial de los derrames de petróleo en la tierra (Li *et al.*, 2005 y Khanna *et al.*, 2013). El estado de la vegetación se puede utilizar como indicador indirecto de fugas en tuberías subterráneas (Sanches *et al.*, 2013).

Los derrames de petróleo en el entorno natural inmediato pueden inducir estrés en la vegetación natural circundante (Li *et al.*, 2005; Adamu *et al.*, 2018). Por lo tanto, cualquier alteración en el ciclo biogeoquímico de la planta debido al impacto del petróleo, puede usarse como un indicador para detectar la presencia de contaminación (Adamu *et al.*, 2018).

La variación en la clorofila es considerada como un indicador de estrés de la planta. Las fugas de HC pueden cambiar considerablemente la concentración de clorofila de las plantas afectadas, potenciando la detección indirecta mediante la utilización de un análisis espectral (Sanches *et al.*, 2013).

En general, todas las plantas parecen responder al estrés de manera similar (por ejemplo, disminución en la tasa de crecimiento y en la tasa de adquisición de todos los recursos), independientemente de qué lo causa (Chapin, 1991; Carter, 1993).

Son varios los efectos que se observan en plantas que son cultivadas en suelos con HC, pero en la mayoría de los casos, los principales factores que suelen verse afectados son el crecimiento (se torna débil), los cambios en la estructura de las hojas acompañado de la degradación de la clorofila, la consecuente la variación de su color, y caída de las hojas (Sanches *et al.*, 2013).

9. Conclusiones

Las actividades asociadas a la extracción de petróleo siempre tienen un mínimo de riesgo de impacto ambiental, a pesar de la existencia de normativa aplicable para la protección del ambiente, los eventos contingentes son impredecibles en la mayoría de los casos. En consecuencia, se produce el ingreso de los contaminantes provenientes del petróleo en las esferas o compartimentos ambientales, de los cuales, el presente trabajo hace enfoque en la afectación del suelo.

La recopilación de información acerca de la legislación vigente a nivel nacional, provincial y municipal permitió verificar que existe normativa asociada a derrames de petróleo en suelos, y a su vez, que existe legislación nacional asociada a la aplicación de bioensayos, sin embargo, no se registró la existencia de normativa a nivel provincial asociada a su aplicación. En función de esto, se considera que sería conveniente su inclusión, tanto a nivel provincial como municipal, ya que permitiría tener un indicador adicional a los métodos cuantitativos ya existentes.

Existen muchas metodologías de muestreo y técnicas analíticas específicas utilizadas en suelos empetrolados de la región, sin embargo, se considera necesario hacer hincapié en la necesidad de contar con un manual o protocolo específico de procedimientos para ensayos de tipo biológicos, a modo de indicador de fitotoxicidad de los suelos contaminados por hidrocarburos.

Se sabe que la especie más utilizada en la implementación de bioensayos en suelos empetrolados es *Lactuca Sativa*, sin embargo, se podría evaluar como una posibilidad la implementación de especies autóctonas de la región a la hora de realizar ensayos de fitotoxicidad en suelos contaminados por la industria, para verificar su comportamiento en las condiciones de extrema aridez y déficit hídrico que rigen en la región, por lo que podrían ser aprovechadas a la hora de llevar a cabo el procedimiento del ensayo.

De los tipos de tratamientos aplicables en suelos contaminados con petróleo, en la provincia del Chubut los más utilizados por las operadoras contemplan actividades asociadas principalmente a tareas de biorremediación y biopilas, aunque también hay registro de la aplicación de las técnicas de bioaumento, landfarming, y fitorremediación. Si bien no son los más comúnmente utilizados, también se han reportado casos que han implementado la solidificación / estabilización y fotodegradación, según diferentes autores citados.

Al momento de realizar un análisis forense, cuando se busca aplicar técnicas de bajo costo y que permitan la fácil accesibilidad a la información, se considera como la opción más viable la utilización de fotografías aéreas, también la digitalización de imágenes en complemento con indicadores de estrés vegetal, utilización de técnicas de teledetección mediante diferentes tipos de sensores, en algunos casos teniendo en cuenta la vegetación, lo que a su vez, permite complementar la teledetección de derrames de petróleo asociado a estrés fitotóxico. Todas las mencionadas, constituyen herramientas a seleccionar según el enfoque que se requiera, para determinar el origen y alcance de los derrames de petróleo en suelos. Los trabajos que citan información acerca de la teledetección de derrames en función del estrés fitotóxico, son una clara posibilidad de complemento con la información de bioensayos, ya que no solo son indicativos para detectar y localizar la distribución espacial de un derrame de petróleo en el suelo, sino que también, en combinación con información cuantitativa de la determinación de HTP del sitio evaluado, permitiría a futuro brindar información en detalle, por ejemplo, de la situación de un sitio que haya sido sometido a tareas de saneamiento.

En base a lo mencionado, el presente trabajo presenta un procedimiento que permita desarrollar un ensayo fitotóxico de referencia estandarizado, aplicable a suelos empetrolados, y que tal vez haga su enfoque en especies de la región, para tener una mejor aproximación del efecto que causa un derrame sobre las comunidades autóctonas y, por lo tanto, el establecimiento de niveles umbrales o guía específicos para dicha sustancia, y facilitar la elaboración de un procedimiento específico para el bioensayo.

Se podría inferir que ocurrido un derrame de petróleo, si se cuenta con la información de cuantificación de los niveles de HTP para detectar su concentración en el suelo, como también lo dispuesto en el Decreto N° 1005/16, y con información de la toxicidad que presenta el suelo, se podría a futuro brindar información en detalle, por ejemplo, de la situación de un sitio que haya sido sometido a tareas de saneamiento, y conocer el verdadero estado del suelo luego de efectuadas las tareas de una remediación.

10. Bibliografía

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian journal of petroleum*, 25(1), 107-123.
- Adams, R.H., Zavala-Cruz, J., & García, F.A.M. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II: afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia*, 33(7), 483-489.
- Adamu, B., Tansey, K., & Ogutu, B. (2018). Remote sensing for detection and monitoring of vegetation affected by oil spills. *International Journal of Remote Sensing*, 39(11), 3628-3645.
- Adenipekun, C.O., Oyetunji, O.J., & Kassim, L.S. (2008). Effect of spent engine oil on the growth parameters and chlorophyll content of *Corchorus olitorius* Linn. *The Environmentalist*, 28(4), 446-450.
- Aggio, C., Lengyel, M., Milesi, D., & Pandolfo, L. (2017). Desafíos y oportunidades de innovación en la producción de Petróleo y Gas No Convencionales en la Argentina. Documento de Trabajo N°, 10.
- Alexander, M. (1994). Biodegradation and bioremediation. *Academic Press*, San Diego. 302 pp.
- Alvaro, C.E.S., Arocena, L.A., Martínez, M.Á., & Nudelman, N.E.S. (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.
- Aranda, E.A. (2010). Curso de Facilidades de Superficie. Convenio Sena-Ecopetrol S.A.
- Arias-Trinidad, A., Rivera-Cruz, M.D.C., & Trujillo Narcía, A. (2017). Fitotoxicidad de un suelo contaminado con petróleo fresco sobre *Phaseolus vulgaris* L. (*leguminosae*). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(3), 411-419.
- ATSDR (Agency for toxic substances & Disease Registry). (1999). Toxicological Profile Information of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH).
- Avilan Ayala, A. (2007). Implementación de surfactantes como método de tratamiento para aguas subterráneas contaminadas con DNAPLs. Recuperado de: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/112
- Banks, M. K., & Schultz, K. E. (2005). Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. *Water, air, and soil pollution*, 167(1), 211-219.
- Barquín, M., Ríos, S. M., & Nudelman, N. (2011). Test de toxicidad sobre la especie *Atriplex lampa*, su aplicación para la evaluación de riesgo asociado a derrames de petróleo en suelos de la Patagonia. *Revista de Toxicología*, 28(2), 135-139.
- Blasetti, H., Katusich, O., Ríos, S.M. (2019). Evaluación ecotoxicológica con *Lactuca sativa* de sorbentes para petróleo AA2019 IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental realizado en Florencio Varela, Argentina en 2019.

Blasetti, H., & Katusich, O. (2021). Evaluación de la fitotoxicidad de la fracción soluble de petróleo en suelos áridos en presencia de un sorbente híbrido arcilla-alga (*Codium fragile*) sobre semillas de lechuga (ACI1387-21), aceptado para la publicación en Avances en Ciencias e Ingeniería, octubre diciembre 2021.

Bernard, I. O., García, J. S., Valiño, M. D., & Fernández, S. V. (2017). Técnicas de recuperación de suelos contaminados. 109. Bernard, O., Irene, J. S. G., Valiño, M. D., & Fernández, S. V. (2007). Técnicas de recuperación de suelos contaminados. *Informe de Vigilancia Tecnológica. Universidad de Alcalá. Dirección General de Universidades e Investigación. España.*

Biancucci Fiorenza, G. S. (2009). Herramientas para la gestión ambiental del arroyo Las Tunas en su trayecto por el Parque Industrial General Belgrano de la ciudad de Paraná-Entre Ríos, Argentina.

Blanco, C. F. M., Natera, J. R. M., & Morales, F. B. P. (2006). Crecimiento de plántulas de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) en dos suelos contaminados con petróleo. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 19(1).

Bojes, H. K., & Pope, P. G. (2007). Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47(3), 288-295.

Bremer Bremer, M.H., Lozano García, D.F., Rodríguez García, M., & Hori Ochoa, M.D.C. (2016). Caracterización de niveles de contaminación en una planta extractora de azufre utilizando imágenes de satélite de alta resolución para optimizar el plan de muestreo. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32(2), 165-176.

Brilis, G.M., Gerlach, C.L., & van Waasbergen, R.J. (2000). Remote sensing tools assist in environmental forensics. Part I: traditional methods. *Environmental Forensics*, 1(2), 63-67.

Brito, O.O., Ize, I., & Gavilán, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta ecológica*, (69), 83-92.

Brutti, L.N., Beltran, M. J., & García de Salamone, I. (2018). Biorremediación de los recursos naturales. Ediciones INTA. Recuperado de: <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/4027>

Cantero, J., Videla, S., Gálvez, J., Vardaro, S., Tettamanti, G., López, A., & Ercoli, E. (2005). Límites prácticos de biorremediación de suelos afectados por Petróleo.

Cárdenas Sánchez, J.A. (2015). Estandarización de la cuantificación en la biodegradación de BTEX (Bachelor's thesis, Bogotá-Uniandes).

Carrquiriborde, P. (2021). Principios de Ecotoxicología. Libros de Cátedra. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Recuperado de: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/118183>

Caro Alba, D.A. (2020). *Evolución de la logística internacional en la exportación de petróleo en el mercado mundial* (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).

Carter, G.A. (1993). Responses of leaf spectral reflectance to plant stress. *American journal of botany*, 80(3), 239-243.

Celorio Zurita, K. (2016). *Remediación del derrame de crudo en el recinto Winchele desde una perspectiva ambiental y social* (Doctoral dissertation, Ecuador-PUCESE-Escuela de Gestión Ambiental).

Chan-Quijano, J.G., Jarquín-Sánchez, A., Ochoa-Gaona, S., Martínez-Zurimendi, P., López-Jiménez, L.N., & Lázaro-Vázquez, A. (2015). Directrices para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Teoría y Praxis*, (17), 123-144.

Chapin III, F.S. (1991). Effects of multiple environmental stresses on nutrient availability and use. *Response of plants to multiple stresses*.

Cloutis, E.A. (1989). Spectral reflectance properties of hydrocarbons: remote-sensing implications. *Science*, 245(4914), 165-168.

Coria, I.D. (2007). Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Universidad Abierta Interamericana. Centro de Altos Estudios Globales.

Cruz, J. M., Tamada, I.S., Lopes, P.R.M., Montagnolli, R.N., & Bidoia, E.D. (2014). Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(5), 1-9.

Cuéllar, J.A.G., Sánchez, F.A., Vázquez, S.H., & Cota, D.B.L. (2004). Impacto ecológico de la industria petrolera en la Sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia*, 29(6), 311-319.

De Dicco, R. (2014). Indicadores Upstream de Hidrocarburos de Argentina, enero de 2014. Documento de Trabajo del Observatorio de la Energía, Tecnología e Infraestructura para el Desarrollo (OETEC) y Centro Latinoamericano de Investigaciones Científicas y Técnicas (CLICET). San Carlos de Bariloche.

Díaz Rodríguez, Y., Acosta Díaz, S., Díaz Díaz, M., Rivas Trasancos, L., Cañete, C., & Romero Silva, R. (2022). Evaluación de la toxicidad y biodegradabilidad de un fluido base agua para su disposición final. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 43(1), 38-47.

Dorn, P.B., Vipond, T.E., Salanitro, J.P., & Wisniewski, H.L. (1998). Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, Microtox®, and plants. *Chemosphere*, 37(5), 845-860.

Dorn, P.B., & Salanitro, J.P. (2000). Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere*, 40(4), 419-426.

Echeverry, P.B., & Pinilla, C.C. (2007). Evaluación de *Lactuca sativa* y *Selenastrum capricornutum* como indicadores de toxicidad en aguas. *Universitas Scientiarum*, 12(2), 83-98.

Eibes, G., Cajthaml, T., Moreira, M.T., Feijoo, G., & Lema, J.M. (2006). Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere*, 64(3), 408-414.

El-Tarabily, K.A. (2002). La actividad microbiana total y la composición microbiana de un sedimento de manglar se reducen por la contaminación por petróleo en un sitio en el Golfo Árabe. *Revista canadiense de microbiología*, 48 (2), 176-182.

Emiliozzi, I. (2000). El abecé del Petróleo y del Gas. Buenos Aires, Instituto Argentino del Petróleo y del Gas.

Fain Binda, V., Butti, M., & Torti, M.J. (2018). Índice de germinación como indicador de madurez en compost de residuos de incubación.

Fernández, M.D., Cagigal, E., Vega, M.M., Urzelai, A., Babín, M., Pro, J., & Tarazona, J.V. (2005). Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 62(2), 174-184.

Figari, E., Strelkov, E., Cid de La Paz, M.S., Celaya, J., Laffitte, G., & Villar, H. (2002). Cuenca del Golfo San Jorge: Síntesis estructural, estratigráfica y geoquímica. In *Geología y Recursos Naturales de Santa Cruz. Relatorio del XV Congreso Geológico Argentino*. El Calafate (Vol. 3, No. 1, pp. 571-601).

Fingas, M., & Brown, C.E. (2016). Oil spill remote sensing: A forensics approach. In *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics* (pp. 961-981). Academic Press.

Fortunato, R. H. (2018). Propuesta de remediación con revegetación en área alterada por la actividad petrolera: desfiladero bayo, rincón de los sauces.

Freites, M., Pernia, B., Rojas, D., Naranjo, L., Díaz, M., Fusella, E., & Sena, I. (2012). Evaluación de las variaciones en la fitotoxicidad de un suelo impactado con hidrocarburos posterior a su tratamiento con una nueva Tecnología de Saneamiento. Guía para la toma de muestras de suelo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Recuperado de: http://alago.org/alago/docs/ALAGO_2012

Galindo Ortiz, N.J., & Rueda Bravo, C.A. (2015). Caracterización mecánica de suelos arcillosos afectados por derrames superficiales de hidrocarburos en concentración por porcentaje en peso: 5, 10, 15 y 30.

Gomez, N.E. (2018). *Técnicas avanzadas para la caracterización de petróleos pesados, productos derivados y sus fracciones: aplicaciones en ingeniería de yacimientos y medio ambiente* (Doctoral dissertation, Universidad de Huelva).

Gonzales Bellido, J.F. (2018). Estudio de la contaminación de suelos por residuos de hidrocarburos y propuesta de manejo ambiental de los talleres de mecanica automotriz del Distrito de San Jerónimo-Cusco.

González-Rojas, E.H. (2011). Concepto y estrategias de biorremediación. INGE@ UAN-Tendencias en la Ingeniería, 1(2).

Goya Castro, N.I. (2020). *Análisis de las estrategias para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo (TPH)* (Master's thesis, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil).

Gutiérrez Ramírez, C.A., (2017). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos empleando lodos de aguas residuales como fuente alterna de nutrientes.

Haider, F.U., Ejaz, M., Cheema, S. A., Khan, M. I., Zhao, B., Liqun, C., & Mustafa, A. (2021). Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: Sources, impacts and remediation strategies. *Environmental Research*, 197, 111031.

Hernández, G.E.C., Dávila, M.L., Giraldo, F.M., & Orjuela, J.H. (2015). Estudio y modelación del impacto ambiental asociado al derrame accidental de crudo en un ducto en condiciones topográficas de alta pendiente (Doctoral dissertation, Uniandes).

Hernández-Valencia, I., Lárez, L.M., & García, J.V. (2017). Evaluación de la toxicidad de un suelo contaminado con diferentes tipos de crudos sobre la germinación de dos pastos tropicales. *Bioagro*, 29(2), 73-82.

Hoekstra, N.T., Bosker. T. & Lantinga, E.A. (2002). Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). *Agricult. Ecosys. Environ.*, 93, 189-196.

Huaiquilaf, B.C. (2008). Contaminación de aguas subterráneas por hidrocarburos líquidos livianos en fase no acuosa. *Ciencia, Ahora*, 22, 20-29.

Huanca Arocutipá, S.Y. (2016). Determinación de la concentración de la inhibición media (CE₅₀₋₉₆) y el efecto fitotóxico del arseniato de sodio (NaH₂AsO₄H₂O) en *Lactuca sativa* (lechuga) mediante bioensayos, en la provincia de Tacna.

Imam, A., Suman, S.K., Ghosh, D., & Kanaujia, P.K. (2019). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 118, 50–64.

Infoleg – Información Legislativa y Documental | Centro de Documentación e Información del Ministerio de Economía y Finanzas Públicas. República Argentina. (2020). Recuperado de: <http://www.infoleg.gob.ar/>

Islas-García, A., Peralta-Rodríguez, M., Vega-Loyo, L., López-Aguilar, R., & Rodríguez-Vázquez, R. (2018). Biorremediación por bioestimulación y bioaugmentación con microorganismos nativos de un suelo agrícola contaminado con hidrocarburos. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 1(1).

Johnson, G.W., Ehrlich, R., Full, W., & Ramos, S. (2015). Principal components analysis and receptor models in environmental forensics. In *Introduction to environmental forensics* (pp. 609-653). Academic Press.

Kacem, M., Esrael, D., Boeije, C.S., & Benadda, B. (2019). Multiphase flow model for NAPL infiltration in both the unsaturated and saturated zones. *Journal of Environmental Engineering*, 145(11), 04019072.

Khanna, S., Santos, M. J., Ustin, S. L., Koltunov, A., Kokaly, R. F., & Roberts, D. A. (2013). Detection of salt marsh vegetation stress and recovery after the Deepwater Horizon oil spill in Barataria Bay, Gulf of Mexico using AVIRIS data. *PloS one*, 8(11), e78989.

Khanna, S., Santos, M. J., Ustin, S. L., Shapiro, K., Haverkamp, P. J., & Lay, M. (2018). Comparing the potential of multispectral and hyperspectral data for monitoring oil spill impact. *Sensors*, 18(2), 558.

Labud, V., Garcia, C., & Hernandez, T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66(10), 1863-1871.

Lavariás, S. M. L. (2005). Efectos de la fracción hidrosoluble del petróleo sobre algunos aspectos de la biología y el metabolismo de *Macrobrachium borellii* (Crustacea: decapoda) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Lee, C., Hong, S., Noh, J., Lee, J., Yoon, S.J., Kim, T., Khim, J.S. (2019). Comparative evaluation of bioremediation techniques on oil contaminated sediments in long-term recovery of benthic community health. *Environmental Pollution*, 252, 137–145.

Leitgib, L., Kálmán, J., & Gruiz, K. (2007). Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere*, 66(3), 428-434.

Lens, P., Grotenhuis, T., Malina, G., Tabak, H. (2005). Soil and sediment remediation: Mechanisms, technologies and applications. Recuperado de: <https://books.google.com.co/books?id=T2e09Dn45U8C&pg=PA151&dq=ex+situ++bioremediation&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj7k9Hgh9DpAhWFmAKHVSOC8gQ6AEIKDAA#v=onepage&q=ex%20situ%20%200&f=false>

Lexow, C., Vallejos, G. P., Tonelli, S., & Carrica, J. (2016). Dispersión de hidrocarburos disueltos en el acuífero freático a partir de la fase libre no acuosa. *Revista de Geología Aplicada a la Ingeniería y al Ambiente*, (37), 67-75.

Li, L., Ustin, S.L., & Lay, M. (2005). Application of AVIRIS data in detection of oil-induced vegetation stress and cover change at Jornada, New Mexico. *Remote Sensing of Environment*, 94(1), 1-16.

López Alfonsín, M. (2017). Hidrocarburos. Las provincias no asumen su rol principal en el federalismo ambiental argentino. *Revista Iberoamericana de Derecho Ambiental y Recursos Naturales*, 25

-
- López Cristeche, J.M. (2019). Plan de negocios: producción de LPG en Cerro Dragón.
- López, G.P.M., Gómez, P.M., & Duaso, A.I.H. (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) i: toxicity, population exposure and involved foods. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(1), 1.
- López González, R., Álvarez, M., & de Tabasco, A. (2018). Fotodegradación de pirimidinas empleando nanoparticulas de TiO₂-SiO₂. II *Foro: avances de la nanotecnología en biomedicina y medio ambiente*, 36.
- Lovecchio, J.P. (2015). Petróleo y gas en la Argentina: cuencas productivas. Asociación de geólogos y geofísicos del petróleo. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/282859330_Petroleo_y_gas_en_la_Argentina_cuencas_productivas
- Loya Del Angel, D.I. (2013). Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos.
- Luque, J. (2009). Desempeño de cuatro especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos en Patagonia. Buenos Aires.
- Luque, J., Ciano, N.F., Nakamatsu, V.B., Amari, M. & Lisoni, C. (2012). Saneamiento de derrames de hidrocarburos por la técnica de biodegradación "in situ" en Patagonia, Argentina. Recuperado de: <https://inta.gob.ar/documentos/saneamiento-de-derrames-de-hidrocarburos-por-la-tecnica-de-biodegradacion-in-situ-en-patagonia-argentina>
- Maila, M.P. & Cloete T.E. (2005) The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants- perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55:1–8.
- Maila, M.P., Randima, P., Drønen, K., & Cloete, T.E. (2006). Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(2), 303-310.
- Mamani Cariapaza, I.M., & Vargas Villalva, G.F. (2019). Modelo Unidimensional para Transporte de Elementos Contaminantes en Diferentes Tipos de Suelos.
- Martin, L., & Pozo, M. (2018). Bioensayo de germinación de lactuca sativa y calidad de agua del área regadía del Río Mendoza.
- Marzioletti, P. (2012). Monitoreo de derrames de hidrocarburos en cuerpos de agua mediante técnicas de sensado remoto. *FaMAF*.
- Mateo, A. (2019). Tributos ambientales a la extracción y consumo de petróleo en Argentina (Bachelor's thesis).
- McBride, M.B. (1994). *Environmental Chemistry of Soils*. New York Oxford. USA. Vol. 141580, pág. 5263
- Menone, M.L., Iturburu, F. G., Demetrio, P. M., Venturino, A., Pedrozo, F. L., Temporetti, P. F., & Collins, P. A. (2021). Calidad del agua y niveles guía para la protección de la biodiversidad acuática. Interacción entre ciencia y gestión.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., & Infante, C. (2004). Phytoremediation in the tropics—the effect of crude oil on the growth of tropical plants. *Bioremediation Journal*, 8(3-4), 177-184.
- Meudec, A., Dussauze, J., Deslandes, E., & Poupart, N. (2006). Evidence for bioaccumulation of PAHs within internal shoot tissues by a halophytic plant artificially exposed to petroleum-polluted sediments. *Chemosphere*, 65(3), 474-481.

Mohan, B.S., & Hosetti, B.B. (1999). Aquatic plants for toxicity assessment. *Environmental research*, 81(4), 259-274.

Montesdeoca, K. (2018). Bioremediación y monitoreo de suelos contaminados con Fueloil 6 usando pseudomonas aeruginosa y espectrometría de reflectancia difusa en el UV-VIS (Bachelor's thesis, Universidad Nacional de Chimborazo, 2018).

Morrison, R.D. (2000a). Critical review of environmental forensic techniques: Part I. *Environmental Forensics*. 1: 157-173.

Mudge, S.M. (Ed.). (2008). *Methods in environmental forensics*. CRC press.

Nogueira, L., Charvet Inckot, R., de Oliveira Santos, G., de Souza, L.A., & Bona, C. (2011). Phytotoxicity of petroleum-contaminated soil and bioremediated soil on *Allophylus edulis*. *Rodriguesia*, 459-466.

Nudelman, N. S., Ríos, S. M., & Katusich, O. (2008). Application of some physical organic chemistry models to the study of oil spills residues in Patagonian soils. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 21(4), 329-337.

Olea Rodríguez, M.E., & Rivera Alanya, K. L. (2014). Simulación del mercado argentino de petróleo y combustibles líquidos (Doctoral dissertation, Universidad Argentina de la Empresa).

Oliva, G. (2004). Tratamiento de suelos contaminados por derrames de petróleo INTA Informe N° 301. Santa Cruz, Recuperado de: https://www.produccion-animal.com.ar/suelos_ganaderos/16-tratamiento_suelos_contaminados_por_petroleo.pdf

Osoria Villa, F.C. (2018). Proyecto de investigación de descontaminación de suelos por diesel en el laboratorio de construcción Eptisa.

Pentreath, V., González, E., Barquín, M., Ríos, S.M., & Perales, S. (2015). Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Revista de salud ambiental*, 15(1), 13-20.

Pernía, B., Rojas-Tortolero, D., Sena, L., Sisto, A. D., Inojosa, Y., & Naranjo, L. (2018). Fitotoxicidad de HAP, crudos extrapesados y sus fracciones en Lactuca sativa: una interpretación integral utilizando un índice de toxicidad modificado. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(1), 79-91.

Petenello, M.C., & Feldman, S.R. (2012). Evaluación de la tolerancia a suelos contaminados con aceite diesel en especies vegetales con potencial biorremediado. *Acta Biológica Colombiana*, 17(3), 589-598.

Pezeshki, S.R., Hester, M.W., Lin, Q., & Nyman, J.A. (2000). The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environmental pollution*, 108(2), 129-139.

Planes, E.I., & Fuchs, J.S. (2015). Cuáles son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales.

Plaza, G., Nałęcz-Jawecki, G., Ulfing, K., & Brigmon, R.L. (2005). The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*, 59(2), 289-296.

Pujana, L. (2019). Procesos y principales contaminantes en operaciones de transporte y tratamiento de petróleo crudo en la provincia del Chubut. Trabajo final de la “Especialización en Química con mención en Diagnóstico Ambiental”. Dpto de Química. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Red de Buenas Prácticas Agropecuarias (BPA), (2021). Recomendaciones para muestreos de suelos. <https://bit.ly/3aYgSCD>

Ríos, S.M. (2005). Estudios sobre la evolución ambiental de hidrocarburos en suelos afectados por la explotación petrolera en la Patagonia Central. Tesis de doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Buenos Aires.

Ríos, S.M., & Nudelman, N. S. (2005). Multilayer sorption model for the interactions between crude oil and clay in Patagonian soils. *Journal of dispersion science and technology*, 26(1), 19-25.

Ríos, S.M., & Nudelman, N. S. (2008). Natural attenuation of oil spills in Patagonian soils. Characterization by ¹H NMR spectroscopy. *Environmental technology*, 29(1), 23-33.

Rivera-Cruz, M.D.C., & Trujillo-Narcía, A. (2004). Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia*, 29(7), 369-376.

Romaniuk, R.I., Giuffré, L., & Constantini, A. (2018). Suelos contaminados con hidrocarburos: un caso de estudio en Brutti, L. N., Beltran, M. J., & García de Salamone, I. (2018). Biorremediación de los recursos naturales. Ediciones INTA.

Sabbatella, I. (2018). Restricción externa durante el período posneoliberal: el caso del gasoil. *Realidad Económica*, 318, 59-99.

Salanitro, J.P., Dorn, P.B., Huesemann, M.H., Moore, K.O., Rhodes, I.A., Rice Jackson, L.M., ... & Wisniewski, H.L. (1997). Biorremediación de hidrocarburos de petróleo crudo y evaluación de la ecotoxicidad del suelo. *Ciencia y tecnología ambientales*, 31 (6), 1769-1776.

Salinas-Martínez, A., De los Santos-Córdova, M., Soto-Cruz, O., Delgado, E., Pérez-Andrade, H., Háuad-Marroquín, L.A., & Medrano-Roldán, H. (2008). Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. *Journal of environmental management*, 88(1), 115-119.

Salomón, J.S.C. (2020). 2. Biorremediación de hidrocarburos saturados y aromáticos policíclicos. Libros Universidad Nacional Abierta ya Distancia, 32-49.

Sameghini, F. & Barquín, P. (2011). Golfo San Jorge: la remediación ambiental y la capacidad de respuesta, claves para resolver contingencias de la operación, *Peetrotecnia*, 60-69.

Sanches, I.D., Souza Filho, C.R., Magalhães, L.A., Quitério, G.C.M., Alves, M.N., & Oliveira, W.J. (2013). Unravelling remote sensing signatures of plants contaminated with gasoline and diesel: an approach using the red edge spectral feature. *Environmental pollution*, 174, 16-27.

Serrano Guzmán, M.F., Torrado Gómez, L.M., & Pérez Ruiz, D.D. (2013). Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *Revista Científica General José María Córdova*, 11(12), 233-244.

Sevilla, B. (2019). Demanda diaria de petróleo crudo a nivel mundial de 2006 a 2020. 11 noviembre de 2019. [Consultado el 30 de Diciembre de 2020]. Recuperado de: <https://es.statista.com/estadisticas/600689/demanda-mundial-diaria-de-petroleo-crudo/>

Sharifi, M., Sadeghi, Y., & Akbarpour, M. (2007). Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 4(4), 463-470.

Sirit, L. R., Ehrmann, E. U., & Infante, C. (2008). Comparación de dos métodos de bioensayos para evaluar toxicidad en suelo contaminado con hidrocarburos. *Isia*, 2(6).

Sobrero, M.C. (2010). Estudio de la fitotóxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Sobrero, M.C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). En: Castillo, G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Canadá: IDRC, IMTA 71-79.

Speight, J. G. (2001). Handbook of petroleum analysis (Vol. 156). New York: Wiley-Interscience.

Speight, J. G. (2006). La química y tecnología del petróleo. Prensa CRC.

Speight, J. G. (2011). Petrochemicals. Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes, 429-466. Doi: 10.1016/b978-0-7506-8632.10012-x

Speight, J.G. (2015). Handbook of petroleum product analysis. John Wiley & Sons.

Stinco, J. (2018). La jerarquización constitucional de la variable ambiental. Revista Iberoamericana de Derecho Ambiental y Recursos Naturales, 19. Recuperado de <https://ar.ijeditores>.

Tarache, A. (2011). Estudio de la evolución de toxicidad de suelos petrolizados durante un proceso de Biorremediación. *Trabajo de Grado Maestría en Química. USB. Valle de Sartenejas. 160p.*

Tomas, G., & Acuña, A. J. (2022). Estabilidad ambiental de biomarcadores del petróleo en suelo y agua de mar.

US Environmental Protection Agency (EPA). 2001 Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report. 10th Edition. Office of Solid Waste and Emergency Response. Recuperado de: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/10002V1F.PDF?Dockey=10002V1F.PDF>

Valero Muñoz, M.D.C. (2018). *Desarrollo de nuevos fotocatalizadores de dióxido de titanio para la fotodegradación de contaminantes en aguas utilizadas para el tratamiento post-cosecha de frutas* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Varjani, S.J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology*, 223, 277-286.

Velásquez Arias, J.A. (2017). Contaminación de suelos y cuerpos de agua por hidrocarburos en Colombia. Fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación.

Villanueva Osuna, L. (2015). La industria de los hidrocarburos: el sector upstream y la operación de lifting de un FPSO.

Volke Sepúlveda, T. & Velasco Trejo, J.A. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología.

Walter, I., Martínez, F. & Cala, V. (2006). Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. *Environ. Pollut.*, 139, 507-514.

Wang, W.C., & Freemark, K. (1995). The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 30(3), 289-301.

Wang, Z., & Fingas, M. (1997). Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 774(1-2), 51-78.

Wang, Z., Fingas, M., Owens, E. H., Sigouin, L., & Brown, C. E. (2001). Long-term fate and persistence of the spilled Metula oil in a marine salt marsh environment: Degradation of petroleum biomarkers. *Journal of Chromatography A*, 926(2), 275-290.

Wang, Z., & Fingas, M. F. (2003). Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine pollution bulletin*, 47(9-12), 423-452.

Wang, Z., & Stout, S. (2010). *Oil spill environmental forensics: fingerprinting and source identification*. Elsevier.

Wanner, P., Aravena, R., Fernandes, J., BenIsrael, M., Haack, E.A., Tsao, D.T., *et al.* (2019). Assessing toluene biodegradation under temporally varying redox conditions in a fractured bedrock aquifer using stable isotope methods. *Water research*, 165, 114986.

Yagual Barzola, K.R. (2020). *Técnicas de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos aplicables en el cantón Salinas* (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2020).

Yang, C., Brown, C. E., Hollebone, B., Yang, Z., Lambert, P., Fieldhouse, B., *et al* (2017). Chemical fingerprints of crude oils and petroleum products. *Oil Spill Science and Technology*, 2, 209-298.

Yu, Y., Liu, Y., & Wu, L. (2013). Sorption and degradation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(6), 4261-4267.

Zabaloy, M.F., & Martínez, C.K. (2019) El rol del estado y las políticas fiscales en la promoción de la transición energética en Argentina.