Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Relación entre materia orgánica, hierro, aluminio y manganeso y las algas acidófilas del Lago Caviahue, Neuquén, Argentina

Cabrera, Juan Manuel

2016-03-28

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Cabrera, Juan Manuel. (2016-03-28). Relación entre materia orgánica, hierro, aluminio y manganeso y las algas acidófilas del Lago Caviahue, Neuquén, Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Cabrera, Juan Manuel. "Relación entre materia orgánica, hierro, aluminio y manganeso y las algas acidófilas del Lago Caviahue, Neuquén, Argentina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-28.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Relación entre materia orgánica, hierro, aluminio y manganeso, y las algas acidófilas del Lago Caviahue, Neuquén, Argentina.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLOGICAS

Licenciado Juan Manuel Cabrera

Directoras: **Dra. Mónica Diaz**

Dra. Cecilia Rodríguez

Consejera de estudios: **Dra. Cecilia Rodríguez**

Lugar de trabajo: GECARA, Grupo de Estudios de Calidad de Agua y Recursos Acuáticos, INIBIOMA (CONICET-UNComahue), San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

Bariloche, febrero de 2016.
Fecha de defensa: 28 de marzo de 2016

1. Índice de contenido

Índice de figuras.....3

Índice de tablas.....4

Resumen.....5

Abstract.....6

Agradecimientos.....7

Listado de abreviaturas.....10

Introducción general.....13

Área de estudio.....17

Capítulo 1: Distribución del hierro y metales traza en las fases químicas del sedimento, modelado de la concentración de hierro en la columna de agua y determinación de la presencia de un de un sistema buffer de hierro en el Lago Caviahue.....24

Capítulo 2: Caracterización de los ácidos húmicos extraídos de los sedimentos del lago. Determinación de sus constantes aparentes de complejación con nueve metales.....64

Capítulo 3: Relación entre Keratococcus rhaphidioides y materia orgánica disuelta, hierro, manganeso y aluminio. Estudio de la composición de la pared celular de K. rhaphidioides en busca de relaciones con su tolerancia al medio extremo.....122

Conclusiones generales.....177

Referencias bibliográficas.....184

Anexo.....203

2. Índice de Figuras

Distribución y origen de cuerpos de agua ácidos....14
Panorámica del Lago Caviahue desde la naciente del Río Agrio Superior....16
Mapa de la cuenca....17
Imagen satelital de Caviahue–Copahue....19
Solubilidad de hidróxidos metálicos como función del pH....28
Solubilidad de sulfuros metálicos como función del pH....28
Solubilidad de sulfuros metálicos como función del pH....28
Diagrama de estabilidad Eh – pH para el sistema Fe–S2–H2O a 25°C....29
Perfiles verticales de la extracción secuencial de hierro para BN, C y BS....43
Perfiles verticales de la extracción secuencial de hierro para BN y determinación de fósforo en los extractos....48
Perfiles verticales de la extracción secuencial de a) Mn, b) Cu, c) Pb, d) Cr y e) Zn para BN, C y BS....50
Extracción de sulfuros volátiles (AVS), hierro (a, c y e), metales traza asociados (SEM) y relación AVS/SEM (b, d y f) para BN, C y BS....55
Clasificación de los distintos tipos de sustancias húmicas....67
Estructuras modelo de AH y AF....69
Estiramientos y doblamiento inducidos por la radiación IR....77
a: Eh, pH, b: contenido de MO, de agua y c: de AH en el perfil vertical del sedimento....88
Fórmulas empíricas de los AH correspondientes a todos los estratos por sitio....93
Espectros de absorbancia UV–Visible de BN, C y BS....94
Espectros FT–IR de todos los sitios y estratos muestreados....98
Curva de titulación de los AH del estrato superficial (0-2 cm) del BS....103
Perfiles de excitación y emisión de los componentes fluorofóricos (F1 y F2)....105
Matrices de excitación y emisión de fluorescencia del AH extraído del BS....106
Perfiles de fluorescencia F/F0 de los factores F1 y F2 normalizada....109
Variación en la emisión total (sin Rayleigh) y del Rayleigh de segundo orden....117
Esquema del diseño experimental de las tres series de bioensayos con metales y MO....130
Esquema de la marcha de extracción y fraccionamiento de la pared celular de K. Rhaphidioides..138
Crecimiento relativo al inóculo inicial de K. rhaphidioides, para los días 1, 3, 5, 7, 10 y 15....144
Micrografías de K.rhaphidioides....144
Fluorescencia in vivo (106 células), concentración de clorofila por célula y µm3, y biovolumen de K.rhaphidioides....145
Crecimiento de K.rhaphidioides en todos los tratamientos relativos al Lago....148
Esquematización de la producción de radicales H2O2 y ·OH mediada por quinonas presentes en SH y Fe+2....155
Cromatogramas de Fenol puro (arriba) y de una muestra con 2,5 mg AF L-1 y 20 mg Fe L-1....156

3. Índice de tablas

Clasificación de los cuerpos de agua de acuerdo con su conductividad, pH y sistema buffer.....11
Límites establecidos por el decreto 831/93 para distintos usos del agua.....25
Niveles guía establecidos por el decreto 831/93 para distintos usos del suelo.....25
pH, carga de hierro, caudal afluente del RAS y concentraciones de hierro en el lago para el período 1999–2004.....37
Resultados del análisis estadístico de Kruskal–Wallis para el contenido de agua, MO y AH.....41
Concentraciones de hierro en el Lago Caviahue en enero de 2013.....57
Ejemplos de relaciones elementales de AH de distintos orígenes.....78
Composición elemental de los ácidos húmicos extraídos del sedimento.....88
Composición elemental promedio y relaciones N/C, O/C, H/C y C/S.....89
Grupos funcionales potencialmente presentes en los AH.....91
Índices calculados para los estratos superficial y profundo.....95
Bandas de absorción en el IR y asignación para SH.....97
Diferencia porcentual entre los promedios de absorbancia de cada pico/bandaIR.....100
Variación porcentual en: emisión Total, Rayleigh de segundo orden y los factores F1 y F2 de fluorescencia extraída del análisis PARAFAC.....106
Variación porcentual en: emisión Total, Rayleigh de segundo orden y los factores F1 y F2 de fluorescencia extraída del análisis PARAFAC extrapoladas.....107
Resultados del ajuste a las ecuaciones (1) y (2), con H0: número de sitios de binding, log k: logaritmo de la constante aparente de binding.....110
Constantes de afinidad (log k) para AH, AF y MOD obtenida de distintas fuentes.....113
Intervalos de log k calculadas por otros autores.....115
Medio de cultivo diseñado para el aislamiento y mantenimiento de K.rhaphidioides.....127
Rendimientos de extracción, informados como porcentaje de la masa algal inicial.....157
Contenido porcentual de hidratos de carbono, proteínas y ácidos urónicos totales en los extractos 159
Composición de monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción RT (S) luego de la hidrólisis con TFA 2M.....160
Composición de monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción RT (P) luego de la hidrólisis con TFA 2M.....162
Composición monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción W90-1 y 2 luego de la hidrólisis con TFA 2M.....163
Composición de monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción KOH, luego de las hidrólisis con TFA 2M y de Morrison (M).....165
Composición monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción NaOH, luego de la hidrólisis de Morrison.....166
Composición monosacárídica y contenido proteico del agua intersticial del sedimento de BN y BS, y exudados de Keratococcus rhaphidioides.....168
Adsorción de nutrientes a la pared celular de K. Rhaphidioides.....169

Relación entre materia orgánica, hierro, aluminio y manganeso, y las algas acidófilas del lago Caviahue.

Resumen

Se estudio la distribución de hierro y de metales traza, como: Cu, Cr, Pb o Zn, en los sedimentos del lago ácido Caviahue, y se encontró que esta es distinta de la hallada para ambientes neutros o alcalinos, siendo los ácidos húmicos la fase más rica, seguidos de la pirita. Además se modeló la concentración de hierro en la columna de agua. El modelo reflejó precisamente la concentración del lago excepto en los períodos en que la carga de este metal estuvo por encima del promedio anual, en cuyo caso, las predicciones fueron superiores. Entendiendo que si el modelo es estrictamente físico, el exceso de hierro debería verse reflejado en la concentración. A partir de este dato, se propuso que el exceso de hierro precipita y que existe un sistema buffer. Luego se estudiaron los ácidos húmicos sedimentarios. Se determinó su origen exclusivamente fitoplanctónico, siendo la única característica distintiva, un aumento en el contenido de azufre. Además se estimaron las constantes de complejación del ácido húmico por hierro y los metales estudiados previamente. Se encontró que la afinidad por los trivalentes es mayor que por los divalentes. Además se estudió la tolerancia del alga acidófila del lago a los metales mayoritarios, Fe, Mn y Al con distintas fuentes orgánicas. El aluminio resulta tóxico en presencia de cualquier fuente orgánica mientras que el hierro es letal en presencia de ácidos fúlvicos. Además, el manganeso estimula el crecimiento. Luego, se estudió la composición de la pared celular. Se encontraron diferencias entre la composición de la pared amorfa y fibrilar, presentando cada una, los monosacáridos característicos. Finalmente se estudió la adsorción de estos metales y fósforo. Solo este último y el hierro presentaron adsorciones significativas a la pared.

Palabras clave: Distribución de hierro, modelado de hierro, complejos metal-húmicos, tolerancia de algas a metales y adsorción de metales a paredes celulares.

Relation between organic matter, iron, aluminum and manganese, and the acidophilic algae from Lake Caviahue

Abstract

The distribution of iron and trace metals, such as: copper, chromium, lead or zinc, in the sediments of the acidic lake Caviahue. It was found that the distribution is different compared with neutral or alkaline environments, being the humic acids the richest phase, followed by pyrite. Moreover, iron concentration in the water column was modeled and it was found that when above-average loadings occur, the model fails on the prediction. It was proposed that the excess iron precipitates and the existence of an iron buffer system. Furthermore, sedimentary humic acids were also studied, its origin was determined to be phytoplanktonic and the only distinctive characteristic was higher levels of sulfur in their structure. Finally, Stability constants were calculated for iron and all the metals studied on the sediments. Higher constants were found for trivalent than for divalent metals. Besides, the tolerance of the acidophilic algae from the lake to the mayor metals, Fe, Mn and Al with different sources of organic matter was investigated. It was found that aluminum is toxic complexed with any organic matter while iron is lethal only with humic acids. Manganese enhance growth only with organic quelators. Lately, the cell wall composition was addressed. Differences between the labile and fibrillar wall matrices were found, each of them with characteristic monosaccharides. Lastly, adsorption of phosphorus and the three metals was determined. Only phosphorus and iron were shown to be significantly adsorbed.

Keywords: Iron distribution, iron modeling, humic-metal complexes, metal tolerance by algae and metal adsorption by cell walls

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco mucho a mis directoras de tesis,

A Mónica, gracias por estar ahí cada vez que te necesito, por haberme dejado trabajar con libertad, por calmarme cada vez que entré en pánico y por bajarme a la tierra. También por haberme abierto las puertas a la limnología y a este gran grupo de investigación.

A Cecilia, gracias por acompañarme desde mis primeros pasos en la ciencia, por enseñarme con tus correcciones, de las que me quejo pero aprendo mucho. Gracias por estar ahí cada vez que te necesito, sobre todo en mis estancias maratónicas de trabajo en Buenos Aires y en la recta final.

Las quiero mucho y les agradezco por su apoyo, emocional y profesional. Fueron, son y serán un ejemplo.

También quiero agradecer a todos aquellos que me guiaron, acompañaron y ayudaron a lo largo de la tesis,

A Sebastían García Einschlag, por haber acompañado el desarrollo de parte del capítulo 2, por haberlo corregido y haberme enseñado un par de cosas en el camino. Por la compañía y aguante durante mis mediciones en el INIFTA, y por haberse sentado conmigo a analizar mis datos con la misma dedicación que demuestra con sus tesistas.

A Sabina Schultz, mi compañera de trabajo codo a codo y mi gran amiga. Por haberme acompañado todos los días, los buenos y los malos. Por estar siempre cuando necesité una mano para medir en esas largas jornadas de extracciones y absorción atómica, por su compañía en las semanas de escritura interminables, los almuerzos, las cenas y las catarsis con una cervecita de por medio.

A Fernando Pedrozo, por estar presente cada vez que lo necesité, por interesarse por mi trabajo del mismo modo que lo hace con todos los integrantes del grupo, y por darme aliento y ayudarme con el modelado del capítulo 1.

A Gustavo Baffico, por haberse sentado conmigo cada vez que tuve una duda metodológica, por enseñarme a trabajar en el campo, por escuchar siempre atentamente mis inquietudes y ayudarme a organizar mis ideas.

A Pedro Temporetti, por enseñarme a muestrear en el campo y a trabajar con sedimentos. Por acompañarme en esos días largos de mediciones en el campo, por su paciencia. Sin su ayuda, el capítulo 1 no hubiera sido posible.

A las integrantes del laboratorio, Guada Beamud, Dany Nichela, Xime Flores, Romi Betancurt,

Mayra Cuevas y Rubén Escalante, por la buena onda que le ponen todos los días al lugar de trabajo, por su compañía y por sus consejos a lo largo de estos cinco años. Por los matecitos o cafecitos de relax de todos los días, por compartir conmigo ese ratito de almuerzo que ayuda a despejar la mente, por los asados y las cervecitas fuera del ámbito laboral.

A las integrantes del grupo de suelos, Paula Crego, Mariana Agüero, Marina Gonzalez Polo, Elisa Castán, Martíncho, Patricia Satti y María Julia Mazzarino, con quienes compartimos el laboratorio y tanto me han ayudado.

A Mauricio Uguccioni y Pepe De Giusto, por acompañarnos durante las campañas, por los mates y todo el laburo arriba y abajo del bote. Ellos, junto a Mónica, Pedro y Gustavo han hecho que el trabajo de campo sea una experiencia inolvidable.

A Carlos Stortz y Cristina Matulewicz por permitir que desarrolle parte de mi trabajo en los laboratorios que ellos dirigen, siempre con la mejor predisposición.

A la gente de orgánica, Jazmín, Camila, Diego, Andrea, Vanina, Melisa, Virginia, Dilcia y Marina, por haberme abierto las puertas de su espacio, por las charlas de relax, por sus consejos y compañía.

A la gente del INIFTA, Andrés, Bruno, Mariana, Andrea y las pterin-girls por su cálida compañía y ayuda durante mis mediciones en el fluorímetro.

A Ana Bohe por su cariño, sus consejos y por permitirme utilizar los equipos del laboratorio que dirige en el CAB, y a Cristina y Dany por acompañarme durante mis mediciones.

A Alfredo Tolley por su muy buena predisposición en todos los intentos de utilizar los microscopios electrónicos del CAB.

A George Luther y Peter Campbell por haberse tomado el tiempo de responder mis mails con consultas acerca de la geoquímica de sedimentos y ayudarme con sus respuestas a confirmar mis resultados.

A mis padres y mis tíos, por su amor incondicional, por darme fuerzas, por haberme acompañado en todo lo necesario durante mi vuelta a la universidad y en la decisión de realizar este doctorado. Por su guía.

A Anita, gracias por acompañarme estos últimos meses de mi tesis y de mi vida, todo es más divertido con tu ironía.

A los Wroc, Rita, Lore y Nico, que son mi familia postiza, les agradezco todo el cariño y el apoyo que me dieron a lo largo de estos años.

A mis amigos, los de Bariloche, los de Buenos Aires y los que andan perdidos por el mundo, por

haberme acompañado y aguantado a lo largo de todo este proceso.

A la gente del Hotel Lago Caviahue, por darnos tan bien de comer y hacernos sentir como en casa.

Al UMYMFOR y sus integrantes por el análisis de mis muestras, por su celeridad y paciencia.

Quiero agradecer también a todas las instituciones que hicieron que este trabajo sea posible, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y a la Universidad Nacional del Comahue (UNComahue) por el financiamiento de mi trabajo. A la International Humic Substances Society (IHSS) por la beca otorgada para la asistencia y exposición en su XVII conferencia internacional. Y a la Universidad de Buenos Aires (UBA).

Además, agradezco especialmente al INIBIOMA, instituto dependiente del Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB) y CONICET por brindarme el lugar de trabajo. Y al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, al INIFTA (CONICET-La Plata) y al Centro Atómico Bariloche (CAB-CNEA) por permitir que desarrolle parte de mi trabajo en sus instalaciones.

A todos, **MUCHAS MUCHAS GRACIAS...**

Listado de abreviaturas

C	Carbono	SO_2	Dióxido de azufre
O	Oxígeno	HF	Ácido fluorhídrico
H	Hidrógeno	HCl	Ácido clohídrico
N	Nitrógeno	H_2O_2	Agua oxigenada
S	Azufre	H_2SO_4	Ácido sulfúrico
Cl	Cloro	$HClO_4$	Ácido perclórico
F	Fluor	HNO_3	Ácido nítrico
P	Fósforo	$Al(OH)_x$	Hidróxido de aluminio
COOH	Carboxilo	$Fe(OH)_x$	Hidróxido de hierro
OH	Hidroxilo/oxhidrilo	SO_4^{-2}	Sulfato
N_2	Nitrógeno gaseoso	S^{-2}	Sulfuro
Al	Aluminio	PO_4^{-3}	Ortofosfato
Fe	Hierro	NaOAc	Acetato de sodio
Mn	Manganeso	NH_4OAc	Acetato de Amonio
Cu	Cobre	NH_2OH	Hidroxilamina
Pb	Plomo	KBr	Bromuro de potasio
Zn	Zinc	MT	Metales traza
Cr	Cromo	AVS	Sulfuros volatilizables por ácido
Ni	Níquel	[SEM]	Metales simultáneamente extraídos
MeS	Sulfuro metálico	pH	Potencial hidrógeno
FeS	Sulfuro de hierro	Eh	Potencial eléctrico
PbS	Sulfuro de plomo	BN	Brazo Norte
ZnS	Sulfuro de zinc	C	Centro
CrS	Sulfuro de cromo	BS	Brazo Sur
CuS	Sulfuro de cobre	RD	Río Dulce
H_2S	Sulfuro de hidrógeno	RAS	Río Agrio Superior

RAI	Río Agrio Inferior	PM	Peso molecular
LC	Lago Caviahue	kD	Kilodalton
ANOVA	Análisis de la varianza	UV	Ultravioleta
p	p valor	SUVA	Absorción específica de radiación UV
r	Coeficiente de correlación	S_λ	Relación de pendientes espectrales
DS	Desvío estándar	GF	Grupo funcional
N/D	No determinado	M_{eq}	Miliequivalente
MI	Muestra insuficiente	Q	Carga eléctrica
C_{ss}	Concentración de estado estacionario	FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo
C_0	Concentración inicial	M	Metal
V	Volumen	L	Ligando
Q_{af}	Caudal afluente	EEFM	Matriz de excitación y emisión de fluorescencia
C_{aft}	Carga afluente	F1	Factor de fluorescencia 1
C_{sed}	Concentración en sedimento	F2	Factor de fluorescencia 1
$C_{di\pi}$	Concentración disuelta	f_q	Fracción de fluorescencia atenuada
Π	Coeficiente de partición	f_{nq}	Fracción de fluorescencia no atenuada
TR	Tiempo de residencia	k	Constante de afinidad
t	Tonelada	Log k	Logaritmo de la constante de afinidad
ps	Peso seco	I	Intensidad de fluorescencia
MO	Materia orgánica	I_0	Intensidad de fluorescencia inicial
MON	Materia orgánica natural	H_0	Número de sitios ligando
COD	Carbono orgánico disuelto	PARAFAC	Parallel Factor Analysis
MOD	Materia orgánica disuelta	FIAM	Modelo de actividad del ion libre
SH	Sustancia húmica	BLM	Modelo de ligando biótico
AH	Ácido húmico	NTA	Ácido nitrilotriacético
AF|	Ácido fúlvico	EDTA	Ácido etilendiamintetracético
TM	Tamaño molecular	ZVI	Hierro con valencia cero (cero-valente)

PAR	Radiación fotosintéticamente activa	CGL	Cromatografía Gas-Líquido
μ	Tasa de crecimiento	HdC	Hidrato de carbono
EC_{50}	Concentración inhibitoria 50%	RT	Extracto a temperatura ambiente
UR	Unidades relativas	W90	Extracto a 90°C
URF	Unidades relativas de fluorescencia	tr	Traza
EROs	Especies reactivas del oxígeno	*P*	Primavera
·OH	Radical oxhidrilo	*V*	Verano
TFA	Ácido trifluoracético	*I*	Invierno
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión	EPA	Environmental Protection Agency
ACN	Acetonitrilo	IHSS	International Humic Substances Society

Introducción general

1 Introducción general

Los lagos y sus cuencas son ambientes muy valorados dado que almacenan más del 90% del agua dulce superficial de la hidrósfera. Estos son abundantes en latitudes altas donde fueron sometidas a la acción glaciaria en el pasado (Ji, 2008). Las características de estos cuerpos dependen de su tamaño, del clima actual e histórico, la forma de la cubeta, de las propiedades físicas y químicas de la cuenca en general, la carga de elementos aportada por sus afluentes que los alimentan y la influencia antrópica, entre otros (Ji, 2008).

Los cuerpos de agua continentales pueden clasificarse según su salinidad, los salobres con una salinidad de 40 g L^{-1} y los dulces de hasta 5 g L^{-1} (Ringuelet, 1962). Asimismo pueden catalogarse de acuerdo con el sistema buffer predominante, hallándose por un lado los alcalinos, neutros y ligeramente ácidos dominados por carbonato-bicarbonato (Margalef, 1993) y los ácidos extremos que presentan las variantes detalladas en la Tabla 1 de acuerdo con el pH (Geller *et al.*, 1998).

Tabla 1 Clasificación de los cuerpos de agua de acuerdo con su conductividad, pH y sistema buffer (tomado de Geller *et al.*, 1998; Pedrozo *et al.*, 2008).

Carga iónica	pH 8,0-6,0	pH 5,5-4,5	pH 2,0-4,0	PH <2,0
Baja Conductividad 30-<1000 µS cm^{-1}	Neutrales de agua blanda Buffer: **Bicarbonato**	Acidificados por lluvia ácida Buffer: **$Al(OH)_x$**	No han sido descriptos	No han sido descriptos
Alta Conductividad >1000 µS cm^{-1}	Neutrales de agua dura Buffer: **Bicarbonato**	Acidificados por actividad minera o volcánica Buffer: **$Al(OH)_x$**	Acidificados por actividad minera o volcánica Buffer: **$Fe(OH)_x$**	Lagos de crater volcánicos Buffer: **$Fe(OH)_x$** - ? **HSO_4^--SO_4^{-2}** - ?

Los cuerpos de agua ácidos pueden ser naturales o como producto de la actividad humana (Geller *et al.*, 1998). Los naturales deben su origen a la actividad volcánica, a la lixiviación de yacimientos de pirita por inundación con aguas superficiales o a la presencia de altas

concentraciones de ácidos orgánicos entre los que se encuentran las sustancias húmicas (Geller *et al*., 1998; Löhr *et al.*, 2006). Ejemplos de este tipo de ambientes lo constituyen el Lago Ijen en Indonesia (Delmelle y Bernard, 1994), el Parque Nacional Yellowstone en EE.UU. (Allen y Day, 1935), el Lago Usoriko en Japón (Satake *et al.*, 1995), los lagos ácidos salinos del sudeste australiano (Benison *et al.*, 2007) y el sistema Río Agrio-Lago Caviahue en la Patagonia Argentina. Por otra parte, los cuerpos de agua acidificados artificialmente son producto de la actividad minera o de la lluvia ácida (Stumm y Morgan, 1996; Geller *et al.*, 1998; Löhr et al., 2006) y algunos ejemplos son los lagos de la región de Ontario en Canadá (Beamish, 1976) y Noruega (Henriksen y Wright , 1978), los lagos ácidos de mina en Alemania (e.g. Lago 107 o 111) y los ríos Tinto y Odiel en España (Galán *et al.*, 2003).

Se han identificado cuatro procesos por los cuales se acidifican las aguas superficiales: 1) el aporte de ácidos sulfúrico y nítrico en la lluvia ácida, 2) el escurrimiento de ácidos orgánicos, 3) minería de carbono o metalífera y lixiviación natural de depósitos de pirita y 4) disolución de gases volcánicos (SO_2, H_2S, HF o HCl) (Stumm y Morgan, 1996; Geller et al., 1998). Mientras que los primeros dos inducen un proceso de acidificación leve, los segundos generan cuerpos de agua ácidos extremos (pH<4,0) con altas concentraciones de Cl, S, Fe, Al, F (Friese *et al.*, 1998). El bajo pH provocado por la disolución de los gases ácidos mencionados conlleva al drenaje ácido de rocas y a la solubilización de metales traza y tierras raras (López-Archilla *et al.*, 2004; Gammons *et al.*, 2005). Beamud (2009) realizó un exhaustivo relevamiento de los cuerpos de agua ácidos que existen alrededor del mundo y su distribución puede verse en la Figura 1.

Figura 1 **Distribución y origen de cuerpos de agua ácidos (tomado de Beamud, 2009).**

Los organismos que habitan ambientes extremadamente ácidos (pH<3,0) están sometidas a condiciones adversas. La combinación entre la elevada actividad de H^+ y concentración de metales disminuye drásticamente la biodiversidad (Whitton y Diaz, 1981; Blowing, 1989; Campbell y Stokes, 1995). Como consecuencia la trama trófica es sencilla generalmente con protozoos predadores en el peldaño más alto y microalgas, bacterias y levaduras en la base (Wollmann *et al.*, 2000; Gaedke y Kamjunke, 2006; Beamud, 2009). Cabe destacar que la biota de estos ambientes posee adaptaciones que le permite convivir con las condiciones extremas. Por ejemplo, el pH citosólico de microalgas como *Dunaliella acidophila*, que viven a pH 1,0 es cercano a la neutralidad dado que sus membranas celulares son prácticamente impermeables a los protones, requiriendo un mínimo esfuerzo energético para eliminar el exceso (Gimmler y Weis, 1992), o por poseer una alta capacidad buffer interna (Pick, 1999). Un ejemplo de mantenimiento activo del pH interno lo constituye *Dunaliella acidophila* cuyo citoplasma se acidifica rápidamente en condiciones de deficiencia energética (Gimmler y Weis, 1992) contrariamente al mecanismo pasivo de homeostasis de pH que ocurre en *Cyanidium caldarium* y *Galdieria sulphuraria* (Gross, 2000). Asimismo, son altamente tolerantes a altas concentraciones de metales (Whitton, 1970). Otra

característica de los cuerpos de agua ácidos es la ausencia de bicarbonatos o carbonatos disueltos, dado que a pH<4,0 el carbono inorgánico se encuentra como CO_2, siendo este el único sustrato para la fotosíntesis. Sin embargo, el equilibrio con la atmósfera a pH 2,0 (99% de saturación) se alcanza dos mil veces más rápido que a pH 7,0 (Gross, 2000). Resulta destacable que algunas algas prefieren los ambientes ácidos y muestran síntomas de estrés a pH>4,0, indicando que la ausencia de carbonatos no es un factor limitante (Gross, 2000; Löhr et al., 2006; Schultz, inédito).

La producción primaria en la zona eufótica de lagos ácidos está dada por microalgas de hábito cocoide y filamentoso (Gyure *et al.*, 1987; Lopez-Archilla *et al.*, 1995, 2004). Las especies más frecuentes son *Cyanidium caldarium*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Galderia sulphuraria* (Rhodophyta), *Asterionella ralfsii* , *Navicula spp.* (Bacilariophyta), *Euglena mutabilis* (Euglenophyta), *Keratococcus rhaphidioides*, *Pseudococcomyxa simplex*, *Chlorella sp.*, *Chlamydomonas acidophila*, *Dunaliella acidophyla*, *Mougeotia sp.*, *Watanabea caviahuensis*, *Ulothrix sp.* y *Klebsormidium sp.* (Chlorophyta) (Brock, 1973; Gyure et al. 1987; Lessmann *et al.* 2000; Nishikawa y Tominaga, 2001; Beamud *et al.*, 2007; Baffico, 2010; Schultz, inédito). De todas las especies mencionadas, las subrayadas han sido halladas en el Lago Caviahue.

1.1 Área de estudio

El Lago Caviahue se encuentra localizado a 1600 m.s.n.m. en el Parque Provincial Copahue–Caviahue (37° 53' S; 71° 02' W), Departamento de Ñorquín, Provincia del Neuquén, Argentina (Figura 2). Es de origen glaciario y sus dimensiones son: 9,7 km de largo y 4,7 km de ancho máximos, su perímetro es de 22,3 km, el área total de 9,2 km^2 y el volumen total de 0,47 km^3. El tiempo de residencia del agua y elementos conservativos (TR) aun está en discusión (Rapacioli, 1985). Por un lado Rapacioli (1985) propuso un TR de 31,2 meses basado en modelos hidrológicos que contemplan las precipitaciones, caudales afluentes y efluentes. Mientras que Varekamp (2003,2008) modeló un TR de 42 meses en base al balance de masas de elementos conservativos como Cl o Mg.

Figura 2 **Panorámica del Lago Caviahue desde la naciente del Río Agrio Superior. Foto: Juan Cabrera, 2015.**

El lago tiene forma de herradura con dos brazos (Norte –BN– y Sur –BS–) de 90 y 70 m de profundidad respectivamente y dos afluentes mayoritarios, el Río Dulce (RD) y el Río Agrio Superior (RAS). El Dulce, es un río de deshielo que atraviesa terrenos de bosques achaparrados y desemboca en el lago con un pH de 6,5, mientras que en el RAS el rango de pH oscila entre 0,80 a 2,20 desde su naciente hasta su delta en el lago (Pedrozo *et al.*, 2001). El río nace a 2740 m.s.n.m. en la ladera este del Volcán Copahue con una temperatura de entre 56 y 82ºC y una conductividad de 560 mS cm^{-1} (Pedrozo *et al*., 2001; Cabrera *et al.*, manuscrito en revisión). En sus 12 km de recorrido recibe tres afluentes principales, los ríos Jara, Rojo y Blanco (Pedrozo *et al.*, 2008). Todos ellos presentan variaciones de caudal estacionales y diarias, entre otras causas debido a que los afluentes más pequeños se congelan durante las frías noches de invierno. Se presume que estos ríos tienen su origen en otras surgentes volcánicas, dado su carácter ácido. El Río Rojo, por ejemplo, surge también de la ladera este del volcán a pH 4,2 y su cuenca se encuentra tapizada por el color rojo de la hematita. Estos afluentes alimentan y atraviesan mallines cargándose de MO disuelta que desembocará eventualmente en el lago.

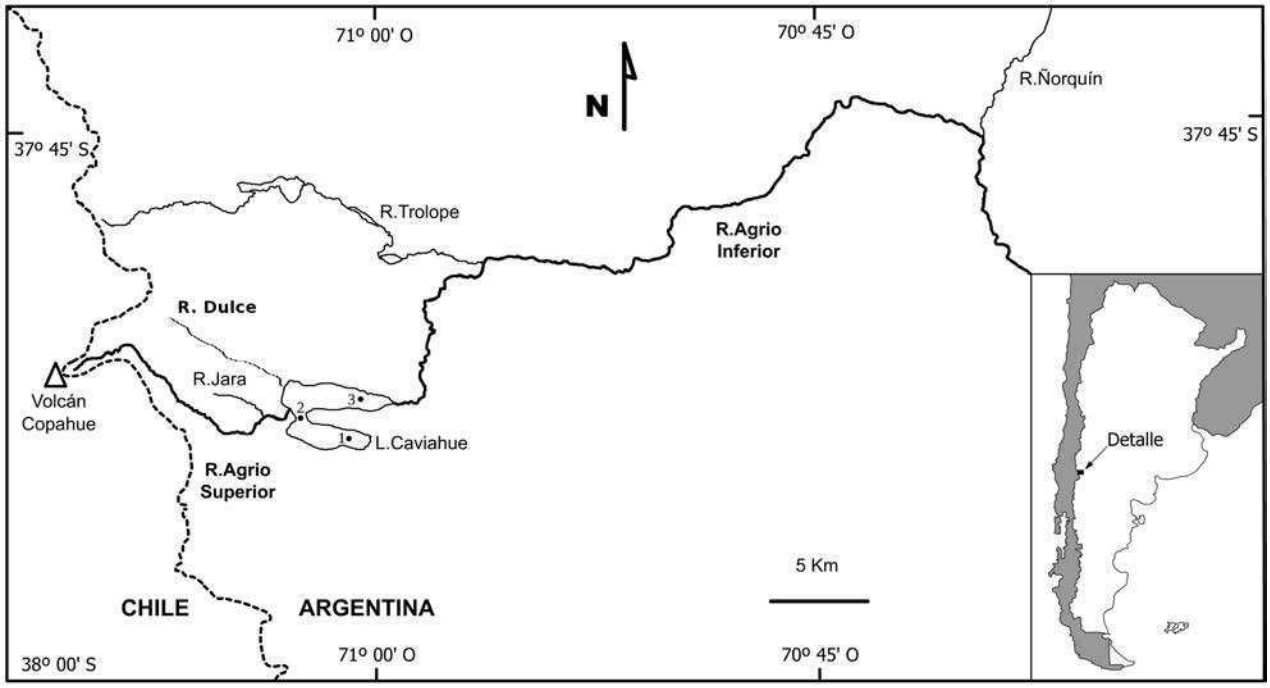


Figura 3 **Mapa de la cuenca. Sobre el lago se denotan con números los sitios muestreados, 1) Brazo Sur, 2) Centro y 3) Brazo Norte. (Imagen tomada de Baffico *et al.*, 2004)**

El río Dulce descarga en BN mientras que el RAS lo hace en la confluencia de ambos brazos (aunque más cerca de BN; Figura 3). El RAS le confiere al lago el carácter de volcánico que se evidencia en su bajo pH 2,2–3,0 durante los últimos 15 años (Pedrozo *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, manuscrito en revisión), alta conductividad de 1600 µS cm^{-1} y altas concentraciones de diversos elementos mayoritarios (0,21 – 0,45 mg P L^{-1}, 20 mg Fe L^{-1}, 27 mg Al L^{-1}, 1 mg Mn L^{-1}, 95 mg Cl L^{-1}, 6,7 mg F L^{-1}, 17 mg Si L^{-1}, 400 mg SO_4^{-2} L^{-1}, 14 mg Na L^{-1}, 6 mg K L^{-1} y 22 mg Ca L^{-1}; Pedrozo *et al.*, 2001, Pedrozo *et al.*, 2008, Varekamp 2008) y de elementos traza (20 µg Cu L^{-1}, 80 µg Zn L^{-1}, 22µg Ni L^{-1}, 15 µg Cr L^{-1}, 12 µg Co L^{-1}, 37 µg As L^{-1} y121 µg Ti L^{-1}; Varekamp, 2008). La cantidad de sólidos disueltos es varios órdenes de magnitud mayor que la de otros lagos andino-patagónicos ultraoligotróficos (Pedrozo *et al.*, 1993; Diaz y Pedrozo, 1996; Diaz *et al.*, 2007) y se debe al bajo pH del sistema volcánico que da origen al RAS. Sin embargo, el bajo contenido de N (0,01 mg L^{-1}) llevó a Pedrozo *et al.* (2002) a plantear que la limitación en este lago está dada por este nutriente y no por P, como ocurre en cuerpos de agua con pH más altos. Por otro lado, evidencias como el bajo contenido de carbono inorgánico (0,7–1,7 mg L^{-1}), la baja transparencia, la escasa biodiversidad algal (dominada por *Kerατococcus rhaphidioides* (>90%) y otras Chlorophyceae) con una

distribución vertical distintiva que en ocasiones presentó valores máximos en el meta-hipolimnion (Pedrozo *et al.*, 2001; Brankatschk, 2007; Beamud, 2009; Beamud *et al.*, 2007,2010; Baffico, 2010) sugiriendo un escenario de nutrición mixotrófica o osmotrófica semejante al descripto en un lago ácido de mina (Tittel *et al.*, 2003). La biota bentónica está compuesta por un biofilm, también compuesto principalmente por *K.rhaphidioides*, depositado sobre la superficie de toda la cuenca (quiero decir de la zona no litoral, pero no se si es profunda). Si bien no se conoce su estado fisiológico, las algas recuperan la capacidad de fotosintetizar luego de aproximadamente dos horas de exposición a la luz natural (Baffico, Diaz y Schultz, inédito).

El efluente del sistema es el Río Agrio Inferior (RAI) con un pH levemente superior a 3,0 a la salida del lago. En su recorrido recibe dos tributarios a lo largo del área estudiada por el GECARA (Grupo de Estudio de Calidad de Aguas y Recursos Acuáticos), el Río Trolope y el Río Ñorquín. Dependiendo de la estación del año, la proporción de agua ácida de lago transportada por el RAI induce variaciones de pH debidas al requerimiento de mayores volúmenes en los tributarios para su neutralización, implicando que el bajo pH (aunque mayor a 5,0) se extienda más allá de la confluencia con el Ñorquín (Baffico y Temporetti, inédito) y que el pH umbral de precipitación del hierro (pH>3,5) y el de aluminio (pH>5,0) se mueva a lo largo de la cuenca tapizándola íntegramente de naranja (óxidos de Fe) y blanco (óxidos de Al) (Gammons *et al.*, 2005).

La geomorfología del área de estudio está dividida en dos, por un lado el Volcán Copahue y la cabecera de los ríos al oeste y por otro los valles de ambos ríos al este (Rabassa *et al.*, 1989). El volcán Copahue (un estrato volcán) y el Lago Caviahue están localizados en una gran caldera de 20 x 15 km formada por el complejo efusivo Copahue–Caviahue durante el Plioceno–Holoceno (Pesce, 1989). El cono del volcán es el punto más alto de la cuenca y posee un pequeño lago de cráter.

Los materiales predominantes de la cuenta son andesita y basalto andesítico (Pesce, 1989; Varekamp, 2014). El grano de partícula predominante en los sedimentos del lago es la arena (75 a 85%) seguida de limo (15 a 25%) y arcilla (5%). Su contenido de materia orgánica (MO) oscila entre 5 y 10% con aproximadamente 1 mg g de peso seco^{-1} de fósforo asociado (Temporetti *et al.*,

2013). El potencial redox actualmente varía entre –20 mV y –180 mV (se han registrado valores de hasta –280 mV) y el pH entre 3,0 a 4,0 en la región profunda de los brazos, mientras que el rango se extiende a 3,0 a 6,0 en la confluencia de los brazos (Temporetti *et al.*, 2013; Cabrera *et al.*, manuscrito en revisión; Figura 4).

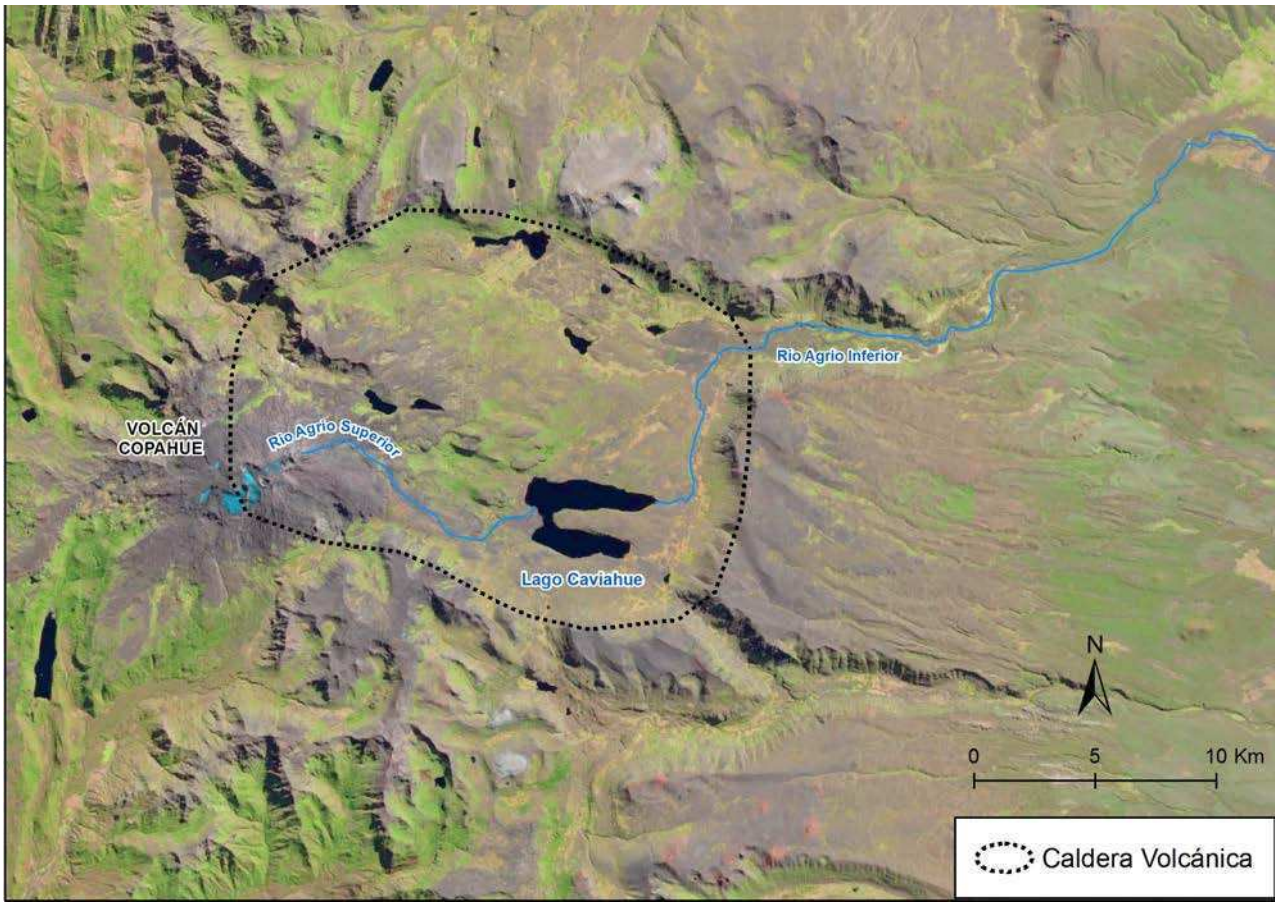


Figura 4 **Imagen satelital de Caviahue–Copahue. Se observa el Volcán Copahue con su cumbre elevada y el Lago Caviahue dentro de la caldera volcánica delimitada por los puntos amarillos (cortesía de Anabella Fantozzi).**

El Lago Caviahue constituye el único ejemplo de lago extremadamente ácido, natural y profundo en Sudamérica. A lo largo de los últimos 30 años fue progresivamente estudiado por distintos grupos de investigación, comenzando por Rapacioli (1985) y Quirós (1988) que proveyeron las primeras referencias de su morfometría y estado trófico respectivamente. Posteriormente Delpino *et al.* (1997) aportaron información acerca de la distribución térmica de la columna de agua y Varekamp (2003) inició la discusión respecto del tiempo de residencia del agua y elementos conservativos. Pedrozo *et al.* (2001) describieron la limnología de la cuenca y Baffico *et al.* (2004)

estudiaron la comunidad epilítica del Río Agrio. Wendt-Potthoff y Koschorreck (2002), Koschorreck *et al.*, (2003) y Russo *et al.* (2006) estudiaron la microflora bacteriana los sedimentos del lago y la composición de levaduras en el sistema Río Agrio-Lago Caviahue respectivamente. Más tarde, Gammons *et al.* (2005) analizaron la hidrogeoquímica de tierras raras, Pedrozo *et al.* (2008) estudiaron los flujos de nutrientes y su retención en el lago y Parker *et al.* (2008) resaltaron la importancia de los ciclos diarios del Fe^{+2} y Fe^{+3} en condiciones ácidas mientras que Beamud *et al.* (2007; 2010) analizaron la distribución temporo-espacial del fitoplancton y Temporetti *et al.* (2013) dinámica del fósforo en los sedimentos.

En los últimos años, el incremento poblacional y el desarrollo turístico de la localidad de Caviahue (situada sobre la margen oeste del lago) provocaron un incremento en la descarga de residuos cloacales, fenómeno que suele estar asociado con el aumento en el pH de los cuerpos de agua. Sumado a ello, la carga de H^+ aportada por el RAS disminuye a cada año constituyendo otra fuente de alcalinización. El aumento del pH puede inducir cambios en la diversidad específica de la biota (Baffico *et al.*, 2004), en la capacidad de retención de distintos elementos como Fe, P y metales traza del sedimento y en el sistema buffer de la cuenca (pasando de $Fe(OH)_x$ a $Al(OH)_x$), lo que implicaría la precipitación masiva de óxidos de Fe y co-precipitación de nutrientes modificando drásticamente la composición del agua y del sedimento.

En este trabajo de tesis se lleva a cabo un estudio exhaustivo de la distribución de metales, materia orgánica y su relación con el crecimiento de *Keratococcus rhaphidioides*, el alga más abundante del fitoplancton. El presente trabajo aporta una contribución adicional al conocimiento del complejo sistema biogeoquímico de este lago ácido.

1.2 Objetivos generales

1 Estudiar el ciclo del hierro en la columna de agua y en los sedimentos del lago ácido Caviahue, modelando la influencia de cargas variables del metal en el comportamiento del metal disuelto en la columna de agua, determinando su contenido total en el perfil vertical del sedimento y las fases geoquímicas a las que se encuentra asociado.

2 Analizar también el contenido total de Mn, Cu, Cr, Cd, Zn y Pb en el sedimento, su distribución y potencial biodisponibilidad.

3 Caracterizar el contenido de ácidos húmicos en distintos estratos del sedimento, y a través de estudios espectroscópicos realizar inferencias acerca de su origen, estructura y afinidad por Fe, Al y siete metales traza.

4 Estudiar la interacción de *Keratococcus rhaphidioides* (la especie fitoplanctónica dominante) con los tres metales mayoritarios (Fe, Al y Mn) en cultivo con y sin el agregado de materia orgánica quelante, emulando así las distintas condiciones posibles a las que las algas están expuestas en el ambiente. Identificar los azúcares que componen la pared celular del alga y evaluar la capacidad de adsorción de metales que esta posee en el lago.

Capítulo 1

Distribución del hierro y metales traza en las fases geoquímicas del sedimento, modelado de la concentración de hierro en la columna de agua y determinación de la existencia de un sistema buffer de hierro en el Lago Caviahue.

2 Capítulo 1: Distribución del hierro y metales traza en las fases químicas del sedimento, modelado de la concentración de hierro en la columna de agua y determinación de la presencia de un de un sistema buffer de hierro en el Lago Caviahue.

2.1 Introducción

2.1.1 Definiciones y legislación

El ingreso y la dinámica del hierro y metales traza (MT) en suelos, cuerpos de agua (ríos, lagos, mares y océanos) y la atmósfera ha sido ampliamente estudiado los últimos 50 años. El foco de estas investigaciones ha estado puesto principalmente sobre las distintas actividades contaminantes desarrolladas por el hombre y su incidencia los ambientes naturales. Las áreas más afectadas se encuentran las zonas lindantes o cercanas a los grandes centros urbanos, y la mayor fuente de contaminación en estos casos es el vertido de efluentes sin tratamiento previo (Franklin *et al.*, 2000; Khangarot y Rathore, 2003; Ma *et al.*, 2003).

Hay diversas definiciones del término “contaminación”, aunque hay consenso en describirla como “la presencia de sustancias que, siendo la introducción de ocurrencia natural o antrópica, tienen efectos degradativos sobre el medio ambiente y tóxicos o nocivos (o potencialmente) para el ser humano” (en Novotny, 1995).

En cambio, la definición de polución involucra la acción del hombre como motor del efecto nocivo. La ley de calidad de aguas de Estados Unidos (1987), define polución como “la alteración química, física, biológica o radiológica en la integridad de un cuerpo de agua, inducida o provocada por el hombre”. Por otra parte, Novotny (1995) cita que la definición más actual del termino polución es “la interferencia no razonable debido a usos beneficiosos de los recursos”.

La ley 14.343, sancionada en 2012 por la legislatura bonaerense pretende regular los pasivos

ambientales y establece que un sitio contaminado “es todo aquel cuyas características físicas, químicas o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de sustancias contaminantes de origen humano, en concentraciones tales que, en función del uso actual o previsto del sitio y sus alrededores, comporte un riesgo para la salud humana y/o el ambiente”. Esta definición es similar a la encontrada en la bibliografía y legislación de otros países para el término polución. La ley deja claro que los ambientes cuyos niveles basales de una determinada sustancia sean mayores que los tolerados por norma, no serán considerados contaminados.

La ley nacional 24.051 establece que “será considerado peligroso a todo residuo que pueda causar daño, directa o indirectamente a seres vivos o contaminar el suelo, el agua, la atmósfera o el ambiente en general”. En la misma establece un listado con los compuestos a ser considerados y sus características, mientras que el decreto reglamentario 831/93 establece las concentraciones límite para cada sustrato dependiendo de su ubicación y uso. En las tablas 1 y 2 se enumeran los metales listados para distintos usos de agua y suelo, aunque los niveles guía de estos contaminantes en sedimentos no fueron tenidos en cuenta.

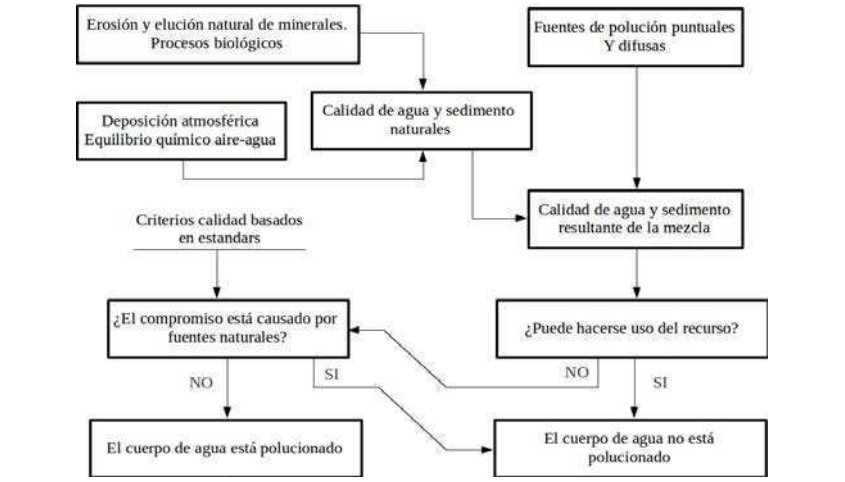


Figura 5 **Esquema de criterios a ser tenidos en cuenta en la determinación del estado de polución de un cuerpo de agua. Tomado de Novotny (1995)**

2.1.2 Fuentes de ingreso de metales a la hidrósfera

Existen tres vías principales de ingreso de exceso metales contaminantes a la hidrósfera: la actividad humana, la lixiviación natural y el vulcanismo (Geller *et al.*, 1998). La minería y la actividad industrial constituyen ejemplos de la primera. En Argentina existen múltiples

emprendimientos mineros como “Bajo la Alumbrera” en Catamarca, “La Poma” o Concordia” en Salta, o “Veladero” en San Juan que provocaron (o continúan provocando) el deterioro del ambiente circundante (SEGEMAR) como consecuencia de la lixiviación ácida de rocas para la extracción de metales u oxidación de depósitos de pirita. Por otra parte, el Río Reconquista o la cuenca del Matanza-Riachuelo en el cono urbano bonaerense constituyen dos casos paradigmáticos de polución debida a la descarga de efluentes de fundición, enchapado metálico, curtiembres, etc.

Un ejemplo de la lixiviación natural se constituye cuando se inundan grandes depósitos de pirita. En este caso, la oxidación del mineral ocurre de acuerdo con las ecuaciones,

$$\mathbf{4Fe}\,S_2 + \mathbf{15}\,O_2 + \mathbf{14}\,H_2O \Leftrightarrow \mathbf{4Fe}\left(OH\right)_3 + \mathbf{8H_2}\,SO_4 \qquad (1)$$

$$\mathbf{8H_2}\,SO_4 \Leftrightarrow \mathbf{16}\,H^{+1} + 8\,SO_4^{-2} \qquad (2)$$

provocando la liberación de grandes cantidades de ácido sulfúrico, Fe y metales traza metales contenidos en su estructura. Este fenómeno es análogo al inducido por la actividad minera y entre sus consecuencias se encuentran la acidificación de las aguas superficiales y subterráneas, y la introducción de grandes cantidades de metales traza como Cr, Pb, Cu, Zn o Cd representando un riesgo para la integridad de los ecosistemas afectados y para la salud humana (Geller *et al.,* 1998).

Al pH ácido resultante, la solubilidad de los metales está por encima del orden molar (Kelley y Tuovinhen, 1988; Boult *et al.*, 1994). En los sedimentos acuáticos ocurre la misma reacción, sin embargo la presencia de múltiples ligandos modifica los equilibrios de solubilidad de los productos formados (Urrutia *et al.,* 1987). Los ríos Tinto y Odiel constituyen un ejemplo en el que el mecanismo natural convive con más de 3000 años de historia minera en la región, su pH es muy bajo (1,0 a 2,0) y el contenido de metales disueltos se encuentra varios órdenes de magnitud por encima de las concentraciones toleradas por la biota acuática no extremófila.

En otro orden, la actividad volcánica ha sido ampliamente citada como fuente de ingreso a la hidrósfera de elementos como S, Cl, Fe, Al, F, Cu, Cr, As, etc. y rara vez es el foco de investigaciones que apunten a elucidar la dinámica de los acuíferos afectados (Geller *et al.* 1998;

Kalin y Geller, 1998; Rai *et al.*, 2002). Estos cuerpos de agua asociados al vulcanismo pueden formarse directa o indirectamente. Los lagos en cráteres volcánicos o los ríos originados partir de una surgente ácida son ejemplos del primer escenario mientras que un lago de origen glaciar puede acidificarse luego de recibir un afluente volcánico, constituyendo un ejemplo del segundo.

Tabla 2 Límites establecidos por el decreto 831/93 para distintos usos del agua.

Metal / Nivel guía de calidad de agua	Para consumo humano con tratamiento convencional (µg L^{-1})	Protección vida acuática: Agua dulce superficial (µg L^{-1})	Irrigación (µg L^{-1})	Ganado (µg L^{-1})
Fe	300	–	5000	–
Al	200	5	5000	5000
Mn	100	100	200	–
Cu	1000	0,95	220	30
Pb	29	1	0,11	3
Cr	50	2	100	1000
Zn	5000	30	2000	50
Cd	5	0,2	10	20
Ni	25	25	200	1000
As	33	15	100	67

Tabla 3 Niveles guía establecidos por el decreto 831/93 para distintos usos del suelo

Metal	Uso agrícola (µg L^{-1})	Uso residencial (µg L^{-1})	Uso industrial (µg L^{-1})
Fe	–	–	–
Al	–	–	–
Mn	–	–	–
Cu	30	30	500
Pb	375	500	1000
Cr	750	250	800
Zn	600	500	2500
Cd	3	5	20
Ni	150	100	500
As	20	30	50

2.1.3 Rol del sedimento

La química de los sedimentos acuáticos es tan compleja como la del suelo dado que están constituidos por una mezcla de compuestos de origen biológico y mineral persistentes. Entre los de origen biológico se encuentran diversos microorganismos como bacterias, levaduras y algas, animales bentónicos macroscópicos, los detritos de todos ellos y la materia orgánica humificada (ácidos húmicos, fúlvicos y huminas). Por su parte, entre los minerales se encuentran arcillas, pirita, sulfuros metálicos, óxidos de hierro, de manganeso y de aluminio, carbonatos de calcio y magnesio, y minerales rocosos de origen ígneo, como basalto, granito, andesita y basalto andesítico, entre otros (Håkanson y Jansson, 1983; Last, 2001;Golterman, 2004). Los dos últimos se encuentran presentes a lo largo de todo el sistema Río Agrio-Lago Caviahue (Pesce, 1989; Temporetti *et al.*, 2013; Varekamp, 2014) con variaciones en la proporción de elementos componentes dependiendo de su disponibilidad en el magma y en los gases que le dieron origen.

Las distintas fases geoquímicas del sedimento tienen la capacidad de precipitar, adsorber o complejar metales, fósforo o contaminantes orgánicos, enriqueciéndolos respecto de la columna de agua (función de sumidero; Förstner y Wittmann, 1983). Si se desestima el contenido sedimentario de metales o nutrientes no es posible hacer una evaluación completa de la calidad de un cuerpo de agua, sin importar la definición de calidad que se escoja. Dado que la concentración de metales en la columna de agua está en equilibrio con el stock sedimentario, desconocerlo lleva a un entendimiento parcial del sistema.

Un cambio en las condiciones físicas o químicas en el sedimento o la columna suprayacente puede producir la disolución de alguna fase, como carbonatos a pH<5,0 u óxidos de hierro a pH<3,5, y liberar metales traza retenidos (función de fuente; Förstner y Wittmann, 1983) elevando su concentración en la columna (Håkanson y Jansson, 1983).

En sedimentos óxicos con pH cercano a la neutralidad, las fases más comunes y mayoritarias son los carbonatos, los óxidos de Fe, Mn y Al, sustancias húmicas y otros detritos, y arcillas. En

ambientes anóxicos, por otra parte, los óxidos de Fe son reemplazados por minerales del S reducidos como la pirita y ganan importancia los sulfuros metálicos. Cuando el pH del sedimento está por debajo de 5,0, el Ca, Mg y Al se encuentran disueltos. Lo mismo ocurre con los óxidos de Fe a pH<3,5 (Figura 6 y Figura 7; Morse *et al.*, 1987; Rickard *et al.*, 1995; Stumm y Morgan, 1996). En general, en los ambientes anóxicos circumneutros la pirita suele ser la fase de Fe y metales traza más rica. Sin embargo cuando el pH disminuye, la solubilidad de Fe se incrementa y la concentración de los precursores necesaria para la formación de este mineral puede ser varios órdenes de magnitud mayor que la disponible (Figura 8; Morse y Luther, 1999; Butler y Rickard, 2000).

En sistemas óxicos donde predomina el SO_4^{-2}, la solubilidad de los metales en función del pH es descripta por la Figura 6, mientras que para ambientes anóxicos con predominancia de S^{-2}, se representa en la Figura 7. Teniendo en cuenta ambos escenarios, la solubilidad de todos los metales al pH de los sedimentos de Caviahue es alta (ver área de estudio).

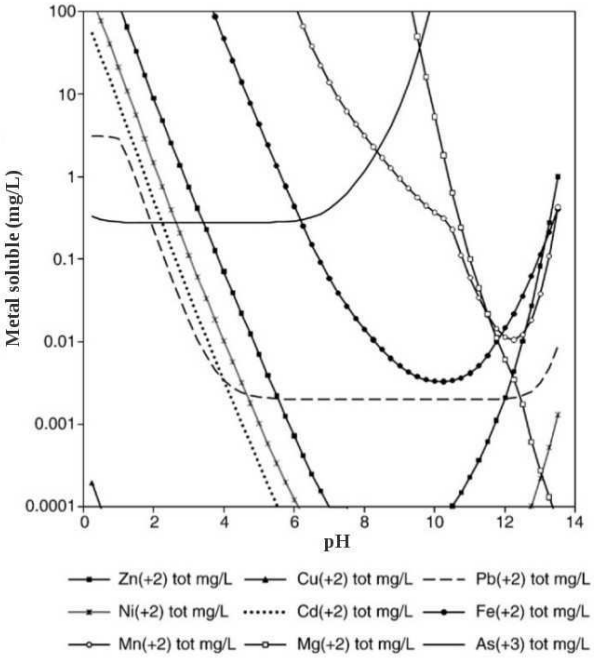


Figura 7 **Solubilidad de sulfuros metálicos como función del pH (tomado de Stumm y Morgan, 1996).**

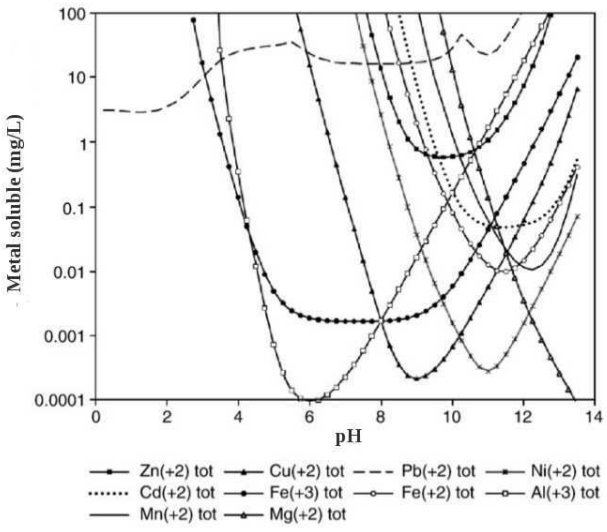


Figura 6 **Solubilidad de hidróxidos metálicos como función del pH (tomado de Stumm y Morgan, 1996).**

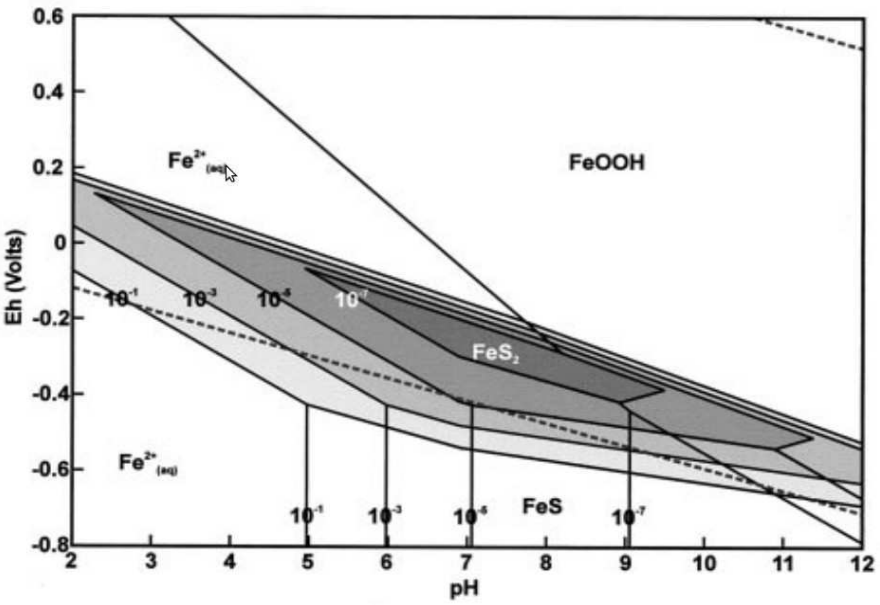


Figura 8 Diagrama de estabilidad Eh – pH para el sistema Fe–S_2–H_2O a 25°C. Una vez formada la pirita (FeS_2) se espera que sea estable en todo el rango de Eh – pH, pero para ello debe formarse dentro de los espacios en los que es estable. Si se incrementan las concentraciones de Fe y S (10^{-7} a 10^{-1} M) también lo hace el espacio de estabilidad (gris). Los distintos tonos de gris corresponden a distintas concentraciones de sobre–saturación necesarias para la formación del FeS_2. Mientras más lejos del gris oscuro mayores [Fe^{+2}] y [S^{-2}] en el agua intersticial (tomado de Butler y Rickard, 2000).

2.1.4 Extracción y determinación de metales sedimentarios

Una técnica sencilla de microanálisis para determinar la composición de elementos mayoritarios en un sedimento es el EDS (Energy Dispersive Spectrometry). Aunque es muy eficiente en la elucidación de la composición de la roca madre, su límite de detección (1%) impide cuantificar el contenido de elementos minoritarios.

Dado que los metales traza suelen hallarse en concentraciones más bajas (<1% del sedimento) y que su movilidad depende de la fase geoquímica a la que estén asociados, desde mediados de la década del setenta se desarrollaron métodos químicos de extracción secuencial que posibilitan el estudio de su distribución en sedimentos y suelos (Agemian y Chau, 1976; Loring, 1976; Agemian y Chau, 1977; Malo, 1977; Tessier *et al.*, 1979). Estos métodos permiten resolver el contenido de metal lábil y potencialmente más peligroso del asociado a fases más recalcitrantes, con menor grado de movilidad.

Previo al desarrollo de estas técnicas, se realizaban digestiones de los sedimentos con combinaciones de ácidos y oxidantes fuertes como HF, HCl o HNO_3, y se medía la concentración total de los elementos de interés sobre el producto de la digestión. Por otra parte, se apuntaba a determinar el contenido de metales en una fracción de interés, como carbonatos u óxidos, utilizando solventes de extracción apropiado para la disolución de dicha fase, y luego relacionar la concentración parcial con el contenido total. Este tipo de procedimientos brinda información incompleta ya que se desconoce la disponibilidad, movilidad y transporte de los metales estudiados (Tessier *et al.*, 1979).

Debido a que el sedimento puede ser óxico o anóxico, y a que las fases presentes en cada escenario difieren significativamente, se han diseñado distintos métodos para el estudio de cada una. A continuación se enumeran y describen tres grandes grupos sobre los que se realizaron modificaciones posteriores con el fin de mejorar su poder de resolución.

- Tessier *et al.* (1979), desarrollaron un método para sedimentos óxicos basado en las distintas extracciones parciales utilizadas hasta ese momento: citrato de sodio, ditionita de sodio, hidroxilamina clorhidrato ($NH_2OH{\cdot}HCl$), acetato de sodio (NaOAc), acetato de amonio (NH_4OAc), agua oxigenada (H_2O_2) 30% en medio ácido, etc., y para las digestiones totales con ácidos clorhídrico (HCl), nítrico (HNO_3), fluorhídrico (HF), perclórico ($HClO_4$), sulfúrico (H_2SO_4), y combinaciones como el aqua regia ($HCl:HNO_3$). El método diseñado por los autores pretendía diferenciar entre: i) el metal lábil, ii) el asociado a carbonatos, iii) el asociado a óxidos de hierro y manganeso (fracción reducible), iv) el asociado a materia orgánica y sulfuros (fracción oxidable) y v) el metal residual. Los solventes utilizados en cada paso fueron: $MgCl_2$, NaOAc, NH_2OH, H_2O_2, (30%) y una mezcla de HCl: HNO_3:HF. Este método fue ampliamente utilizado por numerosos científicos y sirvió de base para el desarrollo de protocolos como el BCR (Ure *et al.*, 1993), diseñado por el Comité de Referencia de la Comunidad Europea (European Community Bureau of Reference) que elimina un paso con el fin de minimizar errores; o como el propuesto por Torres y Auleda

(2013) que permite discriminar entre el contenido de óxidos de Fe amorfos y cristalinos.

- Por otra parte, se desarrollaron métodos con el fin de particionar fases geoquímicas presentes en ambientes marinos y pantanos salobres, que suelen ser anóxicos, y se concentran mayormente en el contenido de pirita debido a la disponibilidad de S^{-2} y Fe^{+2}. Sin embargo son aplicables a cualquier sedimento anóxico. Los primeros trabajos que lograron recuperar elementos asociados a especies inorgánicas reducidas del azufre fueron realizados por Zhabina y Volkov (1978) y Raiswell *et al.*, (1985). Luego, en base a estos trabajos Canfield *et al.*, (1986) desarrollaron un método en el que se hace reaccionar una muestra de sedimento con $CrCl_2$ en HCl concentrado que permite conocer la cantidad de azufre reducida total. De esta forma se logra la solubilización de pirita, sulfuros metálicos, azufre elemental y los elementos asociados a estos minerales en el medio ácido, mientras que se atrapa el H_2S liberado en el proceso en medio básico conteniendo $Zn(OAc)_2$. El precipitado es luego titulado para conocer la concentración de azufre inorgánico inicial y sobre el extracto ácido se determina la concentración de Fe y los metales que sean de interés. La ventaja de estos métodos es que solo se ataca a las especies inorgánicas reducidas del azufre, sin embargo no se las puede discriminar. Luego Huerta–Díaz y Morse (1990) mejoran el protocolo logrando discriminar el hierro y otros metales asociados a las fases presentes en sedimentos anóxicos. Para ello utilizaron el siguiente esquema: i) HCl 1M, ii) HF 10M y iii) HNO_3 puro, todos a temperatura ambiente. Con cada paso se resuelven distintas fases, el primero apunta a la fracción “reactiva” y soluble en medio ácido como los sulfuros metálicos, carbonatos y metales débilmente adsorbidos; la segunda disuelve minerales del silicio como las arcillas (los minerales como el basalto o la andesita se disuelven parcialmente en este paso); y finalmente se obtienen el Fe y los metales traza asociados a pirita. Dos años más tarde, los mismos autores (Huerta–Díaz y Morse, 1992), proponen una variable que tiene en cuenta el grado en que los metales de transición se encuentran formando parte de la pirita, o su grado de piritización.

- En tercer lugar Allen *et al.* (1991) y Allen *et al*. (1993) desarrollaron un método que apunta solo a disolver la fracción correspondiente a los sulfuros metálicos (MeS) y carbonatos presentes en sedimentos anóxicos. Este protocolo, si bien no tiene carácter secuencial, es de mayor importancia dado que los sulfuros son la fracción más lábil en este tipo de ambientes. Son muy susceptibles a cambios en el Eh y pH, pudiendo liberar un alto contenido de metales a la columna de agua representando un riesgo para la biota bentónica. El método lleva el nombre de AVS–[SEM], siglas de "Acid Volatile Sulfide" y "Simultaneously Extracted Metals", y hace referencia al contenido de sulfuro que se volatiliza de una muestra de sedimento sólida cuando se la expone a HCl 1M frío y a los metales que se solubilizan en el proceso. La pirita (FeS_2), la calcopirita ($CuFeS_2$) y el sulfuro de cobre (CuS) son parcialmente susceptibles a ser lixiviados por esta vía, por lo que se sobreestima el contenido de Cu y Fe asociados a MeS (Ankley *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1993).

  En sedimentos anóxicos cercanos a la neutralidad, esta fracción suele ser conspicua dado que las constantes (Kps) de formación de los sulfuros metálicos son muy pequeñas. Algunas de ellas se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4 Constantes producto de solubilidad (Kps) de algunos sulfuros metálicos

Compuesto	Kps
CdS	$1{,}6\ 10^{-28}$
CuS	$4\ 10^{-36}$
PbS	$8\ 10^{-28}$
MnS	$3\ 10^{-7}$
FeS	$4\ 10^{-17}$
ZnS (Sphalerita)	$2\ 10^{-24}$
ZnS (Wurtzita)	$3\ 10^{-23}$
HgS	$1{,}6\ 10^{-54}$
Ag_2S	$2{,}1\ 10^{-49}$

En la sección 2.1.2 se detallan los niveles guía para aguas y suelos pero no para sedimentos, y ello se debe a que no están considerados por la norma. Por ello, la determinación del nivel de contaminación se realiza mediante la comparación de las concentraciones en el sitio de interés con

las de otro que se encuentre conservado. Este último debe hallarse sobre la misma cuenca y se denomina sitio de referencia, de fondo o *background* (Rendina *et al.*, 2001).

Los métodos que se utilizan comúnmente para particionar el fósforo sedimentario (Hieltjes and Lijklema, 1980; Groot y Golterman, 1990; Golterman, 1996) apuntan a disolver y determinar el contenido del nutriente lábil, asociado a carbonatos, óxidos de hierro y el P orgánico. El método ideado por Tessier *et al.* (1979) y sus modificaciones posteriores también permite identificar estas fracciones. Del mismo modo que para el estudio de metales, conocer la distribución del P en el sedimento permite predecir su comportamiento frente a escenarios que modifiquen las condiciones FQ, anticipando una potencial liberación y sus efectos sobre el estado trófico del cuerpo de agua.

Paludan y Jensen (1995) y Golterman (1998) propusieron que parte del P-orgánico se encuentra en forma mineralizada, como fosfatos (PRS) formando parte de complejos ternarios con ácidos húmicos ($AH–Me–PO_4^{-3}$) y los metales más comunes serían Fe y Al.

2.2 Objetivos

- Determinar la concentración y distribución de Fe, Mn, Cu, Cr, Cd, Zn y Pb entre las fases geoquímicas de los sedimentos ácidos de tres sitios de muestreo del lago. Discutir la toxicidad potencial para la biota bentónica.
- Determinar el coeficiente de partición de hierro entre la columna de agua y los sedimentos.
- Establecer la relación que existe entre metales y materia orgánica en los sedimentos de un lago ácido.
- Modelar la concentración de hierro en base al caudal afluente y la carga de este metal. Discutir la existencia de un sistema buffer de hierro en el lago.

2.3 Hipótesis

- El contenido de metales en los sedimentos ácidos de Caviahue es bajo en comparación con ambientes acuáticos neutros o alcalinos.
- La carga de metales asociada a materia orgánica es alta debido a las condiciones desfavorables para la formación de otras fases como carbonatos, óxidos o pirita.
- Existe un sistema buffer de hierro que controla su concentración en función del pH.

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Recolección de muestras, procesamiento y mediciones *in situ*

En enero de 2013 se recolectaron muestras de sedimentos de los sitios más profundos del BN y BS, y del delta del RAS (Centro), mediante el uso de un corer tipo Uwitec de 6 cm de diámetro (Figura 3). Cada perfil de 16 cm de profundidad se seccionó en cinco estratos de: 2 cm para el horizonte superficial (0-4 cm) y 4 cm de allí en más (4-16 cm). Previo a cada corte, se registró el Eh y pH (Orion 920A; ajustado por temperatura) de cada estrato. Las muestras se almacenaron en bolsas de polietileno en atmósfera de N_2 a 4°C (en el campo) por no más de 24 h, hasta que se congelaron (-20°C) en el laboratorio. Los análisis se realizaron la semana posterior al muestreo.

Simultáneamente, se tomaron dos juegos de muestras: 1) de agua de los brazos y del Centro (de superficie y fondo) utilizando una botella Van Dorn de 4 L, y 2) a lo largo de una transecta que se extendió entre el RAS (50 mts río arriba) y el BN del lago (sitio de descarga, 5, 50, 100 y 250 mts aguas adentro). Las muestras se filtraron por membranas de acetato de 0,45 μm y se almacenaron en botellas de polietileno a 4°C y pH 2,0. Luego de no más de una semana se midió la concentración de Fe, Cu, Cr, Zn, Mn, Cd y Pb.

En el laboratorio, las muestras de sedimento se homogeneizaron a mano dentro de la bolsa contenedora y con cuidado para impedir la entrada de aire. Se pesaron alícuotas de sedimento fresco y anóxico, correspondientes a 1 g de peso seco (ps) en tubos de polipropileno de 50 mL o de vidrio (según el método) y se procedió a la extracción de metales. Todos los solventes utilizados se prepararon con reactivos de grado analítico y agua desionizada y se burbujearon con N_2 por 1 h previo a su uso con el fin de remover el O_2 disuelto y así preservar la distribución de metales en las distintas fracciones susceptibles a oxidación. Los procedimientos de extracción se completaron dentro de las 48 h.

2.4.2 Contenido de agua, materia orgánica y ácidos húmicos

El contenido de agua se estimó luego de secar 5 g de sedimentos de los distintos estratos en estufa a 60°C, hasta que no se registraron variaciones en el peso. El contenido de materia orgánica se determinó por diferencia entre el peso seco y el peso de las cenizas luego mantener el sedimento a 550°C por 4 h en un horno mufla (APHA, 1992).

La extracción de ácidos húmicos se realizó siguiendo el protocolo recomendado por la International Humic Substances Society (IHSS) y se detalla con precisión en la sección 3.2.2.

2.4.3 Análisis químico

2.4.3.1 Extracción secuencial de metales

El método utilizado para el fraccionamiento de metales sedimentarios fue el propuesto por Tessier *et al*., (1979), con la modificación de la digestión total, y consistió en la obtención de las siguientes fracciones sobre tres réplicas de cada sitio y estrato de sedimento:

i. Intercambiable: se agregaron 8 mL MgCl 1 M a pH 7,0 a los tubos de polipropileno conteniendo el sedimento fresco y se agitó por 1 h a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 4500 rpm, se removió el sobrenadante con pipeta Pasteur y se filtró por membranas de acetato de celulosa de 0,45 μm. El extracto se almacenó a 4 °C por 48 h hasta su determinación.

ii. Ligado a carbonatos: al residuo de (i) se le agregaron 8 mL de NaOAc 1M ajustado a pH 5,0 con HOAc y se agitó por 5 h a temperatura ambiente. El sobrenadante se procesó como se indicó en (i).

iii. Ligado a óxidos de Fe y Mn: al residuo de (ii) se le agregaron 8 mL de $NH_2OH{\cdot}HCl$ 0,04 M en HOAc 25% (v/v) y se calentó en baño termostático a 96±4°C por 6h con agitación ocasional. El sobrenadante fue procesado como se indicó en (i).

iv. Ligado a pirita y materia orgánica: al residuo de (ii) se le agregaron 3 mL de HNO_3 0,02 M y 5 mL de H_2O_2 30% ajustada a pH 2,0 con HNO_3 y se calentó a 85±3°C en baño termostático por 2 h con agitación ocasional. Al cabo de ese tiempo, se agregó otra alícuota de 3 mL de H_2O_2 30% (a pH 2,0 con HNO_3) y se continuó calentando a 85±3°C por 3 h. Pasadas las 5 h, se dejó enfriar la mezcla y se agregaron 5 mL de NH_4OAc 3,2 M en HNO_3 20%. Finalmente se diluyó la muestra a 20 mL. El sobrenadante se procesó como se indicó en (i). El agregado de acetato de amonio se realiza para evitar la readsorción del metal extraído al sedimento oxidado.

v. Residual: se pesaron 0,5 g de sedimento seco, se colocaron en matraces de 100 mL con el agregado de 6 mL de H_2SO_4 y se calentó a 450°C por 6 min. Al cabo de ese tiempo, se agregaron 6 mL de H_2O_2 por goteo y se continuó la ebullición de la mezcla por 6 minutos más. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con agua desionizada (Carter, 1993).

El protocolo fue aplicado en forma preliminar para evaluar el contenido aproximado de cada fracción en los sedimentos ácidos de Caviahue y se encontró que la concentración de metales en la fracción intercambiable estuvo por debajo del límite de detección. Por ello, se eliminó este paso en la extracción definitiva. Además, se modificó el paso (v) según Carter (1993) debido a que la oxidación con H_2O_2 30% del paso (iv) no destruye completamente MO recalcitrante (Tessier *et al.*, 1979; Gleyzes *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2008). De esta forma, solo se completa la oxidación iniciada en el paso (iv) y se obtiene la totalidad del metal extraíble en el paso (v). La desventaja es que no se conoce la proporción de metales en la fracción mineral del sedimento.

Todo el material utilizado se lavó previamente con HNO_3 30% y agua desionizada.

2.4.3.2 Extracción de sulfuros volatillizables y los metales asociados

Para la extracción de sulfuros volatilizables por ácido se utilizó un dispositivo similar al descripto por Allen *et al.*, (1993) que consistió en colocar la alícuota de sedimento fresco en frascos

de vidrio con tapa de teflón a los que se aplicó una corriente de N_2 por 30 minutos para eliminar el exceso de H_2S. Al cabo de ese tiempo se agregaron 10 mL de HCl 1M utilizando una jeringa de vidrio y se agitó la mezcla vigorosamente en un agitador magnético, por 1 h. El flujo de N_2 conteniendo el H_2S liberado por la disolución de sulfuros metálicos se burbujeó en otro frasco con una solución de NaOH 1M. El H_2S re-disuelto en la solución básica se determinó por el método iodométrico (APHA, 1992), mientras que la mezcla de extracción se centrifugó a 4500 rpm y se determinó el contenido de metales en el sobrenadante. El porcentaje de recuperación se determinó utilizando concentraciones conocidas de NaS previo al análisis de sedimentos. En todos los casos se trabajó con 3 réplicas por estrato.

2.4.3.3 Cuantificación de metales

La concentración de metales en los extractos fue determinada utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica a la llama (PE Analyst 100). Los estándares se prepararon en cada una de las matrices y se sometieron a las mismas condiciones que las muestras. Cuando el contenido de metales excedió el límite de la linealidad, se realizaron diluciones en la matriz correspondiente. El límite de detección de acuerdo con la masa de sedimento analizada fue de 0,5 $\mu g\ g^{-1}$ de sedimento seco.

2.4.3.4 Cuantificación de fósforo

La concentración de fósforo se determinó en todos los extractos del procedimiento secuencial obtenidos de BN de acuerdo con Murphy y Riley (1962). El límite de detección se halló por debajo de 0,1 $\mu g\ g^{-1}$.

2.4.4 Concentración de hierro en la columna de agua

Tabla 5 pH, carga de hierro, caudal afluente del RAS y concentraciones de hierro en el lago para el período 1999–2004. Los datos fueron tomados de Pedrozo *et al.*, 2008. (C_{af}: carga de hierro; Q_{af}: caudal afluente; N/D: no determinado; *t*: tonelada;*dato de Varekamp, 2008)

Fecha de muestreo	pH	Q_{af} (m^3/s)	Fe C_{af} ($t\ mes^{-1}$)	[Fe] Lago ($mg\ L^{-1}$)
03/99	2,11	0,71	530'	21,5
06/99	N/D	1,84	625	19,6
12/99	2,45	2,16	297	20,4
01/00	2,30	1,68	231	21,2
07/00	2,20	3,30*	1121	20,8
11/00	2,61	2,80	138	21,9
03/01	2,45	0,67	313	21,4
03/03	2,63	0,96	458	23,1
03/04	2,76	0,35	283	22,4

2.4.5 Concentración de hierro y coeficientes de partición

Se determinó la concentración de hierro en las muestras de agua del lago para estimar el coeficiente de partición $\Pi = C_{sed}/C_{di}$, donde C_{sed} es la concentración sedimentaria de hierro y C_{di} el hierro disuelto en el agua del fondo del lago (O'Connor 1988). La cuantificación se realizó como se especificó en 2.4.3.3 utilizando agua desionizada como blanco.

2.4.6 Modelado de la concentración de hierro

En función del caudal afluente al lago y de la carga de hierro asociada en el período 1999-2004, se modeló la concentración esperada para este metal (Tabla 5; datos tomados de Pedrozo *et al.*, 2008). Para ello se utilizó un modelo de contaminación progresiva desarrollado por Varekamp (2003, 2008) en lagos no estratificados. La ecuación

$$C_t = C_{ss}\left(1 - e^{-TR/t}\right) + C_0\, e^{-TR/t} \qquad (3)$$

donde C_t es la concentración a un tiempo t y carga de metales dados (L_{af}), TR es el tiempo de residencia del agua y C_0 es la concentración inicial de cada período (en todos los casos se utilizó la

concentración final del período anterior). La concentración de estado estacionario C_{ss} se calculó como C_{af} *TR/V,* donde *V* es el volumen del lago. El tiempo de residencia (*TR*) empleado en el modelado fue de 31,2 meses (Rapacioli, 1985) ya que con el calculado por Varekamp (2003;2008) se subestimó la concentración de hierro a lo largo de todo el período. La C_{af} se proyectó utilizando la interpolación al vecino más cercano, excepto para 7/2000 que se consideró por solo dos meses debido a que la influencia de la erupción del Volcán Copahue no se extendió en el tiempo.

2.4.7 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para la determinación de diferencias significativas entre las concentraciones de metales, pH, Eh, MO y AH, entre sitios y estratos. Las diferencias se validaron utilizando la prueba de contrastes ortogonales. El nivel de significación se fijó en $\alpha = 0,05$. El grado de correlación de las variables se determinó utilizando la prueba de Pearson. Todos los análisis se realizaron utilizando Infostat 2014.

2.5 Resultados y discusión

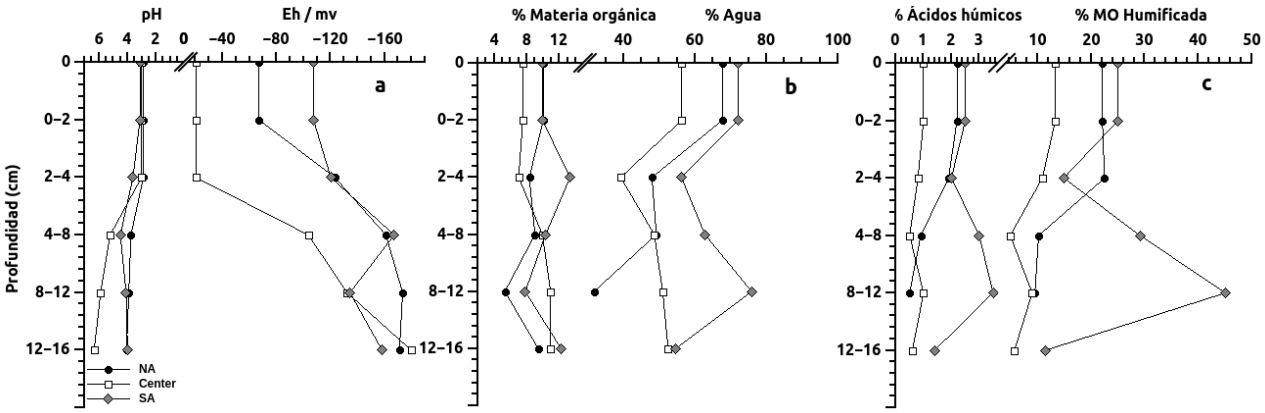


Figura 9 **pH, Eh, MO y contenido de agua en el perfil vertical de sedimentos, A: pH y Eh, B: MO y porcentaje de agua.**

2.5.1 pH y potencial redox

De acuerdo con las mediciones *in situ*, los brazos experimentaron la misma variación en el pH (3,0 a 4,0) mientras que en el centro se observó un incremento mayor hacia los estratos más profundos (3,0 a 6,0; Figura 9a). El potencial eléctrico evidenció una tendencia similar, aunque en este caso, los brazos difirieron en el estrato superficial (BN fue un 30% menor), y en C, los valores fueron consistentemente menores entre los 0 y 8 cm para finalmente igualar a los brazos hacia el estrato más profundo (Figura 9a)

El potencial eléctrico de la columna de agua fue de +680 mV y el pH de 2.9 en todo el perfil vertical de profundidad.

2.5.2 Contenido de agua, materia orgánica y ácidos húmicos

El contenido de agua en el sedimento también evidenció tendencias similares para los tres sitios entre los 0 y 8 cm (con los valores más altos en BS). En general, el grado de compactación fue mayor en BN y C (49%) que en BS (64%) (Figura 9b; Tabla 6). En BN, hacia los 12 cm el tamaño de partícula aumentó visiblemente y el contenido de agua cayó abruptamente, por lo que el muestreador no penetró a profundidades mayores.

El contenido de MO osciló entre 5 y 13% del sedimento seco, y fue similar al de otros sedimentos lacustres sobre los que se realizaron estudios de distribución de metales traza (Tack *et al.*, 1996; Åström, 1998; Stylianou *et al.*, 2007; Torres y Auleda, 2013). Por otra parte, el porcentaje de AH varió entre 0,5 y 3,5% y no mostró correlación con el %MO (r=0,12).

Analizando las variaciones de ambos, se observa que el contenido de AH en BN cayó un 75% hacia el estrato más profundo (2,2 a 0,5%; Figura 9c) mientras que la MO disminuyó solo en 50% (10 a 5%). En BS, la MO siguió la misma tendencia pero con valores más altos y los AH se incrementaron de 2,5 a 3,5% para caer finalmente a 1,5% del sedimento seco. En C, la concentración de MO creció ininterrumpidamente hacia el estrato profundo de 7,5 a 11,0% mientras que los AH disminuyeron de 1,0 a 0,5%. Globalmente, en C y BS se determinó un porcentaje levemente mayor de OM que en BN (Tabla 6) y el contenido de AH difirió significativamente en los 3 sitios (BS>BN>C).

Tabla 6 Resultados del análisis estadístico de Kruskal–Wallis para el contenido de agua, MO y AH. Las diferencias significativas (p<0.05) se expresaron con letras distintas. Los promedios de cada grupo se expresaron en mg g ps^{-1} y %.

Variable / Sitio	BN	C	BS	*p valor*	Promedios (mg g ps^{-1} y %)		
%Agua	a	a	b	>0,0001	a=49,28	b=64,28	
%MO	a	b	b	0,0150	a=8,13	b=9,97	
%AH	a	b	c	0,0001	a=1,38	b=0,77	C=2,49

La proporción de AH respecto de la MO total (MO humificada) disminuye hacia los estratos profundos de BN y C en concordancia con lo reportado para otros sedimentos lacustres (Meyers e Ishiwatari, 1993,1995; Figura 9c) mientras que en BS se observa un marcado aumento entre los 4 y 12 cm y finalmente una disminución hacia los 16 cm. Con el tiempo, el grado de condensación de los AH aumenta gradualmente, lo que implica una transformación en huminas (SH más recalcitrantes y con mayor grado de condensación e hidrofobicidad), motivo por el cual el contenido de AH disminuye hacia los estratos más profundos del sedimento (Meyers e Ishiwatari, 1993,1995)

EL grado de humificación de la MO mostró una fuerte correlación con otras dos variables, el

contenido de AH y de agua, lo que implica que el proceso de humificación en Caviahue es más eficiente a menor grado de compactación del sedimento.

2.5.3 Extracción secuencial de hierro

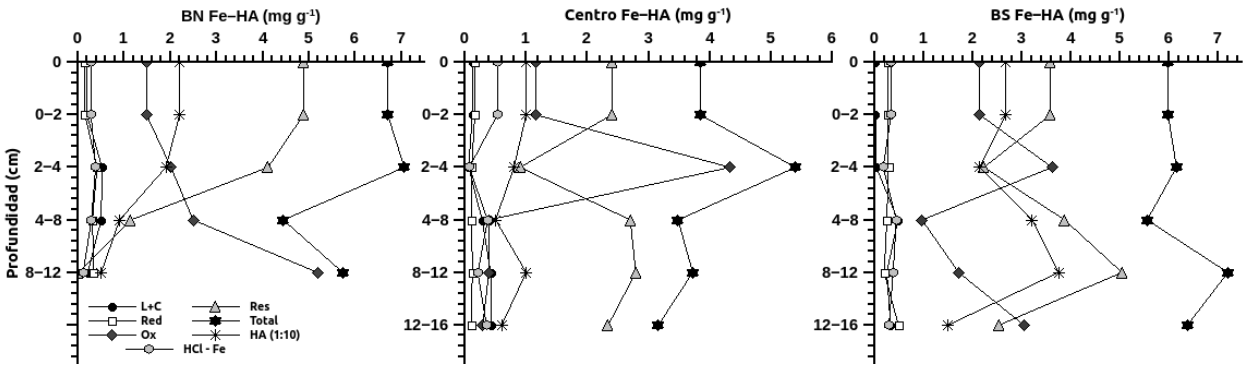


Figura 10 **Perfiles verticales de la extracción secuencial de hierro para BN, C y BS. Los rendimientos son comparados con el contenido de hierro reactivo (lixiviable con HCl 1M) y de AH. L+C corresponde a la fracción asociada al metal lábil y a carbonatos. La concentración de expresó en mg g^{-1} de sedimento seco.**

Los resultados globales de la extracción secuencial de Fe (Figura 10 y Tabla 33 del anexo) indicaron que el hierro asociado con las fracciones lábil/carbonatos y reducible representaron el 6±1% y 4±1% del hierro total, respectivamente. En contraste, las fases oxidable y reducible conteniendo el 38±10% y 52±11% del total, respectivamente. El Fe reactivo, lixiviado con HCl 1M, fue comparable con el de la fracción lábil.

Analizando el perfil vertical, en BN, la fracción oxidable mostró una tendencia inversa a la residual, aumentando su concentración entre 1,5 y 5,2 mg g^{-1} de sedimento seco y constituyendo aproximadamente el 90% del Fe total. Del mismo modo, en BS también se observó un comportamiento especular entre ambas fracciones. En este sitio, el Fe aumentó un 60% entre los 2 y 4 cm, disminuyó hasta un mínimo global entre los 4 y 8 cm (de 3,5 a 1 mg g^{-1}) y se incrementó finalmente a 3 mg g^{-1} a los 16 cm. En C, el contenido promedio de esta fase fue de 0,85 mg g^{-1} (15% del Fe total) para todos los estratos excepto el segundo, donde se registró un máximo de aproximadamente 3,3 mg g^{-1} (80% del Fe total).

Por otra parte, la fracción residual en BN disminuyó ininterrumpidamente representando 73% del

Fe total en el estrato superficial y 0% a los 12 cm de profundidad. En C, el comportamiento fue inverso al de la fracción oxidable disminuyendo el promedio vertical de 2,5 a 0,9 mg g^{-1} solo entre los 2 y 4 cm. Por último, en BS se observó una caída en el contenido de Fe en la primera transición, luego un aumento significativo entre los 4 y 12 cm y finalmente disminuir a 2 mg g^{-1}.

En suma, se observaron dos tendencias: 1) dado que solo las fracciones oxidable y residual fueron mayoritarias, su comportamiento es especular en la mayoría de los casos, y 2) el comportamiento de los perfiles de en C y BS mostraron una correlación significativa ($p<0,05$) excepto en el estrato profundo (0-2 cm, r=0,997; 2-4 cm, r=0,917; 4-8 cm, r=0,987; 8-12 cm, r=0,994 y 12-16 cm, r=0,505;). Sin embargo, el contenido absoluto de metal difirió significativamente en ambos sitios (Tabla 7). En el análisis de correlación se tuvieron en cuenta todas las fases geoquímicas determinadas.

El contenido total de Fe en los sedimentos de Caviahue determinado por EDS fue de 2,5% (Temporetti *et al.*, 2013) y de 0,5% por digestión parcial (Figura 10 y Tabla 33 del anexo), y resultó similar al reportado por Young y Harvey (1992) para sedimentos ácidos de cuatro lagos en Canadá. En contraste, los valores de Fe total hallados en sedimentos cercanos a la neutralidad son mucho mayores, oscilando entre 4,0 y 10,0% del sedimento seco (Nissenbaum y Swaine, 1976; Tessier *et al.*, 1979; Chao, 1984; Track *et al.*, 1996; Åström, 1998; Beck y Sneddom, 2000; Stylianou *et al.*, 2007; Koretsky *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009; Torres y Auleda, 2013; entre otros). La diferencia se atribuye a que la solubilidad del metal en el Lago Caviahue es muy superior debido a su bajo pH y el Fe se encuentra mayormente disuelto mientras que en los ambientes neutros está precipitado en los sedimentos.

El análisis de la concentración de Fe por sitio arrojó diferencias significativas para las fracciones reducible, oxidable y total (Tabla 7). En todos los casos se agruparon BN y BS por un lado y C por otro.

Tabla 7 Resultados del análisis estadístico Kruskal–Wallis para el contenido de hierro en las distintas fracciones. Las diferencias significativas (p<0.05) se expresaron con letras distintas. Los promedios de cada grupo se expresaron en mg g ps^{-1} y %.

Variable / Sitio	BN	C	BS	*p* valor	Promedios (mg g ps^{-1} y %)	
Fe–Lábil	a	a	a	0,070	a=0,27	
Fe–Reducible	a	b	a	>0,0001	a=0,28	b=0,12
Fe–Oxidable	a	b	a	0,0044	a=2,46	b=1,31
Fe–Residual	a	a	a	0,229	a=2,66	
Fe–Total	a	b	a	>0,0001	a=5,91	b=3,92
Fe–HCl	a	a	a	0,588	a=0,29	

Por otra parte, el análisis entre estratos también arrojó diferencias significativas (p=0,00063), aunque se observó el mismo patrón en los tres sitios (Tabla 8). BN y BS mostraron variaciones porcentuales similares excepto para la segunda transición mientras que los porcentajes en C fueron solo comparables con BN y BS en la segunda y cuarta transición, respectivamente.

Tabla 8 Diferencias porcentuales en el contenido de hierro entre estratos. N/D: no determinado.

Transición	BN (%)	C (%)	BS (%)
0–2 → 2–4	↑ 5,3	↑ 40	↑ 2,9
2–4 → 4–8	↓ 37	↓ 35	↓ 10
4–8 → 8–12	↑ 28	↑ 6,7	↑ 29
8–12 → 12–16	N/D	↓ 15	↓ 11

Las condiciones físico-químicas de los sedimentos de Caviahue son desfavorables (pH<5,0; Stumm y Morgan, 1996) para la formación de sulfuros metálicos y carbonatos, por ello la cantidad de hierro asociada con estas fracciones fue baja. Asimismo, debido a que los óxidos de Fe se disuelven a pH<3,5 (Stumm y Morgan, 1996) y a que el sedimento es anóxico en todo el perfil, es congruente que la fracción reducible (asociada a este material) haya representado solo un 4% del Fe total. Ambas fracciones aumentaron levemente con la profundidad y ello es consecuente con la superación del pH umbral de precipitación del Fe^{+3}.

Por otra parte, las distintas combinaciones de pH y Eh determinadas en los sedimentos de Caviahue no favorecen la formación de pirita (ni la de FeS; Figura 7 y Figura 8) ya que la concentración necesaria de Fe(II) para ello osciló entre 1 y 98 mmol L^{-1} en el agua intersticial (ai).

Sin embargo, la pirita es muy estable una vez sintetizada (Butler y Rickard, 2000). Blodau *et al.* (2000) observaron en lagos ácidos de mina (76, 78 y 116, Alemania) que a medida que el pH aumenta, la concentración de Fe^{+2} disminuye; ellos infirieron que este fenómeno se debe a la formación de pirita. En los ambientes en que este mineral se forma a tasa altas, la concentración de Fe en el agua intersticial tiende a hallarse en el rango micromolar (Huerta–Diaz y Morse, 1990; Huerta–Diaz y Morse, 1992; Raiswell *et al.*, 1994; Koretsky *et al*., 2008). Sin embargo, la concentración promedio de Fe^{+2} detectada en el año 2010 en los sedimentos de Caviahue fue de 1,4±0.4 mmol L ai^{-1} en BN y de 1,9±0,9 mmol L ai^{-1} en BS, mientras que el contenido de Fe^{3+} fue de 0,26±0,1 mmol L ai^{-1} y de 0,10±0,01 mmol L ai^{-1} respectivamente (Temporetti, comunicación personal). De acuerdo con estos datos, el Fe^{+3} constituyó el 19% del hierro disuelto en BN y el 6% en BS. Wendt–Potthoff y Koschorreck (2002) y Koschorreck *et al.* (2008) también reportaron valores igualmente altos para los sedimentos de Caviahue. Además, Krom y Sholkovitz (1978) también registraron valores altos de Fe^{+3} disueltos en los sedimentos anóxicos del Lago Duich (Escocia) y determinaron que el metal estaba en íntima relación con materia orgánica de bajo (<1 kD) y alto (>1 kD) peso molecular, tal como oxalatos, ácidos fúlvicos (AF) y húmicos (AH). La MO en general, y los AH en particular, forman complejos con el hierro (Fe-OM) que pueden estar disueltos, agregados (formando coloides solubles) o precipitados recubriendo las partículas del sedimento. La alta afinidad de los AH por el Fe en sus dos estados de oxidación (+2 y +3) es reportada en este trabajo (Capítulo 2) y por otros autores (García–Mina *et al.*, 1995; Tipping *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2013; entre otros). En suma, dado que el H_2O_2 30% (7M aproximadamente) a la temperatura de reacción disuelve eficientemente la pirita (Dimitrijević *et al.*, 1996; Chirita, 2007; Chirita, 2009) y destruye la MO más reactiva (menor PM), se atribuyó a la fracción oxidable el contenido de Fe-piritico, asociado a FeS y formas más reactivas de materia orgánica (Nissenbaum y Swaine, 1976; Tessier *et al.*, 1979; Chao, 1984; Åström, 1998; Koretsky *et al*., 2008; Rodríguez *et al.*, 2009). Es decir, aun cuando las condiciones para la formación de pirita no son las óptimas, su formación no está impedida. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este paso no destruye

eficientemente la MO recalcitrante, de la que los AH forman parte (Nissenbaum y Swaine, 1976; Tessier *et al.*, 1979; Chao, 1984; Åström, 1998; Koretsky *et al*., 2008).

Finalmente, la fracción residual contuvo el 52% del hierro total, promediando todos los sitios y estratos. Teniendo en cuenta que la digestión final del sedimento no disuelve la andesita (roca madre del sedimento) y la similitud en los perfiles de AH y esta fracción de Fe, se analizó el grado de correlación entre ambas variables por medio de la prueba de Pearson. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron de r =0,999 y r =0,976 para BN y BS respectivamente, lo que implica una íntima asociación entre ambos. En C, el indicador no fue significativo (r =0,050, $p<0,05$) aunque entre los 4 y 16 cm los perfiles muestran la misma tendencia (Figura 10). De acuerdo con este hallazgo, Luther *et al.* (1996) determinaron en su estudio sobre el ciclo del Fe disuelto en sedimentos anóxicos y ácidos que su concentración disminuía abruptamente a pH<3,0 y concluyeron que el fenómeno podía ser descripto por la siguiente ecuación,

$$Fe(AH)_{aq} + xsH^{+} \rightarrow Fe(AH)_{s} \qquad (4)$$

de la que se desprende que complejos acuosos Fe(AH) precipitan en presencia de cantidad suficiente de protones,y ello sucede cuando el pH baja por debajo de 3,0. Por su parte, Ferdelman *et al*. (1991) hallaron que conforme aumenta el pH del sedimento hacia los estratos más profundos del perfil vertical del sedimento, disminuye el rendimiento de extracción de Fe realizada con solventes alcalinos indicando la posible disminución de complejos de Fe-AH precipitados. Asimismo, Young y Harvey (1992) estudiaron siete lagos en Ontario (Canadá) de los cuales cuatro son ácidos (pH=5,31 en promedio) y tres circumneutros, y encontraron que en los primeros el hierro sedimentario estuvo igualmente distribuido entre las fases e(de óxidos de Fe y materia orgánica mientras que en los segundos la fracción orgánica se redujo considerablemente. Estos autores obtuvieron la fracción orgánica por medio de hidrólisis alcalina, método utilizado universalmente para la extracción de SH. En la bibliografía se encuentran otras comparaciones entre el contenido de Fe en las distintas fases geoquímicas (por ejemplo en Nissenbaum y Swaine, 1976) y Reyes–Solís *et al.* 2009) aunque los estudios fueron realizados sobre sedimentos neutros y su comparación con la

distribución hallada en Caviahue carece de sentido.

2.5.4 Determinación de fósforo en los sedimentos

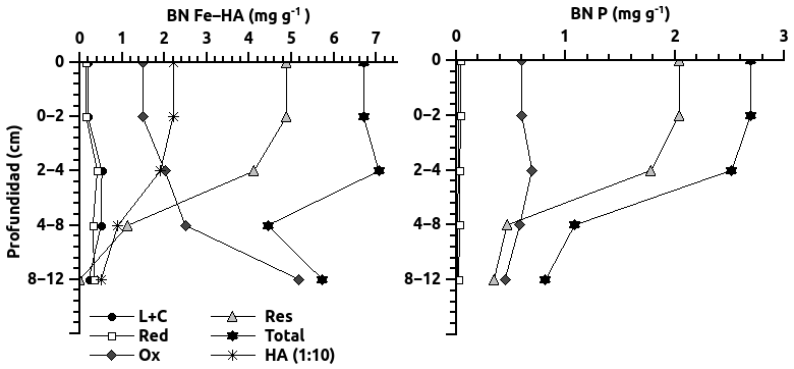


Figura 11 **Perfiles verticales de la extracción secuencial de hierro para BN y determinación de fósforo en los extractos. Los rendimientos son comparados con el contenido de AH. L+C corresponde a la fracción asociada al metal lábil y a carbonatos. La concentración se expresó en mg g^{-1} de sedimento seco.**

En la Figura 11 se compara el contenido de AH, Fe y P en el perfil vertical del sedimento de BN. En la misma se observa fuerte correlación entre el perfil de P y los de Fe y AH ($r=0,995;p<0,05$) (la asociación de los dos últimos se discutió en la sección 2.5.3) de acuerdo con la predicción de Paludan y Jensen (1995). La asociación de ambos elementos con los AH es significativa y la precipitación de estos últimos con Fe influiría en la dinámica del P en este sedimento ácido, controlando su disponibilidad. Además, la extracción con H_2O_2,que representa el P asociado a pirita y MO no recalcitrante, rindió aproximadamente 10 veces menos que la residual, mientras que las fracciones de P intercambiable, asociado a carbonatos y óxidos de Fe resulto 100 veces menor.

Por otra parte, el contenido de P-AH y el de las fracciones diseñadas para disolver los carbonatos de calcio y los óxidos de hierro estuvo en el orden de magnitud del informado por Temporetti *et al.* (2013) estimado mediante el protocolo de Hieltjes y Lijklema (1980), para el mismo sitio. En este último, las fases de FeOOH y $CaCO_3$ se estiman por extracción con solventes análogos, y el P orgánico por la diferencia entre el contenido extraíble/total. La digestión pseudo-total se realizó por el mismo método (Carter, 1993).

2.5.5 Extracción de metales traza sedimentarios

2.5.5.1 Procedimiento de extracción secuencial

Los procedimientos de extracción secuencial de metales traza fueron los mismos que para hierro (Tessier *et al.*, 1979; Allen *et al.*, 1993), por lo que las fracciones recibirán el mismo nombre.

En la Figura 12 se observan los perfiles de la extracción secuencial de Mn, Cu, Pb, Cr y Zn (Tabla 33 y Tabla 34 del anexo). Las únicas fracciones en las que se detectó la presencia de estos metales fueron la oxidable y la residual. Esta distribución concuerda con el postulado de que las condiciones físico-químicas de los sedimentos de Caviahue son desfavorables para la formación de las fases correspondientes a carbonatos y óxidos de hierro, y con el bajo contenido de Fe determinado en estas últimas (6% y 4 % del total; Figura 10). De acuerdo con ello, la detección de Fe y no de los otros cationes se debe a que su concentración en la columna de agua es 20 veces mayor que la de Mn y tres o cuatro órdenes de magnitud mayor que el de los metales traza estudiados, que además son más solubles al pH del lago y del sedimento (Figura 6 y Figura 7).

El orden en función del contenido total de metal fue: Pb>Cr>Mn>Cu>Zn. El Mn, a pesar de no ser un metal traza, se comportó como tal debido a que el pH ácido del sedimento de Caviahue se encuentra por debajo de su umbral de precipitación.

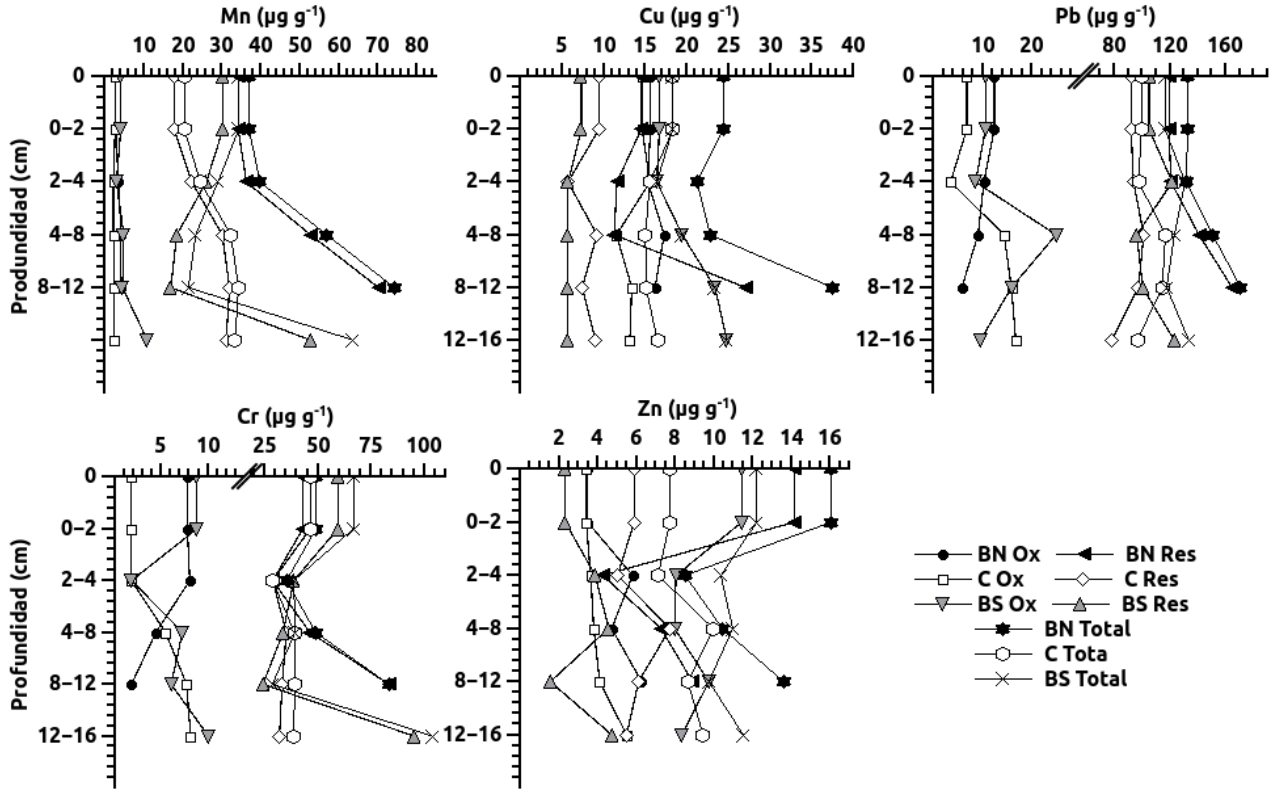


Figura 12 **Perfiles verticales de la extracción secuencial de a) Mn, b) Cu, c) Pb, d) Cr y e) Zn para BN, C y BS. La concentración se expresó en µg g^{-1} de sedimento seco.**

Todos los metales traza determinados por este método de extracción se hallaron íntimamente relacionados con las fracciones más recalcitrantes del sedimento, y debido a ello su movilidad potencial es muy baja y no representan un riesgo para la biota bentónica (Lesmes, 1996; Rendina *et al.*, 2001). El índice de movilidad ($IM=M_R/M_T$) propuesto por Lesmes (1996), donde M_R hace referencia al metal residual y M_T al total, no fue calculado debido a que en la fracción residual no se determinó el contenido de metales remanentes en la andesita (roca madre del sedimento) y por lo tanto se lo estaría subestimando.

No se observa un patrón único que permita explicar el contenido de los metales traza estudiados (Figura 12). De acuerdo con Varekamp (2008) ello se debe a que los flujos de agua (tanto afluentes como efluentes) y la carga de metales son altamente variables, además de la fuerte influencia del pH y Eh locales sobre los equilibrios de precipitación (del mismo modo que para el Fe). En Caviahue estos flujos son altamente dependientes del grado de actividad que presente el Volcán Copahue y de su concentración en la roca madre lixiviada. Al respecto, Varekamp (2008; 2009) intentó modelar la

concentración de metales traza en la columna de agua en función de las cargas estimadas para un período de 7 años y no halló ningún patrón de correlación.

En los párrafos siguientes se discutirá el contenido de metales individualmente:

Manganeso

El 89% del Mn se halló asociado a la fracción residual (previamente asignada a AH), que resultó significativamente más enriquecida en el metal respecto de la oxidable ($p<0,0001$). Su contenido total osciló entre 43-87 μg g^{-1} en BN, 24-40 μg g^{-1} en C y 40-74 μg g^{-1} en BS. En los tres sitios se observó una tendencia al aumento en función de la profundidad en el sedimento (Figura 12; Tabla 33 del anexo). Además, su contenido fue comparable en los brazos mientras que en C fue significativamente menor (50%; $p=0,0066$). Este metal suele hallarse en concentraciones mayores en sedimentos neutros, y asociado a las fracciones de carbonatos, óxidos de Fe y Mn, y residual (Tessier *et al.*, 1979, Åström, 1998).

Cobre

El Cu no mostró una tendencia única en los tres sitios. En C y BS el 89% estuvo asociado a la fracción oxidable mientras que en BN la distribución entre ambas fracciones fue igual. Su contenido varió entre 27-55 μg g^{-1} en BN, 16-22 μg g^{-1} en C y 10-24 μg g^{-1} en BS (Tabla 34 del anexo). En este caso, el sedimento de BN fue significativamente más rico ($p=0,024$) que C y BS.

Este metal, tiene una alta afinidad por la MO (Capítulo 2 de esta tesis; Rendina *et al.*, 2001a; Rendina *et al.*, 2001b) y además suele encontrarse piritizado en sedimentos anóxicos donde esta fase geoquímica se forma a tasas altas (Huerta Díaz y Morse, 1990, 1992; Nava-López y Huerta Díaz, 2001). Por ello se estima que su distribución entre MO lábil, pirita y AH dependió de las condiciones físico-químicas sedimentarias al momento de la formación de cada estrato del sedimento.

El Cu sedimentario estuvo dentro del rango bibliográfico para ambientes no contaminados (Tessier *et al.*, 1979; Åström, 1998) o levemente contaminados (Kwong y Lawrence, 1998; Rendina

et al. 2001a). Redina *et al.* (2001a) hallaron valores similares a los nuestros (26 a 38 μg g^{-1} de Cu, mayormente asociado a la fracción residual) en sedimentos de zonas con y sin influencia antrópica del Río Matanza-Riachuelo. Sin embargo, el contenido relativo resultó menor dado que el metal disuelto fue aproximadamente 10 veces mayor en el río urbano (Magdaleno *et al.*, 2001; Varekamp, 2008), indicando que los sedimentos del Caviahue poseen una alta capacidad para retener el metal. Abrameto *et al.* (2014) determinaron que el contenido sedimentario promedio de 24 μg g^{-1} de Cu en el Río Negro (Río Negro, Argentina) aunque ellos estudiaron solo la fracción arcillosa del sedimento y posiblemente hayan sobre-estimado su contenido. Por otra parte, Tatone *et al.* (2014) encontraron 49 μg g^{-1} en los sedimentos de la Laguna Inés (Río Uruguay, Entre Ríos, Argentina).

En cambio, los ambientes fuertemente contaminados por actividad minera contienen entre 1,7 y 5 mg g^{-1} Cu sedimentario (Galán *et al.*, 2003; Kirschbaum, *et al.*, 2012; Torres y Auleda, 2013) presentando un riesgo potencial mucho mayor.

Plomo

El contenido de Pb fue el más alto entre los metales traza. Del mismo modo que Mn, la fracción residual (90% del Pb total) fue significativamente más rica que la oxidable ($p<0,0001$). Su contenido total (o por fracciones) fue muy similar, y osciló entre 127-162 μg g^{-1} en BN, 97-112 μg g^{-1} en C y 112-128 μg g^{-1} en BS. Del mismo modo que el Mn, el Pb muestra una tendencia al aumento con la profundidad en el sedimento.

En oposición con el Cu, el Pb posee una baja tendencia a estar piritizado (Huerta Díaz y Morse, 1990) y alta tendencia a formar sulfuros metálicos (Tabla 4) y complejos con AH y MO en general (Capítulo 2; Irving y Williams, 1953; Rendina *et al.*, 2001a,b). De acuerdo con ello, su asociación en el sedimento de Caviahue es con la fracción asignada a estos últimos y se discutirá en la sección 2.5.5.2 su proporción.

El Pb, a pesar de hallarse en concentraciones mayores a las de ambientes nada o levemente contaminados (Bertin y Bourg, 1998; Beck y Sneddon, 2000; Rendina *et al.*, 2001b; Abrameto *et*

al., 2014; Tatone *et al.*, 2014) y similares a las de ambientes moderadamente polucionados (Calmano *et al.*, 1992; Tack *et al.*, 1996; Stylianou *et al.*, 2007; Torres y Auleda, 2013) tiene una baja probabilidad de disolución hacia la columna de agua (Lesmes, 1996).

De forma análoga a lo que ocurre con el Cu, los ambientes fuertemente contaminados con Pb poseen valores que van desde 1,7 a >5,0 mg g^{-1} (Galán *et al.*, 2003; Kirschbaum, *et al.*, 2012) por ejemplo en la mina La Concordia, en el noroeste argentino o el río Tinto, en el suroeste español.

Cromo

Este metal, al igual que Pb y Mn, estuvo significativamente concentrado en la fracción residual del sedimento (91%; $p<0,0001$) y no se observaron diferencias entre los tres sitios muestreados. Además, exhibe el mismo patrón de aumento hacia los 16 cm. Su contenido osciló entre 37-84 µg g^{-1} en BN, 29-49 µg g^{-1} en C y 29-113 µg g^{-1} en BS.

Su comportamiento respecto de la piritización es similar al del Pb, hallándose comúnmente asociado a otras fracciones (Huerta Díaz y Morse, 1990; 1992; Nava-Lopez y Huerta Díaz, 2001), como los AH, por ejemplo.

En ambientes reductores donde el azufre se encuentra bajo la forma de sulfuro (S^{-2}), la toxicidad del Cr es despreciable ya que este se encuentra como Cr^{+3} y no como CrO_4^{-2}, la forma más nociva. Sin embargo, el metal y el sulfuro no se encuentran ligados químicamente, formando complejos solubles o precipitados como sulfuro metálico (ver sección 2.5.5.2). Por esto último, y por la íntima relación con la fracción más recalcitrante, este metal no presenta un riesgo para la biota bentónica.

La comparación con otros ambientes ubica los sedimentos de Caviahue entre los valores más altos de Cr hallados en la bibliografía (Galán *et al.*, 2003; Kirschbaum, *et al.*, 2012; Torres y Auleda, 2013).

Zinc

El Zn resultó el metal minoritario de todos los estudiados. No se encontraron diferencias significativas ni en su distribución entre las fases geoquímicas ni entre sitios (Figura 12; Tabla 34

del anexo) y su contenido varió entre 7-18 μg g^{-1} en los tres sitios. Del mismo modo que el Pb, este metal posee baja tendencia a encontrarse piritizado y las fases en las que suele hallarse (dentro de las posibles en Caviahue) son los sulfuros de zinc y complejos con MO. También se discutirá su proporción en la sección 2.5.5.2.

Su concentración resultó menor que las reportadas para otros ambientes, sin necesidad de diferenciarlos por su grado de contaminación (Tessier *et al.*, 1979; Bertin y Bourg, 1998; Kwong y Lawrence, 1998; Beck y Sneddon, 2000; Rendina *et al.*, 2001a, 2001b; Galán *et al.*, 2003; Kirschbaum, *et al.*, 2012; Torres y Auleda, 2013; Abrameto *et al.*, 2014; Tatone *et al.*, 2014).

2.5.5.2 Extracción ácida de sulfuros volátilizables y metales asociados (HCl 1M)

En la Figura 13 (y la Tabla 32 del anexo) se muestran los perfiles de la extracción de sulfuros volatilizables por ácido (AVS) y los metales simultáneamente extraídos ([SEM]). En BN, la concentración de Fe-HCl fue superior a la de S^{-2} en los estratos medios mientras que la tendencia fue invertida en los extremos (Figura 13**a**). En C y BS, el contenido de Fe-HCl fue superior en el primer y último estrato, respectivamente (Figura 13c y e). Las dos variables, teniendo en cuenta los tres sitios, mostraron una fuerte correlación ($r=0,988$; $p<0,05$) y ello puede apreciarse en el patrón de variación similar de sus perfiles (Figura 13a, c y e).

Por otra parte, la concentración sensiblemente mayor de S^{-2} en estos sitios posiblemente se deba a que la ventilación previa (con flujo de N_2) fue insuficiente dado el alto contenido de H_2S disuelto en el agua intersticial (Wendt-Potthoff y Koschorreck, 2002; Koschorreck *et al.*, 2003).

Para Cd, Cr y el contenido de todos los metales sumados (excepto el Fe-HCl; [SEM]) también se hallaron coeficientes de correlación altos ($r=0,942$; $r=0,817$; $r=0,987$, respectivamente; $P<0,05$), mientras que para Zn y Pb los coeficientes fueron bajos y no significativos. Sin embargo, en los brazos el Pb muestra una tendencia similar.

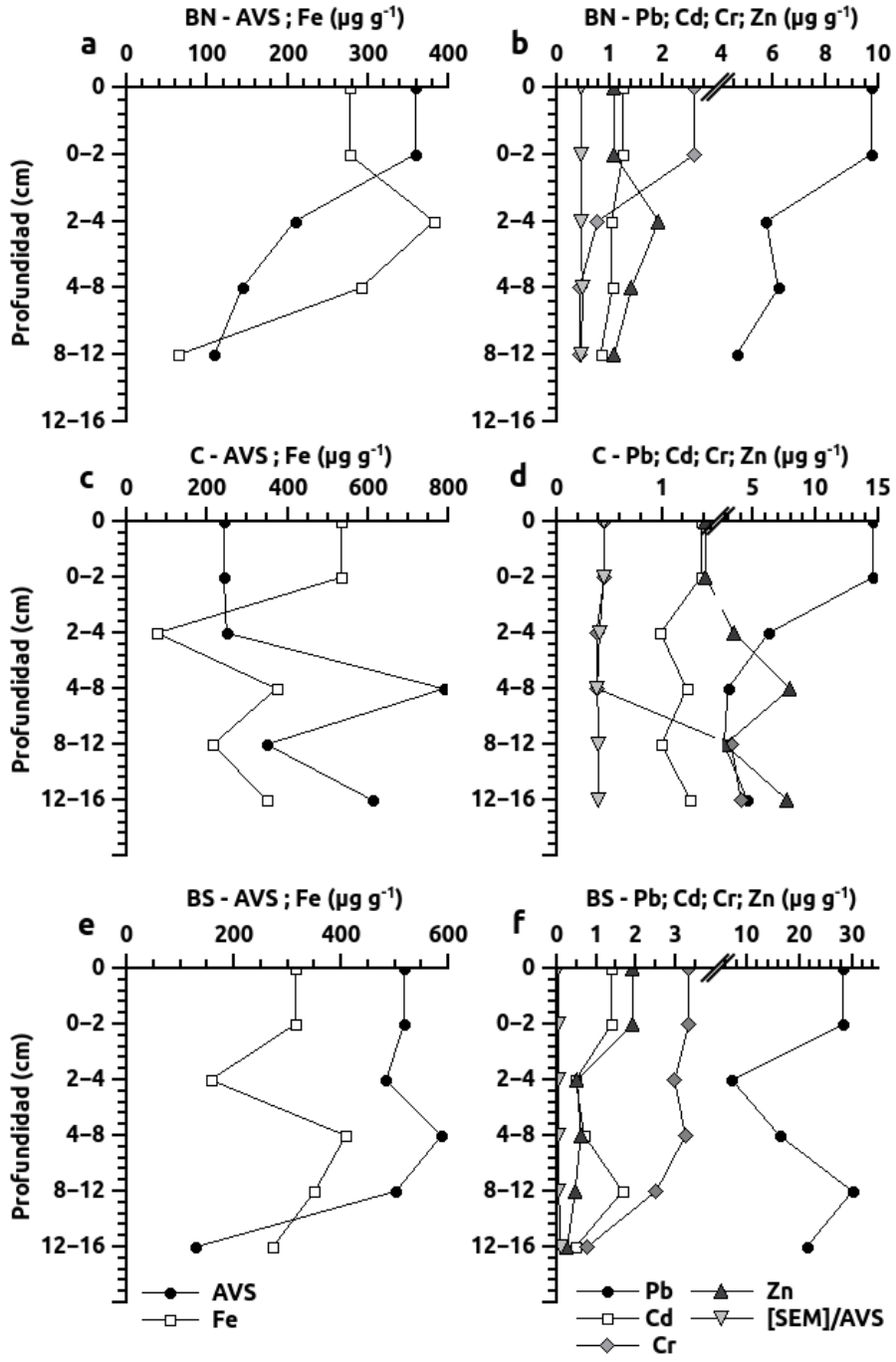


Figura 13 Extracción de sulfuros volátiles (AVS), hierro (a, c y e), metales traza asociados (SEM) y relación AVS/SEM (b, d y f) para BN, C y BS. La concentración se expresó en µg g^{-1} de sedimento seco.

Si bien el bajo pH de los sedimentos no favorece la producción de sulfuros metálicos, su formación no está impedida dado que se registró la presencia de metales en esta fase (0,1 a 14 µg g^{-1} de SEM). En la sección 2.5.5.1, la fracción oxidable de la extracción secuencial contiene metales que pueden provenir de sulfuros metálicos, metales complejados con MO lábil y metales piritizados. De acuerdo con ello, se relativizó el contenido de metal en las dos fracciones de interés

(HCl 1M y oxidable) y se halló que el sulfuro de plomo (PbS) dio cuenta del 40% del Pb oxidable mientras que para el ZnS fue del 35%. El Cr también se detectó en esta fracción (en un 25%) aunque como se mencionó en la sección 2.5.5.1 no precipita como CrS y probablemente provenga de complejos con MO solubilizables por ácido.

La determinación de un promedio de 0,92 μg g^{-1} de Cd contrastó con su ausencia en los extractos del procedimiento secuencial, donde posiblemente su contenido haya quedado enmascarado por la complejidad de la matriz extractante y el alto contenido de Fe.

El Cu estuvo ausente en todos los sitios y estratos, excepto en C 0-2 donde se determinó una concentración de 6,5 μg g^{-1}. Allen *et al*. (1993) concluyeron que el CuS no se solubiliza por HCl 1M, por lo que la proporción de este metal en cada fase no pudo ser estimada.

La relación [SEM]/AVS se utiliza como indicador potencial de toxicidad del sedimento. Un valor de este índice mayor a 1,0 implicaría que el contenido de sulfuros es insuficiente para precipitar la cantidad de metal fácilmente lixiviable, conllevando un riesgo para la vida bentónica. Por otra parte, si la concentración de S^{-2} disponible es mayor y la capacidad de carga de esta fase no ha sido superada, el índice toma valores menores a 1,0 (Allen *et al.*, 1993). Este último es el escenario que presentan los sedimentos de Caviahue, por lo que de acuerdo con este análisis tampoco presentan un riesgo para la vida acuática.

2.5.5.3 Niveles guía y calidad del sedimentos

La Ley General del Ambiente no contempla niveles guía de metales sedimentarios en su reglamentación, solo de cationes disueltos (además de otros compuestos químicos) para los distintos usos del agua (Tabla 2 y Tabla 3). Por ello se recurrió a la normativa ANZECC-ARMCANZ (2000) del Consejo Ambiental y de Conservación de Australia y Nueva Zelanda (Australian and New Zealand Environment and Conservation Council , ANZECC) y del Consejo de Administración de Agricultura y Recursos de Australia y Nueva Zelanda (Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, ARMCANZ) comúnmente utilizada como referencia en la

bibliografía; y a valores extraídos del consenso hallado en Swartz (1999) y Fairey *et al.* (2001).

De acuerdo con los valores guía establecidos por ANZECC-ARMCANZ (2000) y los consensuados, los umbrales de contaminación de Cr son de 80 µg g ps^{-1} (baja) y 370 µg g ps^{-1} (alta). En función de estos valores, los estratos profundos de BN (86 µg g^{-1}; 8-12 cm) y BS (113 µg g^{-1} ;12-16 cm), podrían considerarse levenete contaminados, aunque el nivel es bajo y su interacción con la columna de agua despreciable. El Pb se halló, en todos los casos, entre 50 y 220 µg g ps^{-1}. Estos valores corresponden a los límites bajo y alto, lo que indica un grado de contaminación moderado. Los metales restantes del sedimento estuvieron por debajo del mínimo correspondiente.

2.5.6 Concentración de hierro en la columna de agua

2.5.6.1 Concentración de hierro y coeficientes de partición

La concentración promedio de hierro disuelto fue de 17,1±0,3 mg L^{-1}. De acuerdo con Gammons *et al*. (2005) las diferencias en ambientes ácidos con concentraciones altas y fluctuantes son significativas cuando el desvío estándar supera el 5%, por lo tanto la concentración de Fe medida en las distintas estaciones de muestreo y profundidades no difirió entre sitios.

La concentración de Fe en el lago fue monitoreada por distintos grupos de investigación y los valores reportados oscilaron entre 17 y 26 mg L^{-1} para el lago y entre 23 y 350 mg L^{-1} para el RAS, entre 1997 y 2013 (Pedrozo *et al.*, 2001; Gammons *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2007; Pedrozo *et al.*, 2008; Varekamp, 2008; Varekamp *et al.*, 2009). En este estudio, el Fe disuelto coincidió con el límite inferior de los intervalos. Estas concentraciones son significativamente mayores que las halladas en los lagos oligotróficos andino-patagónicos, que se encuentran por debajo del promedio mundial para lagos de agua dulce (Diaz *et al.*, 2007). El contenido de Fe en Caviahue se encuentra muy por encima de estos límites y de los establecidos por reglamentación de la Ley General del Ambiente 25.675 (0,3 mg L^{-1} para consumo humano y 5 mg L^{-1} para consumo de ganado).

Por otra parte, la transecta trazada desde el RAS hasta el lago demostró que la concentración de

hierro disminuye significativamente y que el proceso de dilución fue rápido. La diferencia entre el contenido de Fe en el RAS y la línea costera es del 50%, mientras que entre el río y el lago asciende al 57% (Tabla 9). Estos resultados contrastan con lo descripto por Varekamp (2008), quien en 1997 midió una pluma pobremente mezclada penetrando en BN, lo que posiblemente se deba a las concentraciones de hierro significativamente mayores de esos años.

Tabla 9 Concentraciones de hierro en el Lago Caviahue en enero de 2013. A la izquierda de la tabla se detalla la transecta entre el RAS y el lago, mientras que a la derecha, la concentración de Fe en las tres estaciones de muestreo en superficie y fondo.

Muestra	Fe [mg L^{-1}]	Muestra	Fe [mg L^{-1}]
RAS	39,5	BN 0	17,4
Línea costera	19,7	BN 90	17,4
5 m	16,8	C 0	16,8
10 m	17,1	C 20	17,3
50 m	16,9	BS 0	16,8
100 m	17,1	BS 65	17,1
200 m	17,2		
250 m	17,1		

Por otra parte, los coeficientes de partición *Π* entre hierro sedimentario y disuelto en la columna de agua fueron: 385, 220 y 321 para BN, C y BS, respectivamente. Los valores de los brazos fueron más similares entre si y difirieron de los del Centro. Dada la similitud en la concentración de Fe en la columna de agua, *Π* refleja la variación del contenido total de hierro en el sedimento. Friese *et al.* (1998) determinaron valores similares para el lago ácido de mina ML-111 (Alemania) mientras que otros sedimentos circumneutros poseen una capacidad mucho mayor de retención de este metal (Tessier *et al*., 1979; Li *et al.*, 1994; Luther *et al.*, 2003; Konradi *et al*., 2005; Torres y Auleda, 2013; entre otros) posiblemente debido a que todas las fases están favorecidas.

2.5.7 Modelado de la concentración de hierro

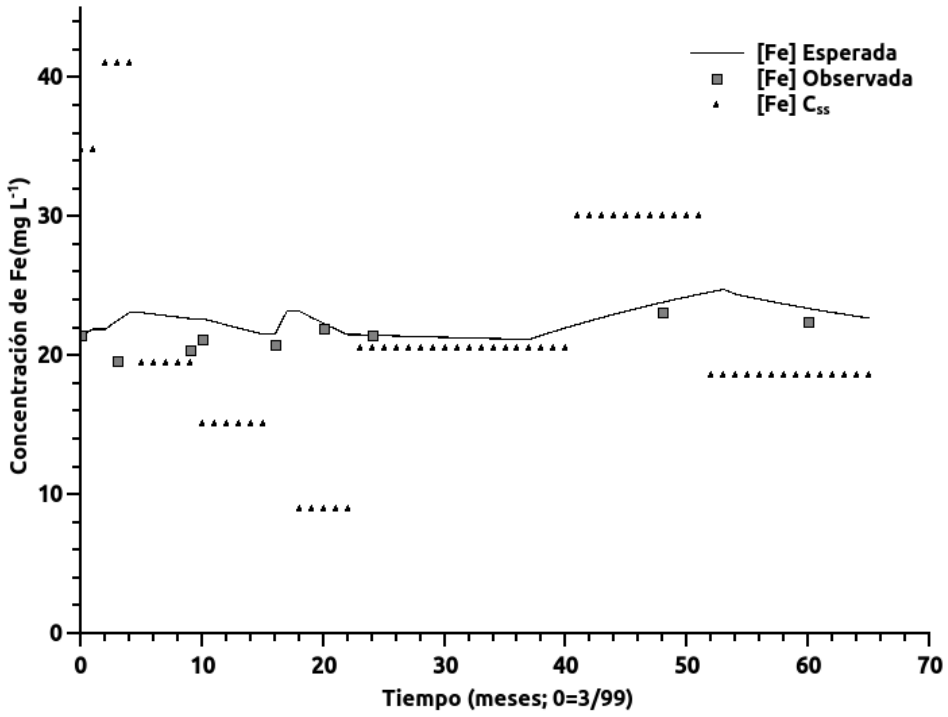


Figura 14 Concentración de hierro [Fe] esperada vs observada y concentraciones de estado estacionario [Fe] C_{ss} para el período modelado (1999-2004).

El modelo diseñado por Varekamp (2008) predice la concentración de Fe con gran precisión luego del decimosexto mes estudiado, cuando los valores de carga de hierro están por debajo del promedio (388 *t* mes^{-1}). En contraste, las mayores diferencias se registraron entre los meses 0 y 10, y en el decimosexto debido a la influencia de valores de carga más altos. Entre los meses 0 y 4, la concentración de estado estacionario (C_{ss}) fue de 35 a 44 mg L^{-1}, lo que provocó un aumento en el modelo mientras que el lago se mantuvo prácticamente invariante. Luego, como consecuencia de menores valores de carga, la concentración modelada disminuyó hasta el mes 16; momento en que el Volcán Copahue entró en erupción y se determinó la concentración más alta del registro (hasta hoy). Debido a ello, solo se proyectó por 2 meses, generando un pico en el modelo. Luego, a partir del decimoctavo mes la C_{ss} media fue de 21 mg L^{-1} y el promedio de las mediciones de ese período de 21.4 mg L^{-1} indicando un alto grado de correlación (r=0.92; p=0.016) entre los valores observados y modelados. Sin embargo, solo a partir del mes veinte la igualdad entre ambos valores resultó significativa (Kolmogorov–Smirnov, D=0.77; p>0.05). En contraste, la correlación entre los valores modelados y observados entre los meses 0 y 10 resultó no significativa.

Existen dos hipótesis que pueden explicar la diferencia observada en los diez primeros meses. La primera, es la precipitación del exceso de hierro en el delta del RAS (Centro) sin que afecte drásticamente el equilibrio del metal entre las fases disuelta y precipitada en la columna de agua, lo que sería consistente con la existencia del sistema buffer de Fe propuesto por Ulrich (1981) para cuerpos de agua con pH entre 2,0 y 4,0. La segunda, es que las diferencias entre los valores modelados y observados se deba a que la carga del metal determinada para esos meses (la más alta del registro, exceptuando el período eruptivo) no se haya proyectado en el tiempo de la forma en que se interpoló (Varekamp, comunicación personal). El primer escenario es consistente con un comportamiento no conservativo del metal, que implicaría un tiempo de residencia menor que el del agua mientras que el segundo sugiere lo contrario.

Dos fenómenos apoyan la primera hipótesis, 1) el hierro se encontraba sobre-saturado en BN y en BS para cinco y siete sales en los períodos pre y post-eruptivos respectivamente (Gammons *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, manuscrito en revisión) y los índices de saturación debieron ser mayores en el Centro debido a la fuerte influencia de la pluma, que en esos años se proyectaba con mayor intensidad en C y BN; 2) los sedimentos de C contuvieron significativamente más hierro (65%) en el segundo estrato respecto del resto del perfil vertical, lo cual puede ser asociado a los altos valores de carga pre-eruptivos.

2.6 Conclusiones

Hipótesis 1: El contenidode metales del sedimento ácido de Caviahue es bajo en comparación con ambientes acuáticos neutros o alcalinos.

Se acepta la primera hipótesis dado que el contenido de metales del sedimento ácido de Caviahue resultó hallarse en el mismo orden que otros sedimentos nada o levemente contaminados y además, la movilidad y disponibilidad de los metales estudiados es baja de acuerdo con lo determinado a través de la extracción.

Hipótesis 2: La carga de metales asociada a materia orgánica es alta debido a las condiciones desfavorables para la formación de otras fases como carbonatos, óxidos o pirita.

Se acepta la segunda hipótesis debido a que tanto el hierro como la mayoría de los metales traza se hallaron en íntima relación con la fracción más rica en ácidos húmicos, aunque también se detectó la acumulación de pirita.

Hipótesis 3:Existe un sistema buffer de hierro que controla su concentración en función del pH.

Se acepta la tercer hipótesis basada en la predicción de Ulrich (1980) de la existencia de un sistema buffer de hierro en el lago ácido Caviahue.

Capítulo 2

Caracterización de los ácidos húmicos extraídos de los sedimentos del lago. Determinación de sus constantes aparentes de complejación con nueve metales

3 Capítulo 2: Caracterización de los ácidos húmicos extraídos de los sedimentos del lago. Determinación de sus constantes aparentes de complejación con nueve metales.

3.1 Introducción

La materia orgánica natural (MON) se encuentra presente en todos los ambientes terrestres y acuáticos, y constituye una porción menor pero importante de los sedimentos acuáticos. La MON está distribuida principalmente en dos grandes reservorios: organismos vivos y detritos. En la mayoría de los ambientes acuáticos, estos últimos representan el pool de carbono mayoritario y desempeñan un rol muy importante en el funcionamiento del ecosistema (Wetzel,1983 en Steinberg y Muenster 1985). Los detritos puede clasificarse en dos grandes grupos de sustancias, húmicas (SH) y no húmicas. Estas últimas están representadas por lípidos, carbohidratos, proteínas, detritos en general y otros químicos producto de la actividad microbiana, de organismos bentónicos y de la descomposición de los detritos. Las sustancias húmicas son polielectrolitos de colores entre amarillo y negro, refractarios y ubicuos. Son el producto de procesos bioquímicos y estocásticos de síntesis a partir de precursores no húmicos, y constituyen la fracción orgánica más importante en los sedimentos lacustres (Aiken *et al.*, 1985; Meyers e Ishiwatari, 1993), en el suelo y en la materia orgánica disuelta (MOD) de la columna de agua (Thurman, 1985; Orlov, 1990).

La MO sedimentaria es un componente geoquímico dinámico que participa en numerosos procesos bioquímicos: nutrición del bentos en general, compleja e inmoviliza contaminantes (como metales traza y fertilizantes, herbicidas y otros compuestos orgánicos), determina la concentración de O_2 disuelto debido a la oxidación de la porción lábil y cataliza la reducción de especies inorgánicas (como Fe(III), Cu(II), etc.) a través de su contacto con especies reducidas de sustancias húmicas, entre otras (Meyers e Ishiwatari, 1993).

El estudio de las SH comenzó a partir del método de extracción desarrollado por Achard en 1786 (Aiken *et al.*, 1985), en el cual aun se basan los protocolos actuales aunque con algunas

modificaciones. Inicialmente, las investigaciones de SH se focalizaron en el material extraído de turberas, los ecosistemas más eficientes en la fijación del carbono (Aiken *et al.*, 1985). Desde principios del siglo pasado, el espectro de ambientes estudiados se ha ampliado y también el interés por funciones distintas de la formación de kerogeno, la promoción del crecimiento vegetal o su influencia en la química de metales traza en ambientes acuáticos (Tipping, 2002; Steinberg, 2003). Las investigaciones actuales incluyen temas como su actividad antiviral o los efectos sobre la salud producidos por la cloración de agua potable con bajo contenido de SH, entre otros (Aiken *et al.*, 1985).

La MO y en particular las SH en cuerpos de agua, pueden ser autóctonas y originarse a partir del plancton (fito, zoo y bacterioplancton) y de las macrófitas, que luego de morir pasan a formar parte del conjunto de los detritos, o alóctonas y provenir de hojas y restos de plantas terrestres en general, de humedales, de la escorrentía, etc. El origen puede ser determinado a través de indicadores espectroscópicos y del análisis elemental dado que los materiales difieren en, por ejemplo el grado de condensación debido a: la presencia/ausencia de lignina, el contenido de pigmentos covalentemente unidos, sus relaciones elementales N/C, O/C y H/C entre otros (Desai y Ganguly, 1970; Ishiwatari, 1973; Steelink, 1985). Como consecuencia, la composición de la MO en los ambientes acuáticos depende de factores como: el nivel trófico, la productividad, el clima, la escorrentía o drenaje dentro del la cuenca y cambios en las características químicas, biológicas y geológicas de los ambientes circundantes (Ishiwatari, 1985).

3.1.1 Formación de SH (humificación)

Para explicar el proceso de humificación (síntesis de sustancias húmicas) a partir de detritos se han propuesto tres teorías que abordan el proceso de acuerdo con los distintos grupos de precursores y mecanismos posibles. Estas son:

Teoría de la lignina:

Fue propuesta por Waksman e Iyer (1932), de acuerdo con esta teoría la lignina es utilizada de

forma incompleta por algunos hongos y bacterias, y los residuos generados pasan a formar parte de las SH. Entre las modificaciones introducidas a las moléculas se listan la transformación de grupos metoxi (OCH_3) en OH fenólicos, la oxidación de grupos terminales a carboxilos (COOH) y condensación con compuestos nitrogenados. Waksman e Iyer sugieren que primero se forman AH y luego AF por fragmentación. También apoya su teoría en que las SH, al igual que la lignina, son refractarios, que ambos son parcialmente solubles en alcohol y piridina, que precipitan en medio ácido y son solubles en medio alcalino, que presentan grupos metoxi y que son ácidos en medios naturales. Además, si se calientan las ligninas en medio alcalino fuerte, se oxidan para dar compuestos metoxilados y que los AH tienen propiedades similares a las de las ligninas oxidadas.

Teoría de los polifenoles:

La teoría incluye dos mecanismos distintos que parten de dos precursores distintos y convergen un una vía común. En el primero de ellos, los aldehídos y ácidos fenólicos que se generan durante la degradación enzimática de las ligninas por microorganismos producen quinonas que se polimerizan para formar los bloques principales de las SH. Este proceso también ocurre durante la formación de melanina. En el segundo, los compuestos polifenólicos son sintetizados por microorganismos a partir de sustratos como la celulosa, la hemicelulosa y pectinas. Los polifenoles son luego oxidados por vías enzimáticas a quinonas y posteriormente convertidas a SH.

Konanova (1966) propuso que la formación de polifenoles ocurre principalmente a partir de la degradación de la celulosa por mixobacterias y postula dos etapas para este proceso: 1) degradación completa de carbohidratos simples por acción fúngica y parcial de proteínas y celulosa de la médula y corteza de plantas. Y 2) luego, los polifenoles sintetizados por las mixobacterias son oxidados a quinonas por la enzima polifenoloxidasa y por último las quinonas reaccionan con compuestos nitrogenados para formar las SH.

Teoría de la condensación de azúcares y aminas:

De acuerdo con esta teoría, los azúcares y aminoácidos generados por el metabolismo

microbiano, son condensados por una vía no enzimática para generar glicosilaminas N-sustituidas, que posteriormente reaccionan para dar 1-amino-desoxi-2- cetosa N-sustituidas, aldehidos y cetonas de 3 carbonos (acetol, diacetilo, etc.), hidroximetil furfurales y enedioles o reductonas. Todos estos compuestos son muy reactivos y polimerizan rápidamente en presencia de aminas para generar productos pardos. Estos productos son similares a los que se generan durante la cocción de algunos alimentos a temperaturas moderadas, a este proceso de condensación se lo conoce como reacciones de Maillard (físico-químico francés que explicó el cambio de color y la generación de aromas durante el proceso de cocción). La principal objeción a esta teoría es que a la temperatura media ambiental del planeta la condensación es muy lenta, aunque ciertos minerales pueden actuar como catalizadores.

3.1.2 Estructura, forma y función de las SH

Por otra parte, las SH en solución acuosa forman agregados de moléculas con distintas estructuras y pesos moleculares a través de interacciones electrostáticas (entre átomos cargados dentro de la estructura o formando quelatos con metales), hidrofóbicas, de Van der Vaals y puente de hidrógeno. Estos complejos reciben el nombre de supra-moleculares (Piccolo, 2001). Por otra parte, Stevenson (1985) postuló que estos complejos eran macro-moleculares, es decir, formados por uno o pocos polímeros de alto peso molecular, aunque actualmente se cree que la primera hipótesis es más acertada.

Las moléculas componentes de estos agregados tienen composiciones elementales no-estequiométricas y estructuras irregulares y heterogéneas (Piccolo, 2001). A pesar de ello, se observan rasgos conservados entre las SH obtenidas de sitios con características similares y fracciones extraídas con el mismo solvente (Perminova *et al.*, 2003), como por ejemplo extractos con moléculas enriquecidas en grupos ácidos o con el mismo grado de condensación. Como resultado de ello, se ha cambiado el foco del modelado de moléculas al modelado de arreglos supra-moleculares en los que se tienen en cuenta propiedades medibles, no como valores singulares sino

como distribuciones. Consecuentemente, una fórmula empírica que describa a todas las SH, incluso extraídas con el mismo solvente y del mismo sitio, no es posible (Steelink, 1985).

Las SH pueden clasificarse de la siguiente manera:

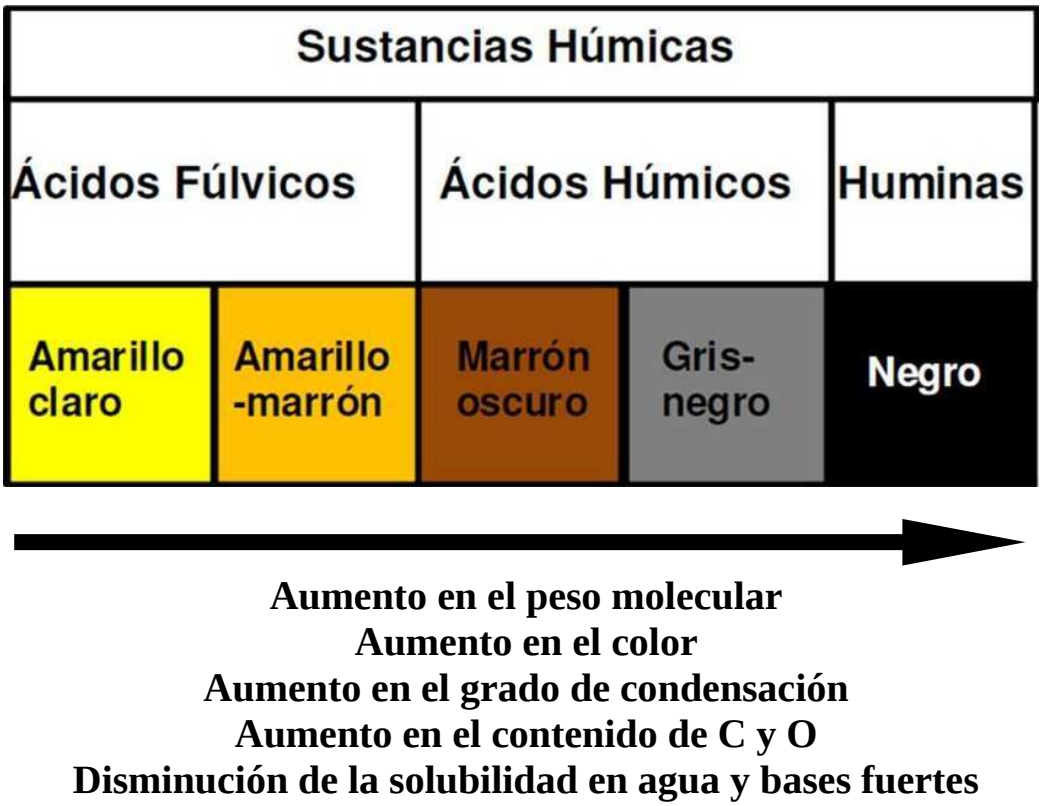


Figura 15 **Clasificación de los distintos tipos de sustancias húmicas (tomado de Stevenson 1982).**

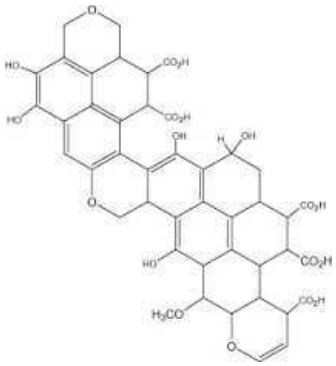
Los ácidos fúlvicos (AF) corresponden a la fracción más liviana (desde <1kDa a 3 kDa), son solubles en todo el rango de pH y poseen un color amarillo (claro u oscuro). Los ácidos húmicos (AH) son más pesados (de 3kDa a >100 kDa), son solubles a partir de pH~2,0 y su color es marrón o gris oscuro. Finalmente, las huminas son insolubles en todo el rango de pH debido a que su alto grado de condensación le confiere un carácter fuertemente hidrofóbico, son negras y su peso molecular es similar al de los AH.

La diferencia en los pesos moleculares (PM) y tamaños moleculares TM confieren a las SH funciones distintas en el ambiente. Las más livianas (<3500 kDa) poseen un efecto tipo-auxina activando todas las vías metabólicas de esta hormona, promoviendo la incorporación de agua y la

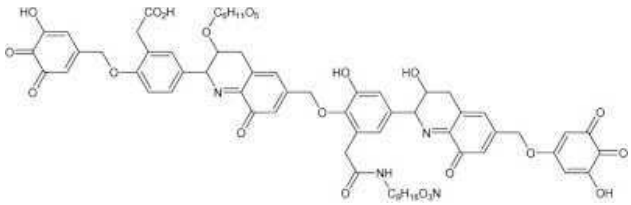
elongación de la raíz en, por ejemplo, *Daucus carota* (Muscolo *et al.*, 1999; Nardi, *et al.*, 2002; Muscolo *et al.*, 2013). Por otra parte, las SH de bajo PM también forman complejos con nutrientes y micronutrientes metálicos (y a través de ellos, complejos ternarios con fósforo o arsénico) manteniéndolos en la solución y disminuyendo la reactividad de los más tóxicos, mientras que las de PM más alto son una de las fracciones químicas sedimentarias que actúan como sumidero, entre otros, de metales traza y fósforo (Ohle, 1935 en Steinberg y Muenster, 1985; Thanabalasingam y Pickering, 1986; Paludan y Jensen, 1995; en esta tesis, capítulo 1). Además, la estructura supra-molecular de las moléculas más grandes contiene dominios pseudomicelares con centros hidrofóbicos que les confieren la capacidad de inmovilizar y disminuir la reactividad de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) (Wershaw, 1986; Engebretson y von Wandruszka, 1994), tanto en la columna de agua como en el sedimento (Meyer y Tate, 1983; Thurman, 1985). El trabajo de Ohle fue fundamental en el desarrollo de la limnología química, o limnoquímica, disciplina que estudia la relación entre los seres vivos y los procesos químicos y bioquímicos que ocurren en los sistemas acuáticos (Schindler *et al.*, 1975 en Steinberg y Muenster, 1985)

3.1.2.1 Estructura molecular

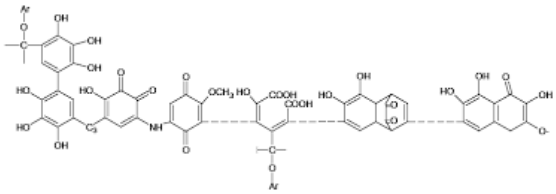
Las SH han sido objeto de estudios estructurales por los últimos 80 años. Para ello se han combinado técnicas espectroscópicas como la espectrofotometría UV-Visible, del infrarrojo (FT-IR), espectrofluorimetría, espectroscopía Raman, resonancia paramagnética electrónica (EPR), resonancia magnética nuclear (RMN) en solución y en estado sólido, y espectrometría de masas acoplada a distintas técnicas separativas (HPLC, ICR, CG, ultrafiltración, permeación en geles, etc.), con estudios de modelado de grupos funcionales ácidos, de complejación de metales y de potencial zeta. A partir de uno o más resultados, se han propuesto numerosas estructuras que van desde moléculas sencillas a agregados con formas diversas.



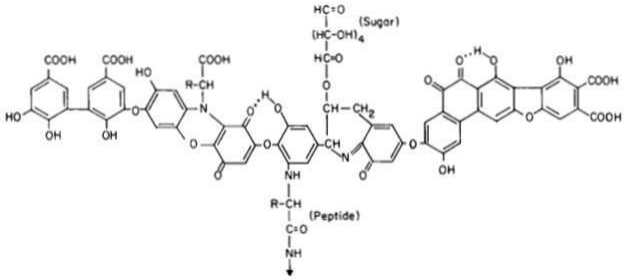
AH según Fuchs (1931)



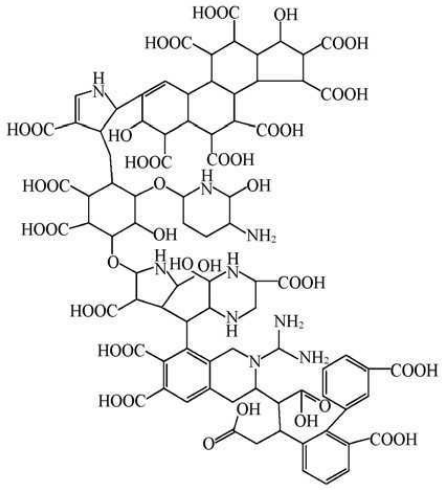
AH, Estructura Dragunov (Kononova, 1966)



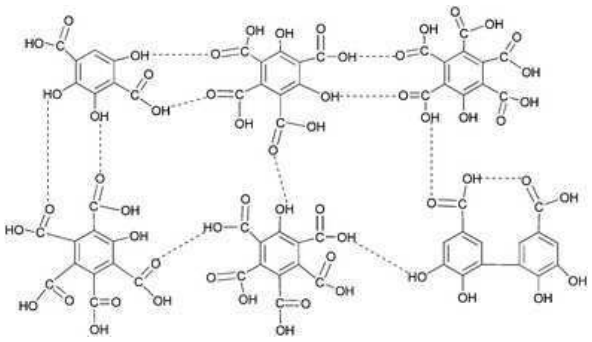
AH según Flaig (1960)



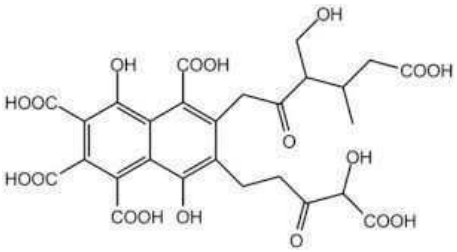
AH según Stevenson (1982)



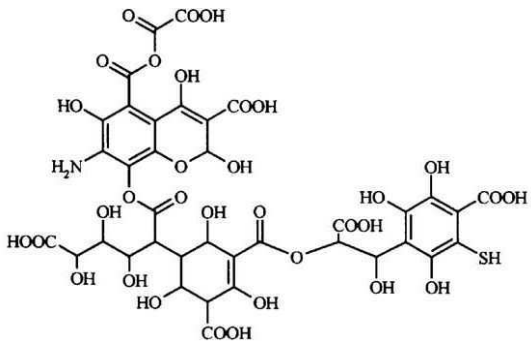
AH según Zhao *et al.* (2013)



AF según Schnitzer y Khan (1972)



AF según Buffle (1977)



AF según Alvarez-Puebla *et al.* (2006)

Figura 16 **Estructuras modelo de AH y AF.**

En la Figura 16 se muestra la evolución de las estructuras propuestas a lo largo de los últimos 80 años. El modelo de Fuchs representa únicamente los esqueletos carbonados sin tener en cuenta al

nitrógeno (Zhao *et al.*, 2013). Esta formulación refleja la de un AH extraído de carbón, fuente de los AH estudiados por Fuchs. La estructura Dragunov incorporó la mezcla de anillos aromáticos (di- y trihidroxibencenos), con N en formas cíclicas, cadenas laterales con N, residuos de azúcar y quinonas. El modelo propuesto por Stevenson (1982) incorpora residuos peptídicos y sacarídicos, que posteriormente se descartaron (Zhao *et al.*, 2013) debido a que estos no formarían parte de la estructura *per se* sino que interactuarían con las moléculas de AH dentro del agregado supra-molecular.

El conocimiento sobre las estructuras de los AF siguió una evolución similar, y puede verse en las estructuras propuestas por Schnitzer y Khan (1972), Buffle (1977) y Alvarez-Puebla *et al.* (2006). En resumen, aumenta de tamaño del *core* de las moléculas, se incorporan más ácidos carboxílicos y posteriormente, grupos sulfhidrilos, ésteres y aminas.

3.1.2.2 Estructura secundaria

Las moléculas individuales de SH (Figura 19) interactúan electrostáticamente para formar los agregados supra-moleculares a los que se ha hecho referencia previamente. Debido a la fuerte dependencia con la densidad de carga eléctrica, esta estructura dependerá de las condiciones fisicoquímicas del agua en que se encuentren disueltas (Ghosh y Schnitzer, 1980; Aho y Lehto, 1984; Tsutsuki y Kuwatsuka, 1984; Engebretson y von Wandruszka, 1994; Ephraim *et al*., 1995). Cuando el pH es alto y la fuerza iónica y el contenido de MO bajos, las moléculas se encuentran extendidas y flexibles debido a efectos de repulsión intramolecular debida a la desprotonación de los grupos ácidos (mayormente carboxilos y fenoles). En contraste, si el pH es bajo y la fuerza iónica y el contenido de MO moderados, las SH forman esferas globulares compactas debido a la disminución de carga y los agregados aumentan de tamaño (Miano *et al.*, 1988; Senesi *et al.*, 1991; Piccolo, 2001; Warwick *et al*., 2001).

Se considera coloide a todo material, disuelto o particulado, con un tamaño que oscila entre 1 nm y 1 μm. De acuerdo con esta definición, algunos AF (dependiendo del pH y estado de agregación) y

todos los AH disueltos están bajo la forma coloidal (Stumm y Morgan, 1996; Tipping, 2002), aunque sus dimensiones serán función también del pH y la fuerza iónica ya que una mayor densidad de carga implicará, a raíz de la repulsión electrostática, agregados más pequeños con mayor exposición de todos sus dominios (hidrofílicos e hidrofóbicos) mientras que su neutralización incrementará la hidrofobicidad de las moléculas y su estado de agregación (Kukkonen, 1991; Engebretson *et al.*, 1996; Schlautman y Morgan, 1993).

3.1.2.3 Contenido de grupos funcionales ácidos

El conocimiento del contenido de sitios ácidos en las SH es importante para la comprensión de fenómenos como la distribución de carga eléctrica, la complejación de metales, la interacción con superficies minerales de hierro y silicio en los sedimentos o con moléculas pequeñas y cargadas como herbicidas y/o pesticidas en función del pH (Perdue y Lytle, 1983; McCarthy y Zachara, 1989). Las titulaciones se concentran mayormente en el estudio de -COOH y -OH dado que son los grupos más abundantes. Para realizar esta determinación se han empleado métodos indirectos como: a) la adsorción de cobaltihexamina ($Co(NH_3)_6^{+3}$) que forma precipitados insolubles al neutralizar la carga de las SH (Maes *et al.*, 1992), b) la precipitación con hidróxido de bario ($Ba(OH)_2$) o con acetato de calcio (CaOAc, a pH 6,0-7,0) (Schnitzer y Khan, 1972), c) la determinación de grupos $-OCH_3$ luego de la metilación de las SH, o d) métodos directos como la potenciometría utilizando un electrodo que mida la concentración de H^+ en la solución y que permita seguir su disociación paso a paso.

Diversos modelos como NICA-Donnan, WHAM o EPN (red elástica de polielectrolitos) han sido empleados en el estudio de la distribución de afinidades de los distintos sitios ligando debido a interacciones intrínsecas y electrostáticas dentro de los agregados supra-moleculares de SH (Kinniburgh *et* al., 1996; Tipping, 1998; Avena *et al.*, 1999; Kinniburgh *et al.*, 1999).

3.1.2.4 Coordinación con metales

Los cationes en solución acuosa interactúan con moléculas con pares electrónicos libres, a los que se conoce como ligandos. Este proceso tiende a completar los electrones en la esfera de coordinación del metal (la capa externa), logrando así una mayor estabilidad. El ligando más sencillo es el agua, y luego moléculas que posean átomos como O, S, N o F entre otros. Al número de ligandos posible se lo conoce con el nombre de número de coordinación, y los valores más comunes son dos, cuatro o seis. El fenómeno de coordinación puede darse en dos esferas alrededor del catión, una interna y más cercana al núcleo y otra externa que en general involucra moléculas de agua con un grado de orden mayor al del resto del solvente debido a la interacción con la esfera interna (Tipping, 2002).

Los complejos de esfera externa ocurren cuando el ligando ocupa la posición externa y no forma una unión directa con el metal. Este fenómeno se debe a interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno, y son generalmente débiles. En los complejos de esfera interna, en cambio, hay una unión química covalente entre el ion metálico y el ligando en la que este último aloja el par libre de electrones en un orbital vacío del metal de transición (Tipping, 2002).

Las constantes de equilibrio o de estabilidad son determinadas por la ecuación: $k = \frac{[ML]}{[M][L]}$

que establece la relación entre la concentración disuelta de metal (*M*) y ligando (*L*) respecto de la abundancia del complejo metal:ligando (*ML*). Esta ecuación describe una relación 1:1 entre ambos, aunque para otras relaciones estequiométricas, deben usarse ecuaciones más complejas. Mientras más grande es la constante, mayor es la afinidad y la fuerza de unión entre ambos (Stumm y Morgan, 1996).

Los metales son ácidos de Lewis, esto quiere decir que tienen tendencia a alojar pares electrónicos en sus orbitales libres. El carácter fuerte o débil de acidez, de acuerdo con esta definición determinará la selectividad por los distintos ligandos donores de electrones. Los ligandos más abundantes en las SH son los carboxilatos ($-COO^-$), y son los que menos discriminan entre el

carácter de ácido fuerte o débil del metal a coordinar. El grupo que sigue en abundancia es el fenolato ($-O^-$) y este tiene una mayor tendencia a complejar ácidos débiles pero sin embargo es considerado generalista. Los menos abundantes, N y S, son los más selectivos, interactuando casi exclusivamente con ácidos débiles como Pb(II), Hg(II), Cu(II) o Cd(II). Ello implica que el Mg(II) o el Ca(II), generalmente abundantes en ambientes naturales, pueden competir más eficientemente con el Hg(II) por un carboxilato pero nunca por un sulfhidrilo (Tipping, 2002).

Los complejos entre un metal y más de un ligando se denominan quelatos. Estos pueden ser bi, tri o multidentados, incrementándose la estabilidad de los complejos al aumentar el número de sitios de coordinación del ligando. Debido al carácter de mezcla compleja de las SH, la variabilidad en la afinidad de los distintos sitios ligando y la posibilidad de formar complejos entre un catión y ligandos pertenecientes a distintas moléculas (formando puentes), poco se conoce acerca de la geometría de sus quelatos. Numerosos autores han descripto la formación de complejos mono, bi, tri y multidentados entre las SH y distintos metales (Malcom, 1985; Mayer, 1985;Tipping, 1993; Tipping 1994; Tipping, 2002; Tipping *et al.*, 2002; Kloster *et al.*, 2013; Kostić *et al.*, 2013; Orsetti *et al*., 2013; entre otros). En consecuencia, los valores obtenidos para las constantes deben ser considerados un promedio de la contribución de todas las especies presentes. Los modelos utilizados para el cálculo y análisis de las constantes y distribución de afinidades son los mismos que ya fueron mencionados para el estudio de las propiedades ácido-base en la sección 3.1.2.3.

Para describir esta interacción es necesario determinar el valor del par de concentraciones de metal ligado/libre. Para ello se han desarrollado diversos métodos que permiten estimar ambas o solo una de ellas (y la otra por diferencia). Entre ellos se cuentan técnicas directas como la determinación de la concentración de metal libre en la solución de la titulación a través del uso de electrodos selectivos, o indirectas como: 1) la centrifugación, útil a bajo pH o altas concentraciones de metal ya que se induce la precipitación; 2) el uso de membranas de diálisis donde la SH se encuentra solo a uno de los lados de la membrana; 3) la ultrafiltración, que responde al mismo principio que la diálisis aunque con la aplicación de una presión positiva; 4) la cromatografía de

intercambio iónico en donde se equilibra una resina de intercambio catiónico con el metal de interés y luego se eluye con una solución de SH. Para alcanzar el equilibrio químico se requiere una longitud mínima de columna. Finalmente, se grafica el perfil de concentración de metal en la solución eluída; 5) el método de Schubert en el que se estudia la distribución del intercambio iónico entre el metal y una resina, en presencia y ausencia de SH, infiriendo de la diferencia, la afinidad del metal por estas últimas; 6) los métodos espectroscópicos, que pueden ser utilizados cuando el ligando es además, un cromóforo. Para ello, la determinación de la concentración del complejo metal:ligando se realiza a través del estudio de variaciones en la absorbancia, la fluorescencia, la señal de EPR o de RMN (Hummel y Dreyer, 1962; Mantoura y Riley, 1975; Gamble *et al.*, 1977; Saar y Weber, 1980; Truitt y Weber , 1981; Rainville y Weber, 1982; Ryan y Weber, 1982; Perdue y Lytle, 1983; Driscoll, 1984; Moulin *et al.*, 1987; Esteves da Silva *et al.*, 1995).

Todas ellas poseen ventajas y desventajas dependiendo de la identidad del metal que deben tomarse en consideración a la hora de la interpretación de los resultados obtenidos. En el presente trabajo se utilizará exclusivamente la espectroscopia fluorescencia y se desarrollará el fundamento de la técnica en las secciones 3.2.5.2 y 3.3.5.

3.1.3 Caracterización espectroscópica

Los métodos espectroscópicos están severamente limitados cuando se aplican al estudio de las SH. Debido a la heterogeneidad y complejidad de esta familia de compuestos orgánicos, los espectros corresponden a la suma de la contribución de las diferentes especies químicas presentes en distintos entornos. Además, en algunos casos solo una fracción de las moléculas contribuye con la respuesta al estímulo complicando aun más las interpretaciones (MacCarthy y Rice, 1985).

3.1.3.1 Espectroscopía UV-Visible

La espectroscopía UV-Visible es la absorción de luz visible y sus regiones aledañas (λ~200 a 800 nm de excitación, UV cercano e infrarrojo cercano). La absorbancia en esta región del espectro es

se debe a un grupo funcional específico dentro de una molécula. Este fenómeno se produce debido a que parte de la radiación induce transiciones electrónicas en entidades que posean electrones σ, π o n. Estos cromóforos, son grupos que contienen átomos con pares de electrones libres, como azufre, nitrógeno u oxígeno, o múltiples uniones C-C conjugadas (MacCarthy y Rice, 1985). Esta técnica es complementaria de la espectroscopía de fluorescencia dado que mientras esta última mide la emisión de luz generada en la transición entre el estado excitado y el fundamental, la espectroscopía de absorción UV-Visible estudia las transiciones inversas.

Esta técnica es muy útil cuando se estudia moléculas sencillas ya que una mezcla de unas pocas especies dificulta la interpretación. Considerando la naturaleza compleja de las SH, no es posible obtener información de un grupo funcional específico ni hacer inferencias sobre su composición química (Hayes y Swift, 1978). Además, los espectros de las SH no poseen picos o bandas específicos aunque su forma es similar y su absortividad aumentan hacia longitudes de onda más bajas (Hayes y Swift, 1978; Ghosh y Schnitzer, 1979; Stevenson, 1982).

A pesar de ello, la espectroscopía UV-Visible ha resultado muy útil en la determinación y comparación de ciertas características de las SH como: el grado de humificación a través de la relación E_4/E_6 (Chen *et al*., 1977), el grado de conjugación, mediante el índice SUVA (Weishaar *et al.*, 2003), el tamaño molecular (TM) y el carácter autóctono o alóctono, utilizando la relación de las pendientes espectrales entre 275-295 nm y 350-400 nm (Helms *et al.*, 2008) o simplemente la pendiente entre 275-295 como indicador del TM por un lado (Helms *et al.*, 2008; Fichot y Benner, 2012) y el coeficiente de absorbancia a 350 nm y la relación A_2/A_4 que proveen información acerca del origen de las SH por otro (Fooken y Liebezeit, 2000).

3.1.3.2 Espectroscopía de fluorescencia

La absorción de radiación UV-Visible induce transiciones electrónicas en los cromóforos del estado fundamental a estados excitados, como se mencionó en la sección 3.1.3.1. La transición inversa se produce disipando parte de la energía excedente en forma de calor, y la fracción

remanente, se disipa en forma de radiación electromagnética de mayor longitud de onda que la que provocó el estado excitado. Este fenómeno se conoce con el nombre de fluorescencia.

Pocas moléculas alifáticas y alicíclicas fluorescen, y en general esta emisión de luz se atribuye a dobles enlaces conjugados y anillos aromáticos. Los grupos donores de electrones como -OH o $-NH_2$ aumentan la fluorescencia mientras que grupos atractores como -COOH la disminuyen (Wehry y Rogers, 1966). Debido a que pocos de los grupos presentes en las moléculas fluorescen, es difícil realizar inferencias acerca de la estructura de las SH utilizando únicamente esta técnica. Por este motivo, en el contexto de las SH, los estudios de fluorescencia se realizan de tres formas distintas: 1) pares de excitación y emisión puntuales, 2) espectros sincrónicos (transecta con desfasaje entre la λ de excitación y el registro de la emisión, muy utilizado en el estudio del crudo y de las SH) y 3) matrices de excitación y emisión de fluorescencia (EEFM, excitation-emision fluorescence matrix), que aportan un panorama completo sobre la fluorescencia de un compuesto determinado aunque requieren de más tiempo que los otros métodos (Coble *et al.*, 1990). Las EEFM de la MO presentan máximos de intensidad en la emisión que son característicos y se utilizan para hacer inferencias acerca del origen terrestre o acuático, el grado de oxidación, la reactividad biológica, la fotoquímica de la MO, el contenido proteico y la proporción de AF y AH en cualquier muestra que contenga MO disuelta (Coble, 1996; Miller *et al.* 2006; Fellman *et al.* 2010).

La fluorescencia de la MO puede ser atenuada por la interacción con otras moléculas orgánicas o iones metálicos (*quenchers*) que interactúan íntimamente con los fluoróforos, absorbiendo la energía utilizada en la emisión de luz disipándola en forma de calor. El *quenching* puede ser estático o dinámico. El primero implica la formación de un complejo estable, que no emite y que tiene un espectro propio; el segundo se debe a colisiones entre el *quencher* y el estado excitado del fluoróforo. La diferenciación entre ambos fenómenos se realiza a través del estudio del decaimiento de la fluorescencia resuelto en el tiempo.

Ryan y Weber (1982) fueron los primeros en desarrollar una ecuación que les permitió utilizar pares de excitación-emisión para cuantificar el grado de interacción entre metales y SH, y calcular

constantes aparentes de complejación. Luego, Luster *et al.* (1996) realizaron una aproximación más compleja utilizando múltiples transectas de excitación y emisión, lo que permitió mejorar la resolución del estudio y calcular constantes más robustas, dado que observaciones previas revelaron que la interacción SH-Metal provocaba diferentes respuestas en distintas regiones del espectro (Luster *et al.*, 1994). Finalmente, a partir de la descomposición de las EEFM en factores contribuyentes (Stedmon *et al.*, 2003) es posible calcular las constantes (aun basadas en la ecuación de Ryan y Weber) para cada uno de los componentes fluorescentes que presentan variación en su intensidad de emisión cuando interactúan con metales.

3.1.3.3 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

La energía electromagnética del espectro infrarrojo puede ser absorbida por diversas moléculas, generalmente de carácter orgánico, y luego disipada en forma de vibraciones y rotaciones de los enlaces entre átomos. En líquidos y sólidos solo se ven las primeras, que pueden clasificarse a su vez en: estiramientos y doblamientos (Figura 17). La porción del espectro utilizada para la excitación de las moléculas va desde 2,5 a 25 μm (4000 a 400 cm^{-1}) (Alpert *et al.*, 1964 en MacCarthy y Rice, 1985).

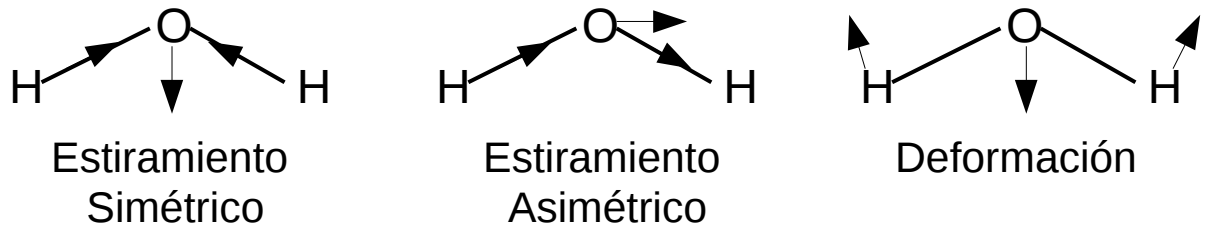


Figura 17 Estiramientos y doblamiento inducidos por la radiación IR (tomado de MacCarthy y Rice, 1985)

La espectroscopía del infrarrojo es una herramienta muy potente ya que brinda información acerca de la presencia de grupos funcionales específicos y otras entidades estructurales dentro de las moléculas. Esto ocurre porque las bandas de absorción que corresponden a la vibración de un tipo de unión ocurren a una frecuencia dada y no hay grandes solapamientos entre los distintos tipos de uniones. Sumado a eso, si la absorción es entre 4000 y 1250 cm^{-1} se ve poco afectada por el resto de

la molécula, los picos que se observan en esta región son característicos para cada grupo funcional (Alpert *et al.*, 1964 en MacCarthy y Rice, 1985). Lo contrario ocurre por debajo de los 1250 cm^{-1}, la región de huellas digitales (*fingerprint region*), en donde la señal está fuertemente afectada por los grupos vecinos (Olsen, 1975).

El análisis de grupos funcionales como carboxilos, carbonilos, fenoles, alcoholes en general, metoxilos, amidas, etc. incrementa nuestro conocimiento sobre la estructura de las SH y puede ser utilizado para explicar su comportamiento en distintos procesos de humificación (Steinberg y Muenster, 1985). Debido a su sencillez, esta técnica sigue siendo importante obtener información de SH extraídas de nuevos ambientes ya que las relaciones entre grupos funcionales pueden cambiar y eso influye en su rol ambiental.

3.1.4 Composición elemental

La determinación de la composición o de la fórmula empírica, es el primer paso hacia la elucidación de la fórmula molecular de cualquier compuesto. Sin embargo, en el caso de una mezcla compleja de compuestos no-estequiométricos como el carbón o las SH, esto no es posible debido a que no existe una única fórmula sino una distribución. Por ello, este tipo de análisis permite obtener información general acerca de la eficiencia del procesamiento de las muestras y la pureza, (Huffman y Stuber, 1985; Ishiwatari, 1985; Steelink, 1985; Rice y MacCarthy, 1991).

El conocimiento de los porcentajes de cada elemento en una muestra de SH purificadas permite componer una fórmula empírica como: $C_{10}H_{12}O_5N$ para un AH o $C_{12}H_{12}O_9N$ para un AF. Sin embargo, las mismas son iguales a la de un oligómero de anhídrido maleico o a la de un leño, respectivamente. Este hecho deja en evidencia que su único fin debe ser el de comparar muestras afines (Anderson y Russell, 1976; Steelink, 1985).

Recientemente se ha aplicado la resonancia ion-ciclotrón acoplado a espectrometría de masa (ICR-FT-MS, Ion-Ciclotron Resonance Fourier Transformed Mass Spectrometry), que permite conocer la distribución de fórmulas empíricas en un extracto complejo de MO como pueden ser las

SH. El equipo, un resonador magnético, acelera y separa las moléculas orgánicas por su relación carga:masa, que finalmente impacta sobre un detector de masa. Su resolución es muy alta, y a través de gráficos del tipo *Van Krevelin* es posible comparar las relaciones O/C y H/C de cada conjunto de moléculas con la de potenciales precursores, como lignina, carbohidratos, proteínas, lípidos, etc.

En el análisis elemental promedio de las SH, los porcentajes crudos no permiten hacer inferencia directa, sin embargo las relaciones elementales como O/C, H/C y N/C son fundamentales para la descripción y comprensión de su geoquímica, su diagénesis y la distinción entre AF, AH y huminas (Stuermer *et al.*, 1978; Huffman y Stuber, 1985; Rice y MacCarthy, 1991; Meyers y Ishiwatari, 1993; Giovanela *et al.*, 2004). En la Tabla 10 se muestra un ejemplo de la diferencia que existe entre AH de distintos orígenes.

Tabla 10 Ejemplos de relaciones elementales de AH de distintos orígenes. Tomado de Ishiwatari, 1985.

Relación elemental	AH del sedimento lacustre	AH del sedimento marino	AH del suelo
H/C	1,30	1,42	0,98
N/C	0,093	0,058	0,055

3.1.5 Objetivos

- Comparar los rendimientos de extracción de los ácidos húmicos procedentes de sedimentos de tres estaciones de muestreo, Brazo Norte, Centro y Brazo Sur.
- Relacionar el rendimiento de extracción con el contenido de agua y materia orgánica.
- Comparar los AH en función de su composición y relaciones elementales.
- Discutir el origen de los AH y su tamaño molecular a través de indicadores espectroscópicos UV–Visible.
- Evaluar cualitativa y cuantitativamente los grupos funcionales presentes en los AH utilizando espectroscopía IR.
- Comparar las matrices de fluorescencia y los factores producto de su descomposición a distintos pH y concentraciones de metal.
- Comparar las constantes de complejación y la capacidad de atenuación de la fluorescencia a partir de la titulación fluorométrica de los AH con 9 metales traza: Fe(III), Fe(II), Cr(III), Al(III), Cu(II), Ni(II), Hg(II), Zn(II) y Pb(II) con las obtenidas para materiales extraídos de distintos ambientes y estudiar el grado de agregación inducido por los metales.

3.1.6 Hipótesis

- Los ácidos húmicos de los tres sitios de muestreo BN, C y BS son similares en sus características estructurales.
- Los AH son de carácter autóctono
- No existen diferencias significativas entre los AH del lago Cavihue con respecto a los de otros ambientes neutros o alcalinos.
- La capacidad de complejar metales traza de los ácidos húmicos es comparable con las halladas para ambientes circumneutros.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Recolección de muestras, procesamiento y mediciones *in situ*

Los sedimentos fueron colectados y procesados como se especificó en 2.4.1.

3.2.2 Extracción de ácidos húmicos de los sedimentos

Los ácidos húmicos (AH) se extrajeron siguiendo la metodología propuesta por Swift *et al.* (1996) y recomendada por la International Humic Substances Society (IHSS). Brevemente, el sedimento seco se colocó en HCl 0,1M (1:10), se agitó por 1 h a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 4000 rpm, el pellet se sometió a una segunda extracción con NaOH 0,1M (1:10) agitando 2 h bajo atmósfera de N_2. Luego se centrifugó el sedimento (a 4000 rpm), el extracto se acidificó a pH=1 con HCl 6M y se dejó precipitar los AH por una noche 4ºC. Al día siguiente se centrifugó a 4000 rpm por 30 minutos, se guardó el sobrenadante conteniendo ácidos fúlvicos y el pellet se resuspendió en una solución 0,1M KOH / 0,3 KCl con burbujeo de N_2. La suspensión se agitó por 1 h y se centrifugó a 12000 rpm para remover sólidos en suspensión. Al cabo de 30 minutos, se removió el sobrenadante, se acidificó con HCl 6M y se siguió el mismo procedimiento para precipitar. Luego, el pellet se resuspendió en 0,1M HCl / 0,3M HF y se agitó por 12 h para remover silicatos (repetido 3 veces). Por último se realizaron 3 lavados con HCl 0,1M por 6h para remover metales complejados en el interior de los agregados (Hering y Morel, 1988) y se dializó contra agua corriente por 48 h, contra HCl 0,1M por 72 h y contra agua destilada por 96 h, los dos últimos a 4°C.

La primera extracción con HCl cumple la función de extraer metales y sulfuros controlando así una posible sobre-estimación en el contenido de azufre en los extractos de AH.

A pesar de los extensivos lavados con HCl, una porción de hierro permanece como nexo de la estructura supra-molecular característica de los AH (Knicker, comunicación personal) .

Los extractos se liofilizaron y se calculó el rendimiento de extracción para cada sitio y estrato.

Debido al bajo rendimiento de los extractos, el contenido de ceniza (<1%) se estimó en las muestras BN 0-4 y BS 0-4 con las que se realizaron los estudios fluorométricos por el método de pérdida por ignición a 550ºC por 4 h.

3.2.3 Composición elemental

Se determinó la proporción de C:N:H:S mediante un analizador elemental Exeter CE 440 en todos los extractos y por duplicado. El contenido de oxígeno se determinó por diferencia. Las mediciones fueron realizadas por la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a la Química Orgnánica (UMYMFOR, CONICET-FCEyN, UBA).

Los porcentajes fueron convertidos en porcentajes atómicos (valor porcentual/masa atómica) y con ellas se calcularon los siguientes indicadores: H/C, O/C, C/N y C/S, que también fueron utilizados para calcular las fórmulas empíricas promedio de cada extracto.

3.2.4 Espectrofotometría FT–IR

Se obtuvieron espectros en el infrarrojo (FTIR) con transformada de Fourier para evaluar la presencia de grupos funcionales. Para ello se utilizó un equipo FTIR Perkin Elmer Spectrum 400 y las mediciones se realizaron entre los 400 y 4000 cm^{-1}del espectro electromagnético. Las muestras se molieron en mortero de ágata con KBr, se prensaron en forma de discos con la ayuda de un molde y una prensa hidráulica, y colocadas entre ventanas para realizar la medición. Las ventanas se lavaron con cloroformo entre muestras.

3.2.5 Espectrofluorometría

En todos los casos se obtuvieron matrices de excitación–emisión de fluorescencia (EEFM) utilizando un espectrofluorómetro JOBIN–YVON Spex Fluorolog FL3–11 con LIFETIME TCSPC excitando entre 250 y 550 nm y midiendo la emisión entre 300 y 600 nm, en ambos casos con incrementos de 5 nm. Los espectros se adquirieron a una tasa de 200 nm min^{-1} con ventanas espectrales de 2 nm. El Rayleigh de primer orden se sustrajo utilizando el software del equipo.

Adicionalmente, se midió la absorbancia de las muestras entre 200 y 800 nm para realizar correcciones por efecto de filtro interno.

3.2.5.1 Estudio de componentes fluorofóricos y su relación con el pH

Se prepararon soluciones de ácido húmico 80 mg L^{-1} a pH 3,0 y 5,0 de los estratos superficiales (0–2 cm) y profundos (12–16 cm) de los tres sitios muestreados. Se midieron matrices de excitación y emisión de fluorescencia (EEF) y se aplicó el método descripto en 3.2.5.2 para identificar la contribución de cada componente.

3.2.5.2 Estudio fluorométrico de formación de complejos AH-Metal (titulación fluorométrica)

Para los estudios de formación de complejos Metal-AH se utilizaron soluciones con 100 mg L^{-1} de AH del estrato superficial (0–2 cm) del BS debido al interés en el estudio del comportamiento del material húmico en contacto con la columna de agua. Además, se tituló una muestra de AH del mismo estrato del BN con Cu(II) y Fe(II) para evaluar potenciales diferencias entre los sitios del lago.

La disolución de los AH se facilitó en medio alcalino (concentración final de 10^{-3} M en NaOH, bajo atmósfera de N_2) neutralizado posteriormente con HCl en la misma proporción y fijando la fuerza iónica en el orden de 10^{-3} M en NaCl. Debido a que el pH resultante luego del agregado del ácido fue cercano a 3,0, el ajuste final a pH 3,0 se realizó con pequeños agregados de HCl o NaOH. Las soluciones madre de: Fe (III), Fe (II), Cr(III), Al(III), Cu(II), Ni(II), Hg(II), Zn(II) y Pb(II) se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas y su pH también fue fijado en 3,0 (de aquí en adelante, solo se hará referencia al estado de oxidación del hierro). Su concentración dependió del rango en el que se realizó el estudio, y que en todos los casos fue de 0 µM hasta el paso previo en que la agregación del AH condujo a la precipitación. La titulación se realizó mediante agregados de solución madre de metal utilizando micropipetas calibradas previo a su uso. Luego, se dejó

estabilizar la mezcla por 15 minutos, se tomaron alícuotas de 4 mL y se registraron las matrices EEF. El tiempo de estabilización se determinó como el mínimo necesario para obtener registros constantes en la fluorescencia. Las alícuotas se devolvieron a la solución previo al siguiente agregado de metal (Ohno *et al.*, 2008). Los efectos de la dilución por los agregados de la solución de metales se corrigieron para la realización de todos los cálculos.

Los rangos para el análisis de las matrices fueron más pequeños que los de adquisición: 300 a 500 nm en la excitación y 350 a 550 nm en la emisión, lo que permitió minimizar los efectos de dispersión eliminando las interferencias del Rayleigh de segundo orden, gran parte del Rayleigh de primer orden no eliminado por el software y el Raman.

Se obtuvieron entre 5 y 12 matrices de EEF para cada metal y se apilaron en un tensor de rango 3 con los siguientes ejes: λ–excitación, λ–emisión y concentración de metal. El tensor se analizó utilizando el algoritmo PARAFAC (en entorno Matlab) con el que se logró evaluar la contribución relativa de los distintos componentes a la fluorescencia de cada matriz (Stedmon *et al*., 2003) para cada agregado de metal. Utilizando los perfiles de emisión relativa para cada factor se calcularon las constantes aparentes de *binding* utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{I_{nq}}{I_0} + \frac{I_q}{I_0}(1-f) \qquad (1)$$

donde I/I_0 es la fracción de fluorescencia atenuada, I_{nq}/I_0 la fracción de fluorescencia no atenuable (f_{nq}), I_q/I_0 la fracción de fluorescencia atenuable (f_q) y f la fracción atenuada. Este último parámetro se obtuvo de acuerdo con,

$$f = \frac{\left(\left(k\left(H_0 + M_0\right)+1\right)\right) - \left(\left(k\left(H_0 + M_0\right)+1\right)^2 - 4\,k^2 H_0 M_0\right)^{1/2}}{2\,kH_0} \qquad (2)$$

donde M_0 es la concentración de metal, H_0 es la concentración de sitios ligando en solución y k es la constante de binding (en 1/M).

Las ecuaciones (1) y (2) surgen de asumir una relación metal:ligando de 1:1 de acuerdo con la ecuación de la constante de equilibrio

$$k = \frac{[MH]}{[M][H]} \quad (3)$$

donde *k* es la constante de equilibrio, *[MH]* la concentración de metal asociado a AH, *[M]* la concentración de metal libre y *[H]* la concentración de AH.

El planteo y las ecuaciones presentados en esta tesis son similares al modelo propuesto por Ryan y Weber (1982), aunque el análisis presentado aquí es más completo dado que se desacopla la contribución de cada factor fluorescente extraída de PARAFAC y permite explicar la variación en toda la matriz y no solo a una longitud de onda puntual.

Por último, se estimó el grado de agregación de los AH inducido por los metales mediante el cálculo de la variación porcentual en señal del Rayleigh de segundo orden. Para ello se calculó la diferencia entre la fluorescencia del Rayleigh y de un segmento paralelo en el que la dispersión no influye en la señal.

3.2.6 Propiedades Ácido-Base de los AH

Se preparó una solución de AH 300 mg L^{-1} del estrato superficial (0-2 cm) del BS. La disolución se facilitó por agitación en medio alcalino (NaOH 10^{-3} M) por 12 h y bajo atmósfera de N_2. Luego, se neutralizó la cantidad de hidróxido agregada con HCl, fijando la fuerza iónica de la solución e 10^{-3} M. La titulación se realizó mediante agregados de 5–10 µL de NaOH 0,1 M con microbureta entre pH 3,5 y pH 10,5. Los valores de pH se registraron luego de que el valor se estabilizara en el tercer decimal. Los moles de titulante consumidos entre los pH 3,0 y 8,0 se atribuyeron al contenido de ácidos carboxílicos mientras que el contenido de fenoles se calculó como el doble de los moles de titulante consumidos entre los pH 8,0 y 10,0 (Bowles *et al.*, 1989).

3.2.7 Espectrometría UV–Visible

Se obtuvieron espectros UV entre 200 y 800 nm de las muestras a pH 3,0 y pH 5,0 preparadas para 3.2.5.2. Dado que se espera que los estratos lindantes sean similares y que los intermedios no dieron buenos rendimientos de extracción, se utilizaron solamente los extremos: 0–2 cm y 8–12 cm.

Las mediciones se realizaron en un espectofotómetro Shimadzu UV–1800. Para el cálculo de algunos de los índices, en lugar de la absorbancia se utilizó un coeficiente de absorción (Braslavsky, 2006) Este se calculó como $c=2{,}303Al^{-1}$, con c como el coeficiente de absorción Naperiano, A la absorbancia a una determinada longitud de onda y l el camino óptico en m.

3.2.7.1 Relaciones espectrales e indicadores

A partir de los espectros obtenidos se calcularon los siguientes parámetros:

- SUVA: c254/COD (mg C L^{-1}) indicador directamente proporcional del grado de conjugación de la MO (Weishaar *et al.*, 2003)
- Cociente de pendientes espectrales $S_R=S_{275–295}/S_{350–400}$: indicador inversamente proporcional al tamaño molecular (TM) y del origen de la MO. Valores pequeños indican el carácter alóctono de la MO (Helms *et al.*, 2008).
- Pendiente espectral $S_{275–295}$: indicador inversamente proporcional al TM de la MO (Helms *et al.*, 2008 y Fichot y Benner, 2012).
- a350: es el coeficiente de absorbancia a 350 nm. Se relaciona con el carácter alóctono de la materia orgánica disuelta y con el contenido de lignina.
- Relación E_4/E_6 (Abs 465/Abs 665): Chen *et al.* (1977) relaciona inversamente este índice con el TM.
- A2/A4: es la relación de absorbancias c270/c407 y provee información acerca del origen acuático o terrestre de los ácidos húmicos (Fooken y Liebezeit, 2000).

3.2.8 Análisis estadístico

Los test de ANOVA y Kruskal–Wallis (KW) (cuando no se cumplieron los supuestos de homocedasticidad y normalidad) se utilizaron para comparar la composición elemental, las relaciones atómicas, las fórmulas empíricas y los indicadores obtenidos de los espectros UV-Visible.

Para comparar los niveles estadísticamente significativos se utilizó el análisis por contrastes. En todos los casos se utilizó el software Infostat 2014 y el nivel de significación se fijó en $\alpha = 0,05$.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Rendimientos de extracción

El rendimiento de extracción, también analizado en el capítulo anterior, se muestra nuevamente en la Figura 18 junto con el pH, Eh, % MO y % agua. Además de lo descripto previamente, se observa que en el BN y BS el grado de compactación y el contenido de ácidos húmicos se separan hacia el tercer estrato. En ambos casos se puede apreciar la asociación entre los porcentajes de agua y AH. Para el BN, el coeficiente de correlación entre las variables fue de r=0,86 mientras que para el BS de r=0,80 ($p<0,05$). Para el Centro se observa la misma tendencia en la primera transición aunque la asociación no es significativa en el resto del perfil.

Los brazos son más ricos en AH que el Centro, lo que está de acuerdo con la diferencia en la disponibilidad de material a sedimentar debido a la mayor extensión de la columna de agua sobre-yacente en los brazos (3,5 y 4,5 veces mayor para el BS y BN, respectivamente). Además, se ve una disminución en el contenido de AH de 2,1 a 0,5% en el BN mientras que en el BS se observa la misma tendencia (2,5 a 1,9%) hasta el cuarto centímetro, desde allí hay un aumento en forma especular con el BN, de 1,9 a 3,5% hasta los 12 cm y finalmente un descenso a 1,5%.

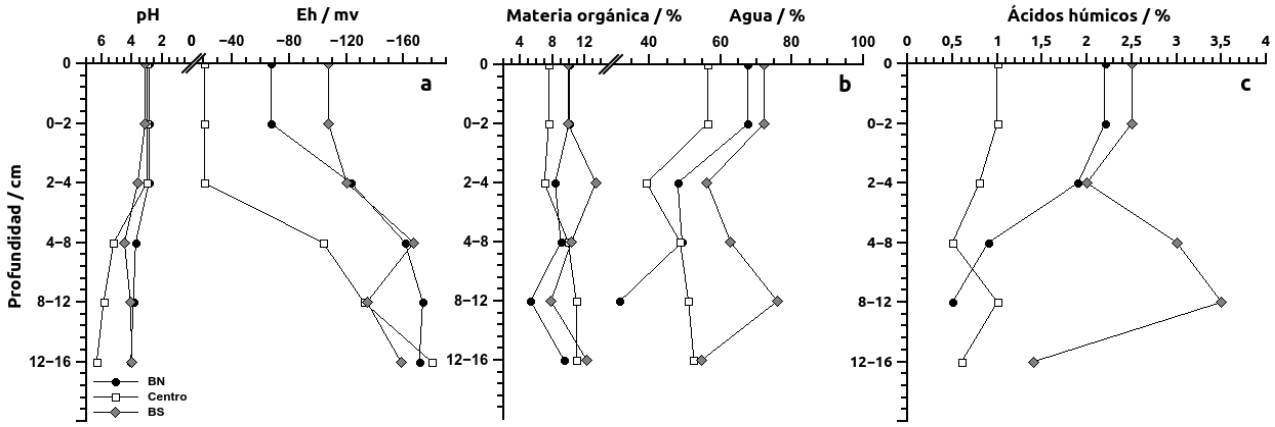


Figura 18 a: Eh, pH, b: contenido de MO, de agua y c: de AH en el perfil vertical del sedimento, por estrato y sitio muestreado.

En el Centro el contenido de AH osciló entre 0,5 y 1,0 % del sedimento sin mostrar una tendencia comparable con la de los sitios profundos.

3.3.2 Composición elemental

El análisis estadístico de los resultados presentados en la Tabla 11 puso en evidencia la formación de dos grupos: BN y BS por un lado y el Centro por el otro. Estos se formaron por diferencias significativas en solo cuatro de los cinco elementos evaluados: carbono (p=0,002), nitrógeno (p=0,025), hidrógeno (p=0,008) y oxígeno (p=0,002).

Tabla 11 Composición elemental de los ácidos húmicos extraídos del sedimento, para todos los sitios y estratos (MI: muestra insuficiente; N/D no determinado; Prom: promedio; DS: desvío estandar). Las relaciones C/N, O/C, H/C y C/S fueron realizadas en base a los porcentajes atómicos de cada elemento.

	C%	N%	H%	S%	O%	N/C	O/C	H/C
BN								
0–2	47,4	5,2	6,5	3,2	37,7	0,094	0,53	1,66
2–4	46,1	4,5	5,7	2,7	41,1	0,084	0,59	1,48
4–8	46,4	4,2	5,6	3,1	40,7	0,078	0,59	1,44
8–12	46,3	4,8	6,2	5,1	37,7	0,090	0,54	1,60
Prom	**46,5**	**4,7**	**6,0**	**3,5**	**39,3**	**0,086**	**0,56**	**1,54**
DS	**0,6**	**0,4**	**0,5**	**1,1**	**1,9**	**0,007**	**0,03**	**0,10**
Centro								
0–2	40,8	3,6	5,2	2,5	47,9	0,076	0,78	1,53
2–4	40,6	2,9	5,3	3,3	47,9	0,062	0,79	1,58
4–8	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI
8–12	46,1	4,6	5,7	3,2	40,4	0,086	0,58	1,48
12–16	43,2	3,3	5,1	3,0	45,3	0,066	0,70	1,42
Prom	**42,7**	**3,6**	**5,3**	**3,0**	**45,4**	**0,073**	**0,71**	**1,50**
DS	**2,6**	**0,7**	**0,2**	**0,3**	**3,5**	**0,011**	**0,10**	**0,07**
BS								
0–2	46,9	5,1	6,1	3,5	38,4	0,093	0,55	1,55
2–4	48,8	6,2	6,5	3,5	35,0	0,108	0,48	1,58
4–8	48,8	5,4	6,3	1,5	38,1	0,095	0,52	1,54
8–12	49,4	5,2	6,3	3,5	35,6	0,090	0,48	1,54
12–16	46,6	3,9	5,8	2,6	41,1	0,072	0,59	1,49
Prom	**48,1**	**5,1**	**6,2**	**2,9**	**37,6**	**0,092**	**0,52**	**1,54**
DS	**1,2**	**0,8**	**0,3**	**0,9**	**2,4**	**0,013**	**0,05**	**0,03**

Las composiciones elementales de los AH extraídos de todos los sitios del lago estuvieron dentro del rango establecido por Rice y MacCarthy (1991) y fueron similares a los promedios obtenidos de

otros trabajos (OT) para otros AH sedimentarios (excepto por el bajo contenido de C en el Centro). El hecho de que el C fue levemente menor y el O levemente mayor pueden ser indicadores de un menor grado de condensación (Stevenson, 1994). En la Tabla 12 se muestra que los promedios presentados en OT y en R&M son similares entre sí en el contenido de C, O y S mientras que difieren para N y H.

Las relaciones elementales H/C, O/C y N/C suelen arrojar valores más altos para AH extraídos de sedimentos acuáticos que para los terrestres, debido a que los primeros poseen un alto contenido de compuestos alifáticos y proteínas mientras que los segundos son ricos en lignina, un polímero con alto grado de condensación aromática sin nitrógeno. Los lacustres (respecto de los marinos) son particularmente ricos en oxígeno (Stuermer *et al.*, 1978; Rice y MacCarthy, 1991). El carácter alifático sugerido por las relaciones elementales es indicador de humificación de MO autóctona: algas, bacterias y hongos presentes en la columna de agua y los sedimentos.

Las relaciones C/N, O/C, H/C y C/S arrojaron valores semejantes para los tres sitios. Se observan pequeñas diferencias para O/C y N/C y solo resultaron significativas para O/C ($F=11,17$; $p=0,0028$). Como en el caso anterior (composición elemental), se formaron dos grupos, BN y BS por un lado y Centro por el otro. Dado que el oxígeno se calculó por diferencia, es posible que se haya subestimado el contenido de cenizas y que por ello los otros valores hayan resultado menores.

Las relaciones elementales N/C y O/C de LC no difirieron significativamente con los valores de los otros trabajos a diferencia de los cocientes H/C y S/C. En el primer caso el indicador resultó levemente mayor y posiblemente se deba a su alto contenido de residuos alifáticos (como se verá en el análisis por FT-IR) pero en el segundo fue menos de la mitad.

Tabla 12 Composición elemental promedio y relaciones N/C, O/C, H/C y C/S de BN, C, BS y LC (Lago Caviahue), promedios y rangos realizados con datos de bibliografía. Los datos consignados en "Otros" fueron extraídos de Ishiwatari (1985) el cual es una recopilación de datos de 8 trabajos, de Belzile *et al.* (1996), de Giovanela *et al.* (2004) y de Hur *et al*. (2009), y promediados. Los datos consignados en R&M–A (acuático), R&M–S (suelos) y Rangos R&M fueron extraídos de Rice y MacCarthy (1991) quienes trabajaron con 56 muestras de AH extraídas de sedimentos de cuerpos de agua dulce.

	C%	N%	H%	S%	O%	N/C	O/C	H/C	C/S
BN	46,5	4,7	6,0	3,5	39,3	0,086	0,56	1,54	37,6
C	42,7	3,6	5,3	3,0	45,4	0,073	0,71	1,50	38,4
BS	48,1	5,1	6,2	2,9	37,6	0,092	0,52	1,54	39,5
LC	45,8	4,5	5,8	3,1	40,8	0,083	0,59	1,52	38,5
OT	50,7	4,6	5,9	1,6	38,3	0,08	0,57	1,39	81,1
R&M–A	51,2	2,6	4,7	1,9	40,4	–	0,60	1,12	–
Rangos R&M	43,7–56,0	0,6–7,9	3,5–6,5	0,3–4,9	30,9–48,2	–	0,42–0,80	0,79–1,69	–
R&M–S	55,4	3,6	4,8	0,8	36,0	–	0,50	1,04	–

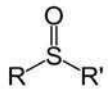
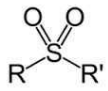
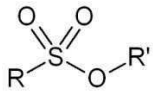
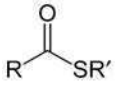
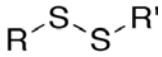
El contenido de S en los AH estimado en este trabajo resultó significativamente mayor al informado en la bibliografía (Tabla 12). Cabe destacar que solo se determinó su contenido en 13 de las 56 muestras informadas en R&M, y que de OT, únicamente Giovanela *et al.* (2004) tuvieron en cuenta a este elemento en su análisis. Por otra parte, Francois (1987) y Ferdelman *et al.* (1991) encontraron que en sedimentos marinos, la relación C/S es levemente mayor (~56), a la hallada en el LC. El contenido de S es mayor en sedimentos marinos que en lacustres debido al alto contenido de SO_4^{-2} en el agua de mar. El agua de la columna del Lago Caviahue también es rica en este ion (Pedrozo *et al.*, 2008; Varekamp, 2008), y sus sedimentos ricos en SO_4^{-2} y S^{-2}(Koschorreck *et al.*, 2008; Temporetti *et al.*, 2013), por lo que es esperable que sus AH reflejen relaciones C/S menores.

Nissenbaum y Kaplan (1972) y Francois (1987) sugirieron que el contenido de azufre en los AH de sedimentos marinos proviene de la reacción de sulfuros disueltos con la MO. Por otra parte, Whelan *et al.* (1980), Sinninghe–Damsté *et al.* (1986) y Brassel *et al.* (1986) descubrieron que los sulfuros se incorporan a los esqueletos de algas y bacterias en la diagénesis temprana del sedimento. Luther *et al.* (1986) propusieron que el tiosulfato formado durante la oxidación de la pirita desplaza grupos hidroxilo asociados con el carbono orgánico disuelto (COD) en el agua intersticial del

sedimento. Finalmente, Ferdelman *et al.* (1991) establecieron que la incorporación del azufre a los AH se da a través de dos posibles tipos de precursores: 1) especies oxidadas del azufre (HSO_3^- o $S_sO_3^{-2}$ formadas a partir de la oxidación de sulfuros o pirita) o especies reducidas del azufre (SH^- o S_x^{-2}). Además, propusieron que: períodos de limitación de hierro (que imposibilitan la rápida precipitación de pirita), altas concentraciones de sulfuros y de MO deberían facilitar la formación de sulfuros húmicos. Cualquiera sea el mecanismo químico, el agua intersticial de los sedimentos de Caviahue posee una alta concentración de sulfuro disuelto disponible para ser incorporado a los AH.

Los posibles tipos de grupos funcionales formados a partir de las especies del azufre detalladas: sulfóxidos, sulfonas, sulfonatos, tioéteres, disulfuros (Kohnen *et al.*, 1990; Vairavamurthy *et al.*, 1997) y su fórmula se especifica en la Tabla 13.

Tabla 13 Grupos funcionales potencialmente presentes en los AH.

Grupo funcional	Fórmula
Sulfóxido	
Sulfona	
Sulfonato	
Tioéter	
Disulfuro	

En las fórmulas empíricas calculadas a partir de los porcentajes atómicos, se ve un alto grado de similitud (Figura 19). Mientras que el BN y en Centro solo difirieron en un 7% de O (el mayor valor para el Centro), ambos sitios se diferenciaron del BS en el contenido de: C, H y N, siendo estos un 3% menor, 4% y 1% mayor, respectivamente, para los AH de este último sitio. El contenido de O fue similar en ambos brazos. Las diferencias no resultaron significativas para estas variables.

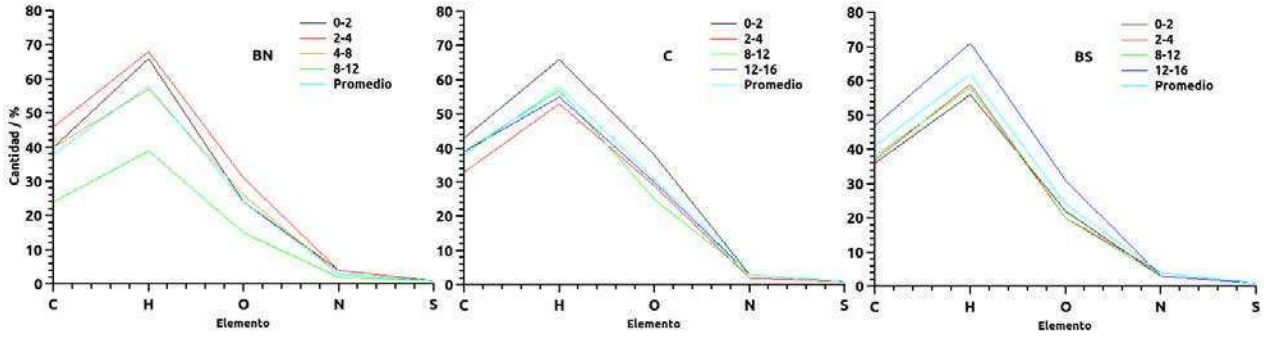


Figura 19 **Fórmulas empíricas de los AH correspondientes a todos los estratos por sitio. En todos los casos las fórmulas están en función de un átomo de azufre.**

3.3.3 Espectrometría UV–Visible e indicadores

Los espectros de los tres sitios, sin importar el pH, evidencian un hombro a 270 nm (Figura 20a, flecha) que se corresponde con la presencia de estructuras aromáticas (Stevenson y Schnitzer, 1972). Además, en los Brazos, se ve una meseta a 410 nm y un codo más sutil a 665 nm (Figura 20b). Estos rasgos son muy marcados excepto para el estrato profundo del BS. Ambos han sido asociados con la fluorescencia de productos de degradación de la clorofila *a*. Algunos autores realizaron lavados con solventes orgánicos (metanol y benceno/metanol) para estudiar el tipo de asociación de los pigmentos con los AH. La permanencia de las señales en los espectros post-extracción les indicó que el carácter de la unión es covalente y que estos forman parte de la estructura (Desai y Ganguly, 1970, Ishiwatari, 1973, Fooken y Liebezeit, 2000).

La disponibilidad de productos de degradación de la Clorofila *a* está íntimamente relacionada con la cantidad de material algal sedimentado. Como se mencionó en la sección 3.3.1, la extensión de la columna de agua es mucho mayor en los brazos que en el Centro. Este fenómeno determina que el contenido de MO humificable y de pigmento sea mucho menor en el Centro, lo que estaría de acuerdo con la ausencia de esta señal en el material extraído de este sitio.

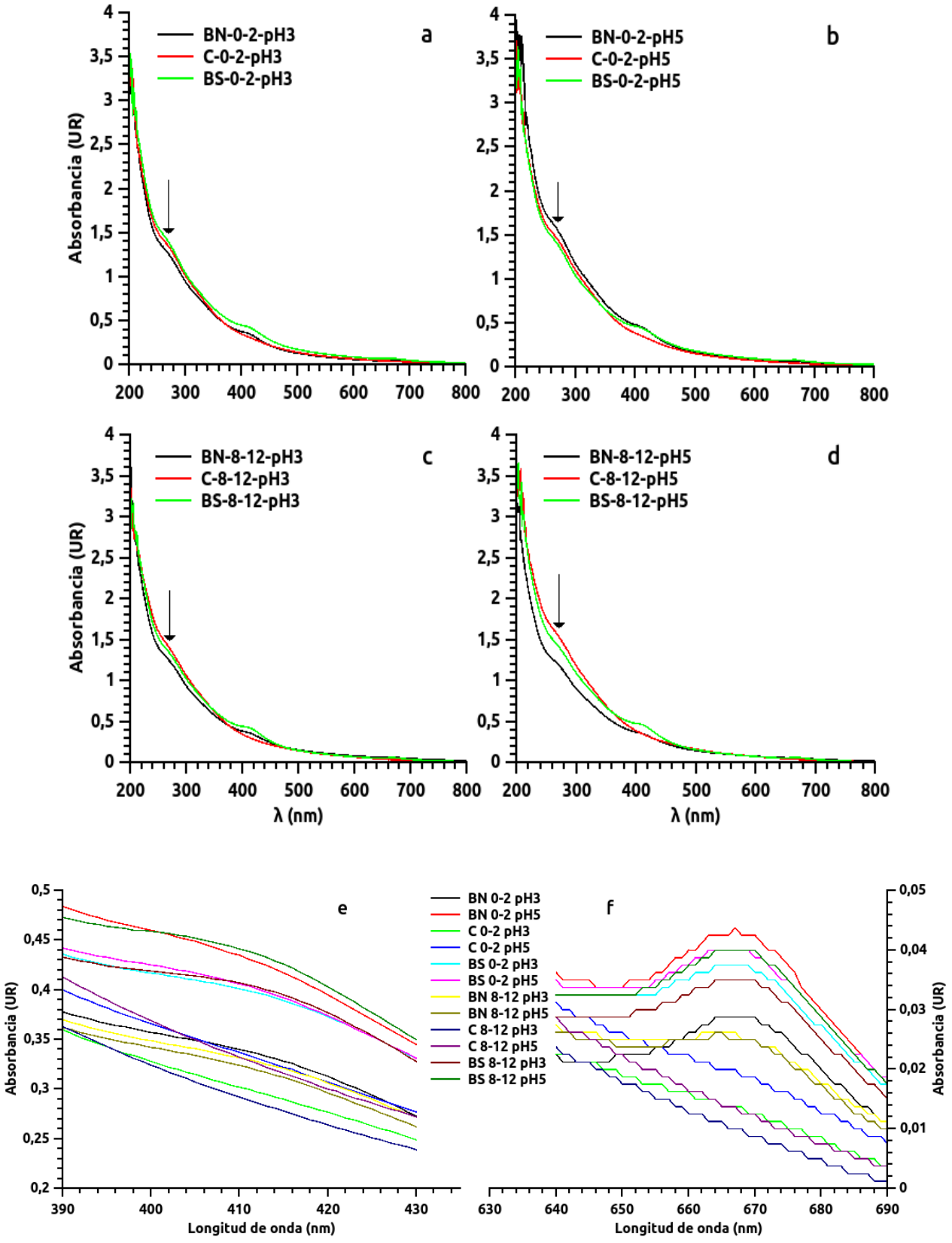


Figura 20 **Espectros de absorbancia UV–Visible de BN, C y BS de los estratos superficiales (a y b) y profundos (c y d) tomados a pH 3,0 y 5,0., y la ampliación de las regiones 390–430 nm y 640–690 nm (e y f, respectivamente).**

3.3.3.1 Relaciones espectrales e indicadores espectrofotométricos

De los resultados calculados para los indicadores espectrofotométricos (relaciones y pendientes) se muestran solo los correspondientes a las mediciones realizadas a pH 3,0 dado que se obtuvo una diferencia no significativa de 4% respecto de los valores para pH 5,0.

Los valores obtenidos para la relación E4/E6 fueron menores que 5,0, y congruentes con los esperados para un ácido húmico (Tabla 14). Para ácidos fúlvicos el valor de este indicador es mayor (6,0–8,5). De acuerdo con este índice, el tamaño molecular (TM) del estrato superficial del BN es menor que en el profundo mientras que en el BS ocurre lo opuesto. La diferencia fue significativa en ambos casos ($F=40,5$; $p=0,0002$) y de un 15-20% aproximadamente. En el Centro los valores difirieron solo en un 5%.

Del ANOVA se dedujo que el grado de humificación, condensación y TM es comparable para los sitios BN 0–2, C 0-2, C 8-12 y BS 8–12 mientras que para BN 8–12 y BS 0–2, es mayor (de acuerdo con Chen et al. 1977; McDonald *et al.*, 2004). Belzile *et al.* (1996) estudiaron 3 lagos ácidos en Canadá, el Tilton, el Clearwater y el Silver, con pH de 4,0, 4,8 y 5,6, y obtuvieron valores de E_4/E_6 de 4,30, 4,47 y 4,66, respectivamente. El promedio es de 4,47, similar a la media de 4,49 reportada en este trabajo. En contraste, Hur *et al.*, (2009) informaron un valor de 5,22 para AH de sedimentos de seis lagos circumneutros y Filip *et al.*, (1988) un rango que osciló entre 4,90 y 6,30 para AH de una marisma salobre, indicando que el TM del material húmico es mayor en ambientes ácidos.

Para la relación S_R se encontraron diferencias significativas ($F=9,83$; $P=0,0074$) y los sitios se agruparon de la misma forma que para E_4/E_6 ($r=0,93$; $p<0,05$), lo que concuerda con el postulado de Helms *et al.* (2008) acerca de la fuerte correlación entre el TM de la MOD y el cociente de las pendientes espectrales. Por su parte, la diferencia entre los valores de la pendiente $S_{275–295}$ no fueron significativos pero la tendencia fue la misma que la descripta para los otros dos.

Tabla 14 Índices calculados para los estratos superficial y profundo de cada sitio y promedio para cada indicador. Hur *et al.* (2009) son valores promedio para AH extraídos de sedimentos de seis lagos circumneutros.

Indicador	BN_0–2	BN_8–12	C_0–2	C_8–12	BS_0–2	BS_8–12	Promedio	Hur *et al.*
SUVA (nap)	6,6	6,6	8,2	7,6	7,4	7,2	7,2	2,13
E4/E6	4,65	3,75	4,83	5,07	4,09	4,58	4,49	5,22
S_R	1,2	0,8	1,2	1,4	0,9	1,3	1,1	1,3
$S_{275–295}$ (10^{-3})	9,99	9,52	9,84	10,34	9,88	9,31	9,81	8,60
$S_{350–400}$ (10^{-3})	8,68	11,96	8,32	7,39	10,81	7,33	9,08	7,01
E2/E3	2,46	2,46	2,53	2,55	2,45	2,39	2,47	–
a207/a407	3,58	3,57	4,29	4,58	3,34	3,18	3,76	–

Hur *et al.* (2009) concluyeron que la pendiente $S_{350–400}$ era el mejor estimador para predecir el origen de los AH, y en su caso hallaron un promedio de 7,0 (Tabla 14) para AH acuáticos y de 12,7 para terrestres. Para el LC, los valores de este indicador resultaron estadísticamente distintos entre los sitios estudiados (P=0,014) con un promedio de 8,16 para BN 0–2, C 0-2, C 8-12 y BS 8–12 y una media de 11,38 para BN 8–12 y BS 0–2. Los grupos formados son los mismos que para E_4/E_6 y S_R, y con una fuerte correlación (r=-0,90; p<0,05).

El índice SUVA es un indicador del grado de conjugación de la MO muy utilizado para aguas naturales y en menor medida para extractos de matrices sólidas (sedimentos y suelos). Weishaar, *et al.* (2003) determinaron que el hierro causaba una importante interferencia en el valor del índice en forma directamente proporcional a la concentración. En el presente trabajo se obtuvieron valores muy altos (7,28 en promedio) si se compara con la media de 2,13 para sedimentos y de 6,90 para suelos reportados en Hur *et al.* (2009). En los sedimentos ácidos de Caviahue, el hierro está fuertemente asociado a los AH (capítulo 1) lo que significa un mayor contenido del metal en la estructura supra-molecular. Lo mismo ocurriría en suelos ácidos y es debido a ello que los valores del indicador son comparables.

Por último, Fooken y Liebezeit (2000) desarrollaron el índice A2/A4, que al ponderar el contenido de Clo *a* (Abs 407 nm), permitiría diferenciar entre muestras de suelos y acuáticas. Ellos trabajaron solo con muestras marinas y hallaron tres rangos de valores posibles: 1) menor que 2,4

para muestras estrictamente marinas, 2) entre 2,4 y 3,4 para muestras mixtas y 3) mayor que 3,4 para muestras de suelos. Además, este indicador permite comparar el contenido de Clo *a* presente en las muestras extraídas de los distintos sitios. En la Tabla 14 y en la Figura 20 se muestra que el contenido del pigmento es levemente mayor en el BS que en el BN, y significativamente mayor en estos sitios que en el Centro ($p<0,0001$), y ello se refleja en los valores de A2/A4. Mientras que los brazos están dentro del rango asignado a muestras mixtas, el Centro se ubica junto con las muestras de carácter terrestre. Esto puede deberse a la influencia del RAS sobre los AH de este sitio o a lo ya expresado en la sección 3.3.3 cuando se discutió el contenido de Clo *a* covalentemente unido.

3.3.4 Espectrofotometría FT–IR

En la Figura 21 se muestran los espectros obtenidos para los AH extraídos de los diferentes estratos a partir de la totalidad de los sitios de muestreo. Las líneas de base se normalizaron al menor valor de absorbancia. En algunos casos se observan pequeños corrimientos que han sido registrados con dos valores de número de onda. En la Tabla 15 se muestra la asignación de las bandas de absorción en la región infrarroja del espectro electromagnético según una extensa revisión realizada por MacCarthy y Rice (1985) de los trabajos de Schnitzer y Skinner (1963), Wagner y Stevenson (1965), Theng *et al.* (1966), Theng y Posner (1967), Juo y Barber (1969), Stevenson y Goh (1971), MacCarthy y O'Cinneide (1974) y Rice y MacCarthy (1983), además de las publicaciones de Francois (1987), Piccolo (1988), Senesi *y* Brunetti (1996) y Senesi *et al.* (2003).

En la Figura 21 se observa que los espectros son muy similares, y que las mayores diferencias se registran en la absorbancia relativa de los GF y en el global de cada muestra. Esto último se debe a que la muestra se distribuye de forma heterogénea en las partillas de KBr y el promedio que realiza el equipo de la interacción del haz con el AH depende de esta distribución.

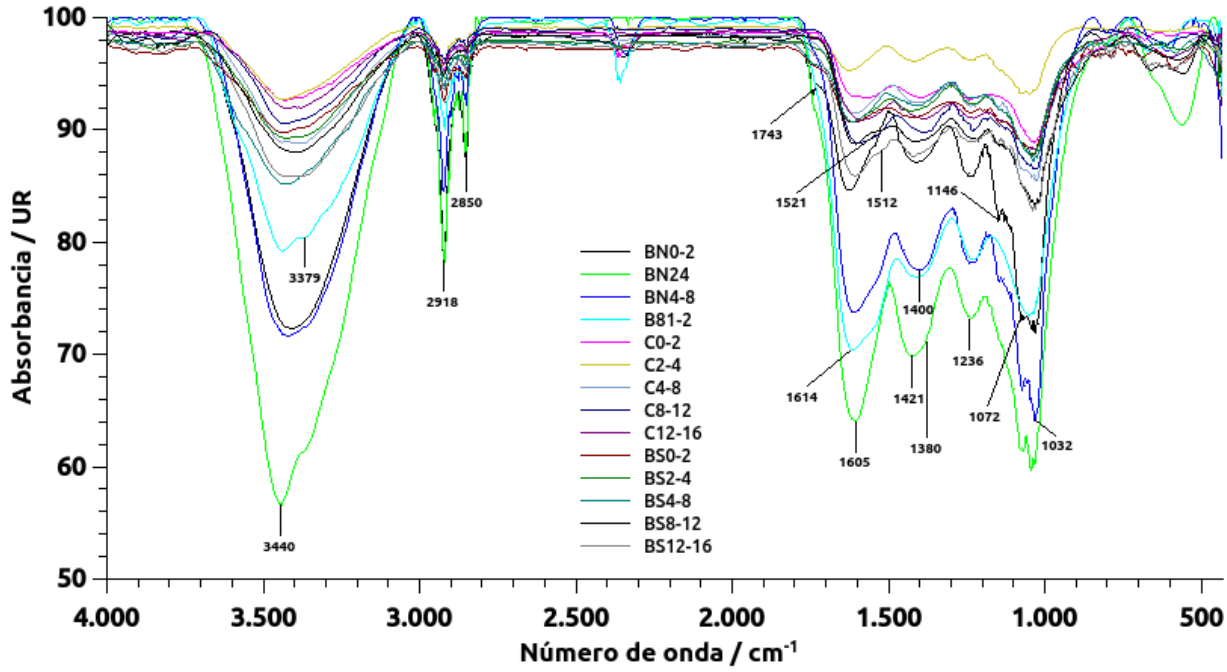


Figura 21 **Espectros FT–IR de todos los sitios y estratos muestreados.**

Tabla 15 **Bandas de absorción en el IR y asignación para SH**

Número de onda / cm^{-1}	Asignación de bandas
3500–3300	Estiramiento de O–H de fenoles, alcoholes y carboxilos, estiramiento N–H de amidas y aminas (traza)
3080–3030	Estiramiento C–H aromáticos
2925	Estiramiento C–H simétrico en cadenas alifáticas CH_3 y CH_2
2840	Estiramiento C–H asimétrico en cadenas alifáticas CH_3 y CH_2
1725–1710	Estiramiento C=O en quinonas, ceto–ácidos y amidas primarias
1660–1630	Estiramiento C=O de amidas (banda I de amidas) C=O de quinonas y/o cetonas conjugadas por puente H
1620–1600	Estiramiento C=C en anillos aromáticos Estiramiento COO^- simétrico
1580	Estiramiento C=N en amidas secundarias
1540–1510	Estiramiento C=C aromáticos Deformación N–H y estiramiento C=N (banda II de amidas)
1460–1440	Deformación C–H alifática
1420	Estiramiento C=N en amidas primarias (banda III de amidas)
1400–1380	Deformación de O–H y estiramiento C–O en OH fenólicos Estiramiento COO^- asimétrico

1260–1200	Estiramiento C–O y deformación O–H en carboxilos Estiramiento C–O en aril éteres y fenoles
1170–1120	Estiramiento C–OH en O–H alifáticos
1080–1030	Estiramiento C–O en polisacáridos y sustancias con residuos polisacarídicos Estiramiento Si–O en silicatos (impurezas)
975–775	Doblamiento fuera del plano de C–H aromáticos

Las bandas y picos registrados en todos los espectros han sido descriptas previamente para AH acuáticos, sedimentarios y de suelos.

El máximo a 3440 cm^{-1} corresponde al estiramiento de OH de alcoholes, fenoles y carboxilos, y a aminas estiramiento N–H de aminas y amidas (Wagner y Stevenson, 1965). El ancho de esta banda en particular no solo se debe a que corresponde al promedio de múltiples estructuras con el mismo grupo funcional sino a los puentes hidrógeno que estos forman entre sí (Theng *et al.*, 1966, Juo y Barber *et al.*, 1969).

Las señales a 2918 y 2850 cm^{-1} son comunes en los ácidos húmicos y sobre todo en los de origen acuático. Las mismas se asocian a estiramientos simétricos y asimétricos de las uniones C–H en cadenas alifáticas CH_3 y CH_2 (Theng *et al.*, 1966).

El hombro a 1743 cm^{-1} probablemente sea un corrimiento del que se corresponde con el estiramiento C=O debido principal, pero no exclusivamente a quinonas, ceto ácidos y amidas primarias. En los espectros de muestras a pH 7,0, este desaparece con la concomitante aparición de una banda a 1600 cm^{-1} y una intensificación en la absorción a 1400 cm^{-1} (Schnitzer y Skinner, 1963; Wagner y Stevenson, 1965; Theng *et al.*, 1966). Theng y Posner (1967) demostraron que la intensidad de este hombro puede correlacionarse con la capacidad de intercambio catiónico (por ejemplo, el contenido de -COOH). Los AH fueron liofilizados a pH cercano a 7,0 dado que la diálisis concluyó con agua desionizada.

La banda a 1605 cm^{-1} (y 1614 cm^{-1}) está asociada con C=C conjugados con C=O y/o COO^-, y/o con el estiramiento simétrico de grupos COO^- (Schnitzer y Skinner, 1968). Esta banda no suele ser tan prominente como las registradas en el presente trabajo y aparece como un hombro del pico a

1720 cm^{-1} (a la inversa de lo observado en la Figura 21). Por ello se entiende que ocurrió la inversión descripta en el párrafo anterior.

La absorción a 1630 cm^{-1} se corresponde con el estiramiento de grupos C=O de amidas (banda I de amidas) y con grupos C=O de quinonas y/o cetonas conjugadas por puente H (Schnitzer y Skinner, 1968), y a 1580 cm^{-1} la absorción se debe al estiramiento de amidas secundarias presentes en material del tipo proteico o peptídico (Stevenson y Goh, 1971), pero estas quedan enmascaradas en la intensidad del pico a 1605 cm^{-1}.

A 1512 cm^{-1} se puede apreciar un pequeño hombro atribuido al estiramiento de las uniones C=C en anillos aromáticos, a la deformación de la unión N–H y al estiramiento de la unión C=N (banda II de amidas). También ha sido asociado al estiramiento $Ar–NH_3^+$ en aminas aromáticas (MacCarthy y O'Cinneide, 1974).

El pico de la banda a 1421 cm^{-1} se corresponde con el estiramiento de la unión C=N en aminas primarias (banda III de aminas). Además, mientras la absorción entre 1460 y 1440 cm^{-1} es debida a la deformación C–H alifática, la correspondiente al intervalo entre 1400 y 1380 cm^{-1} es adjudicada la deformación del enlace O–H, al estiramiento C–O en los OH fenólicos y al estiramiento asimétrico de los grupos COO^- (en la Figura 21 se observa un hombro sutil a la última frecuencia) (Juo y Barber, 1969).

El máximo de la banda a 1236 cm^{-1} es asignado al estiramiento C–O y a la deformación dell enlace O–H debido principalmente a grupos carboxilo y al estiramiento C–O en aril–éteres y fenoles. Este pico se reduce cuando se estudian sales de AH (Juo y Barber, 1969). Además, la absorción a 1260 cm^{-1} fue descripta también para la absorción de grupos tiocarbonilo (Silverstein, 1981 en Francois, 1987)

El pico a 1146 cm^{-1}, que en algunos espectros aparece como un hombro, corresponde al estiramiento del enlace C–OH en OH alifáticos.

Los máximos a 1072 y 1032 cm^{-1} se deben al estiramiento de dos tipos de enlace distintos, por

un lado de C–O en polisacáridos y sustancias con residuos de polisacáridos, y por otro de Si–O en impurezas silíceas.

Finalmente, la absorción en la región comprendida entre los 975 y 775 cm^{-1} es característica del doblamiento fuera del plano de enlaces C–H en compuestos aromáticos. Se describe generalmente que esta región no aporta información significativa al estudio de SH, aunque Francois (1987) asignó tentativamente un pico a 800 cm^{-1} al estiramiento C-S, que puede observarse en los AH de Caviahue, lo que sería coherente con el alto contenido de S en las muestras.

La contribución de cada banda en el espectro de absorción brinda información acerca de la abundancia de los grupos funcionales relacionados con cada una de ellas. Dadas las variaciones en la absorción global mencionadas anteriormente, se procedió a relativizar el valor de los máximos obtenidos para cada pico/banda al registrado a 3440 cm^{-1} y los resultados se muestran como la diferencia relativa porcentual de los valores promediados para la frecuencia de cada máximo (Tabla 16). No se realizaron análisis individuales dada la falta de réplicas, por ello se agruparon todos los espectros de cada sitio.

Tabla 16 Diferencia porcentual entre los promedios de absorbancia de cada pico/bandaIR relativizados al valor obtenido a 3440 cm^{-1} para cada muestra y resultados del ANOVA. Dif. %: diferencia porcentual, NS: no significativo, S: significativo, F: estadístico, p: p–valor. Los sitios encerrados entre paréntesis indican la conformación de un grupo significativo.

Número de onda (cm^{-1})	Dif. %	Significación	F	p	Grupos por contrastes	Dif. % BN–(C-BS)
3379	2,0	NS	1,13	0,3540	NS	1,5
2918	6,9	S	5,34	0,2190	BN–(C/BS)	7,2
2850	9,7	S	13,25	0,0009	BN–(C/BS)	11,0
1743	11,0	S	17,94	0,0002	BN–(C/BS)	12,4
1614	7,0	NS	0,83	0,4580	NS	1,9
1605	7,1	NS	0,90	0,4326	NS	2,0
1421	7,3	S	4,54	0,0341	BN–(C/BS)	5,6
1400	7,4	S	4,48	0,0353	BN–(C/BS)	5,6
1236	8,7	S	7,78	0,0065	BN–(C/BS)	6,3
1146	6,2	S	5,07	0,0253	BN–(C/BS)	5,4
1072	3,9	NS	0,24	0,7908	NS	0,1
1032	4,2	NS	0,08	0,9202	NS	0,7

En todos los casos en que hubo diferencias significativas, se formaron dos grupos: el BN por un lado, y el BS y C por otro. Los porcentajes expresados en la última columna representan las diferencias entre las medias de los dos grupos, siendo en todos los casos, favorables al grupo C-BS. Los grupos funcionales que corresponden a las absorciones que más varían (>10%), respecto del contenido de -OH global, son las cadenas alifáticas (CH_2–CH_3, lo que implica un mayor grado de saturación) ya que la diferencia en el pico a 1743 cm^{-1} posiblemente se deba en mayor proporción a distintos grados de ionización de los carboxilos y en menor proporción a variaciones en este último grupo y en el contenido de amidas primarias, quinonas y ceto-ácidos. Los que menos varían (~5%) apoyan esta hipótesis ya que corresponden a doblamientos de cadenas alifáticas, fenoles, carboxilos. Por último, la absorción a 3440 cm^{-1} (-OH) es generalmente menor que la correspondiente a 1743 cm^{-1} o 1605 cm^{-1} (COOH) mientras que para los AH del LC se observa la tendencia inversa (Wagner y Stevenson, 1965, Theng *et al.*, 1966, Juo y Barber *et al.*, 1969, Stevenson y Goh, 1971, He *et al.*, 2006, entre otros).

3.3.5 Titulación potenciométrica

De acuerdo con la Figura 22, los AH utilizados en las titulaciones fluorométricas poseen 8,8 meq Q gC^{-1} correspondiente a grupos carboxilos ($-COO^-$) y 7,0 meq Q gC^{-1} debidos a grupos fenólicos ($-O^-$). Ritchie y Perdue (2002), realizaron un relevamiento exhaustivo en el que resumen información de 148 muestras de AH, sumado a la determinación de 14 muestras en su trabajo. Ellos encontraron que el promedio de carga debida al primer grupo para AH de origen acuático, es de 8,5±0,9 meq Q gC^{-1} mientras que la correspondiente a fenolatos es de 3,4±0,5 meq Q gC^{-1}. En base a estos datos, el contenido carboxílico de la muestra BS 0-2 es comparable con el de otros ambientes pero el fenólico sería del doble aproximadamente. La estimación realizada en esta tesis ha resultado muy precisa en la determinación de la acidez debida a grupos carboxilo y no así para la aportada por fenoles, que puede sobreestimar su contenido en un factor mayor a dos (Perdue y Lytle, 1983; Ritchie y Perdue, 2002). De todos modos, un mayor contenido de fenoles en los AH de Caviahue respecto de los trabajos citados estaría apoyado en la inversión en la absorbancia FT-IR de los picos

correspondientes a -OH y -COOH mencionada en la sección anterior.

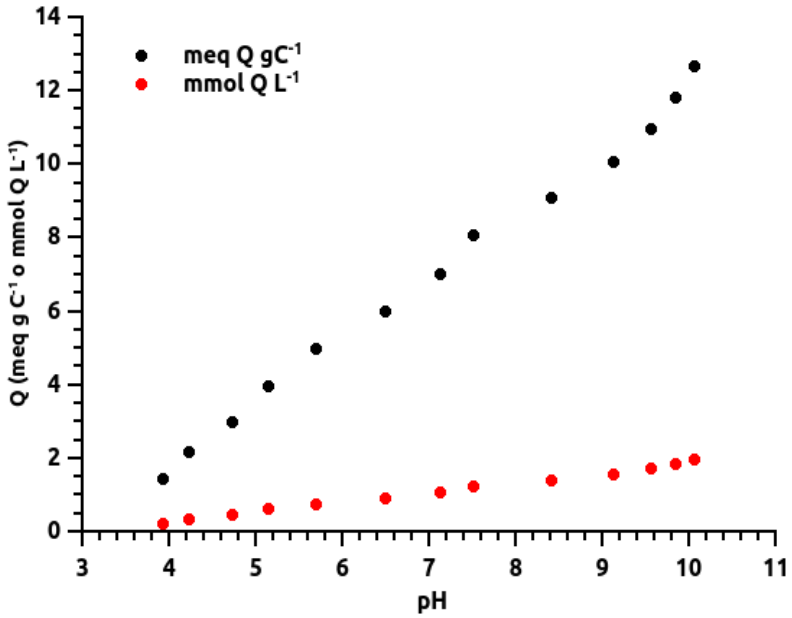


Figura 22 **Curva de titulación de los AH del estrato superficial (0-2 cm) del BS. El gráfico muestra los miliequivalentes de carga negativa (meq Q) por gramo de carbono y los milimoles (mmol Q) de carga por litro en función del pH de la titulación.**

3.3.6 Estudio fluorométrico

3.3.6.1 Componentes fluorofóricos y su relación con el pH

Todas las matrices obtenidas a partir de los AH extraídos de los distintos sitios y estratos del lago se pudieron explicar con los mismos dos factores fluorescentes dentro del error experimental, tanto en los experimentos a pH=3,0 y pH=5,0 como los realizados en presencia de los distintos metales. El factor 1 (F1) fue caracterizado por poseer dos máximos de excitación a 360 y 460 nm y un máximo de emisión a 495–500 nm, mientras que el factor 2 (F2) evidenció un máximo de excitación a 350 nm y un máximo de emisión a 430–450 nm. Los dos componentes poseen las características espectrales descriptas previamente para ácidos húmicos (Chen *et al.*, 2003, Ohno *et al.*, 2008; Orsetti *et al.*, 2013).

Los factores fluorescentes que se obtuvieron de la deconvolución de las matrices no se corresponden necesariamente a una única especie fluorescente, sino que pueden estar compuestos por la contribución de varias de ellas. A pesar de ello, a partir de la posición de los máximos registrados se pueden realizar inferencias estructurales de los fluoróforos, dado que a mayor

longitud de onda de excitación, mayor grado de conjugación. Ello sugiere que F1 es el componente con mayor grado de conjugación. Estudios previos sugieren este componente es el que presenta mayor interacción con los metales de transición (Stedmon *et al.*, 2003; Lakowicz, 2006).

En la Figura 23 se ve que los perfiles espectrales de excitación de F1 experimentaron una pequeña variación mientras que los de emisión fueron prácticamente invariantes. Para F2 la tendencia fue inversa dado que las mayores diferencias se observaron en el rango de emisión mientras que los perfiles de excitación fueron similares.

En ausencia de metal se observó luego del análisis de un total de 17 matrices, que el tiempo de convergencia del algoritmo PARAFAC fue mucho mayor que en presencia de los cationes, y en muchos casos se obtenían combinaciones lineales de F1 y F2 con escaso sentido físico. Este resultado puede atribuirse a la baja dependencia de las matrices de EEF con el pH. La misma tendencia fue observada en condiciones similares de bajo pH y fuerza iónica moderada (Fu *et al.*, 2004; Orsetti *et al.* 2013). En otras palabras, dado que la contribución relativa de cada uno de los factores es la misma, el tercer eje del tensor permanece constante (sin importar el número de matrices que sean apiladas) y la condición de trilinealidad requerida por el algoritmo PARAFAC no se satisface. En contraste, debido a la fuerte variación en la fluorescencia inducida por los metales se logró la tercera dimensión y una rápida convergencia.

La intensidad de la fluorescencia en la MOD (incluídas las SH) tiende a incrementarse a pH alto (Senesi, 1990; Senesi *et al.*, 1991; Coble, 1996; Bake, 2001), lo que puede atribuirse a que grupos fluorescentes que se encontraban en el interior de los agregados quedan expuestos ante los cambios generados por la repulsión electrostática (Miano *et al.*, 1988; Piccolo, 2001). Cuanto más alto es el contenido de hidroxilos fenólicos, más alto el grado de dependencia de la fluorescencia con el pH. Au *et al.*, (1999) mostraron que a pH neutro o alcalino, la linealización o elongación de los AH ocurre debido a repulsión molecular y más grupos fluorescentes quedarían expuestos a la solución llevando a un incremento en la fluorescencia. A pH bajo, la neutralización de los grupos ácidos incrementa el grado de hidrofobicidad del AH y por lo tanto, su grado de agregación. Como

consecuencia, algunos de los grupos quedan en el interior de la supra-estructura y no contribuyen a la fluorescencia global. A su vez, el incremento en el tamaño de los agregados (nanocoloidales) genera un aumento en la dispersión de la luz y consecuentemente, un aumento en las señales del Rayleigh.

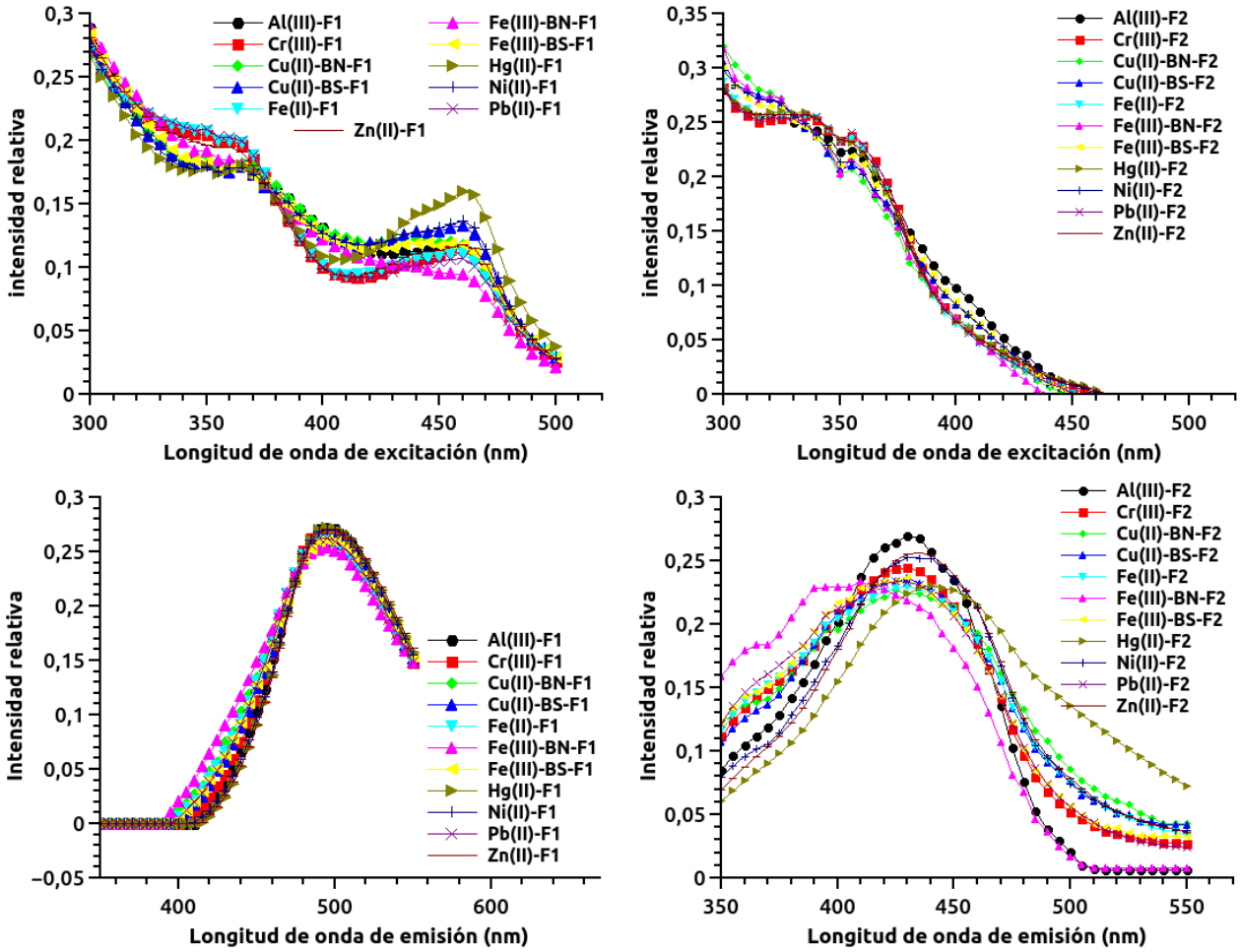


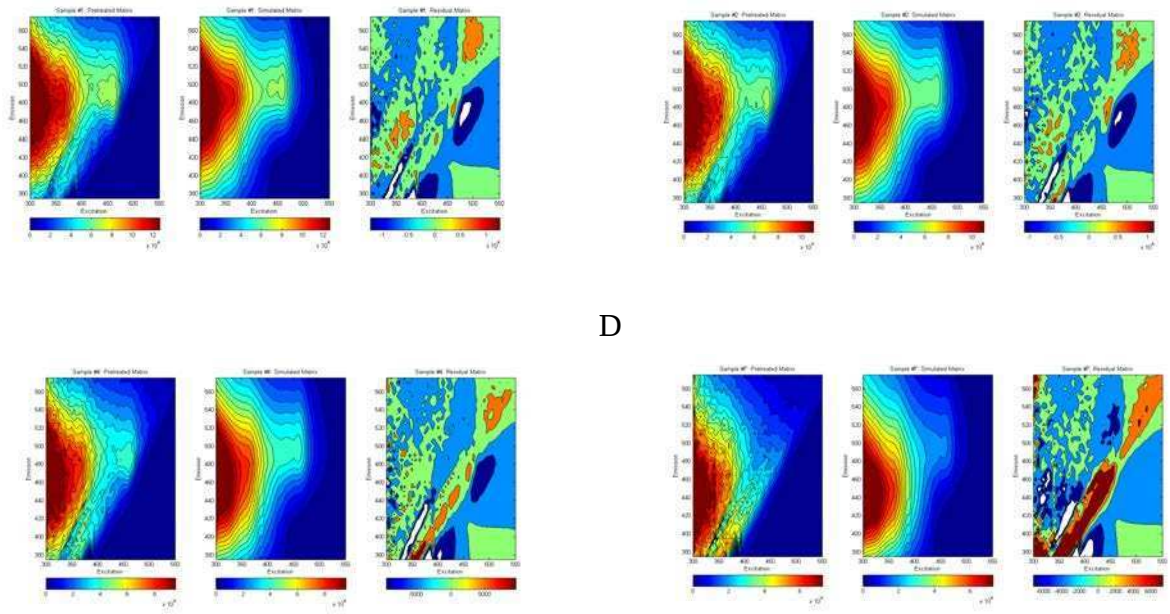
Figura 23 Perfiles de excitación y emisión de los componentes fluorofóricos (F1 y F2) identificados en los AH del BS y BN (para este último solo se estudió el comportamiento ante Fe(III) y Cu).

En suma se desprendieron dos resultados: 1) las diferencias físico–químicas que hubiere entre los AH a pH=3,0 y 5,0, de los estratos 0–2 y 8–12 cm y los sitios BN, C y BS no pudieron ser puestas en evidencia mediante los registros de emisión obtenidos, y 2) no se puede establecer una correlación sencilla entre el cambio en la emisión de F1 y F2 y fenómenos de dispersión/agregación que pudiesen estar ocurriendo con el leve aumento en el pH de la solución.

3.3.6.2 Titulaciones fluorométricas

En los ensayos de titulación la concentración de metales se incrementó hasta que la agregación de los AH condujo a la precipitación de los complejos de mayor tamaño. En el rango de concentraciones estudiadas, este fenómeno no sucedió en presencia de Zn o Hg. La dosis requerida para precipitar los AH es dependiente del metal y de la carga que este posea, siendo los iones trivalentes los más eficientes (Fe(III)>Al>Cr; Tabla 17). Para Cr y Al el umbral de precipitación se halló en un tercio de la concentración promedio de la correspondiente a los divalentes y para el Fe(III) en una décima parte.

A B



C D

Figura 24 **Matrices de excitación y emisión de fluorescencia del AH extraído del BS. De izquierda a derecha, en cada gráfico, se muestra: la matriz adquirida, la matriz procesada con PARAFAC y los residuos. A: fluorescencia nativa (en ausencia de metal), B a D: 16, 74, 1230 µM en Cu respectivamente.**

Luego de analizar todos los experimentos usando PARAFAC, las únicas matrices que mostraron residuos superiores al 10% fueron las correspondientes a la máxima concentración de Fe(III) y de Cu(II). Esto se debe a que en estas condiciones la atenuación de la fluorescencia fue muy importante, y para esas matrices la contribución de efectos no lineales asociados al *scattering* de Rayleigh y Raman tienen un peso muy importante. El fuerte *quenching* inducido por estos metales se debe a su carácter paramagnético (Saar y Weber, 1980). En la Figura 24 se muestra la serie de

titulación con cobre procesada con PARAFAC. De la misma se desprende que la atenuación en la fluorescencia es de naturaleza hiperbólica y que los residuos aumentan a medida que se incrementa la concentración del metal.

En la Tabla 17 y la Tabla 18 se muestra el resultado del análisis de emisión de fluorescencia en presencia de metales. La emisión total se calculó como la integral de cada matriz en la zona de análisis. La variación del Rayleigh de segundo orden se calculó como la diferencia entre la emisión registrada en la calle del Rayleigh y la de una calle desplazada 20 nm hacia valores más bajos de emisión y más altos de excitación, zona en la que la contribución de la dispersión Rayleigh de segundo orden puede considerarse despreciable. Por último, la contribución a la fluorescencia de los componentes F1 y F2 se extrajo del análisis PARAFAC.

Tabla 17 Variación porcentual en: emisión Total, Rayleigh de segundo orden y los factores F1 y F2 de fluorescencia extraída del análisis PARAFAC en función de la concentración del metal. CF: concentración final. El signo negativo corresponde a una disminución en la fluorescencia

Metal	Emisión total (%)	Rayleigh 2do orden (%)	F1 (%)	F2 (%)	CF (µM)
Al–BS	20,0	51,0	10,0	38,0	225
Cr–BS	–2,5	37,0	–12,4	13,0	325
Cu–BN	–43,0	100,0	–68,6	2,0	1330
Cu–BS	–48,0	55,0	–70,2	–9,2	1230
Fe(II)–BS	–40,0	33,0	–60,6	–11,3	1390
Fe(III)–BN	–54,0	17,0	–71,8	–9,5	120
Fe(III)–BS	–40,0	16,0	–57,7	–12,6	60
Hg–BS	–11,0	12,0	–18,3	–7,0	1380
Ni–BS	–17,0	39,0	–26,3	–4,7	1200
Pb–BS	–26,0	33,0	–40,4	–8,7	910
Zn–BS	–8,8	34,0	–15,6	1,0	1230

Los resultados mostrados en la tabla Tabla 17 se obtuvieron utilizando las concentraciones finales alcanzadas con cada metal mientras que en la tabla Tabla 18 todos los valores se extrapolaron a una concentración final de 1 mM, facilitando la comparación de las variaciones en la fluorescencia entre metales.

Tabla 18 Variación porcentual en: emisión Total, Rayleigh de segundo orden y los factores F1 y F2 de fluorescencia extraída del análisis PARAFAC extrapoladas a una concentración de metal de 1 mM. El signo negativo corresponde a una disminución en la fluorescencia.

Metal	Emisión total (%)	Rayleigh 2do orden (%)	F1 (%)	F2 (%)
Al–BS	89,3	228,0	44,6	170,0
Cr–BS	–7,7	115,0	–38,4	40,2
Cu–BN	–32,3	75,1	–51,5	1,5
Cu–BS	–39,1	44,8	–57,2	–7,5
Fe(II)–BS	–102,0	84,0	–154,0	–28,8
Fe(III)–BN	–462,0	145,0	–614,0	–81,2
Fe(III)–BS	–667,0	267,0	–962,0	–210,0
Hg–BS	–24,4	26,7	–40,7	–15,6
Ni–BS	–14,2	32,5	–21,9	–3,9
Pb–BS	–28,5	36,2	–44,3	–9,6
Zn–BS	–17,6	68,0	–31,2	2,0

Del análisis de estos resultados se desprende que los únicos casos en que la emisión total de fluorescencia aumenta, son para ambos factores de Al y para el F2 de Cr. Este fenómeno ha sido reportado para sistemas Al–SH a pH por debajo de 7,0 por otros autores (Cabaniss, 1992; Esteves da Silva y Machado, 1996; Zhao y Nelson, 2005). Este fenómeno ha sido relacionado con la formación de estructuras rígidas a nivel micelar y a la presencia de efectos hidrofóbicos y electrostáticos simultáneos. La exaltación de la fluorescencia fue reportada en entornos ácidos (o estado sólido), lo que resulta coherente dada la capacidad de los AH de formar micelas compactas en esas condiciones (Warwick *et al.*, 2001). Este fenómeno fue utilizado en la construcción del primer OLED (Organic Light Emiting Diod) para lo que se utilizó el complejo Al-Tris-(8-Hidroxiquinolina) fabricado en 1987 (Xu *et al.*, 2014). El caso del cromo fue particular dado que se observó disminución en la emisión del F1 (38,4%) mientras que el F2 tuvo un aumento significativo (40,2%).

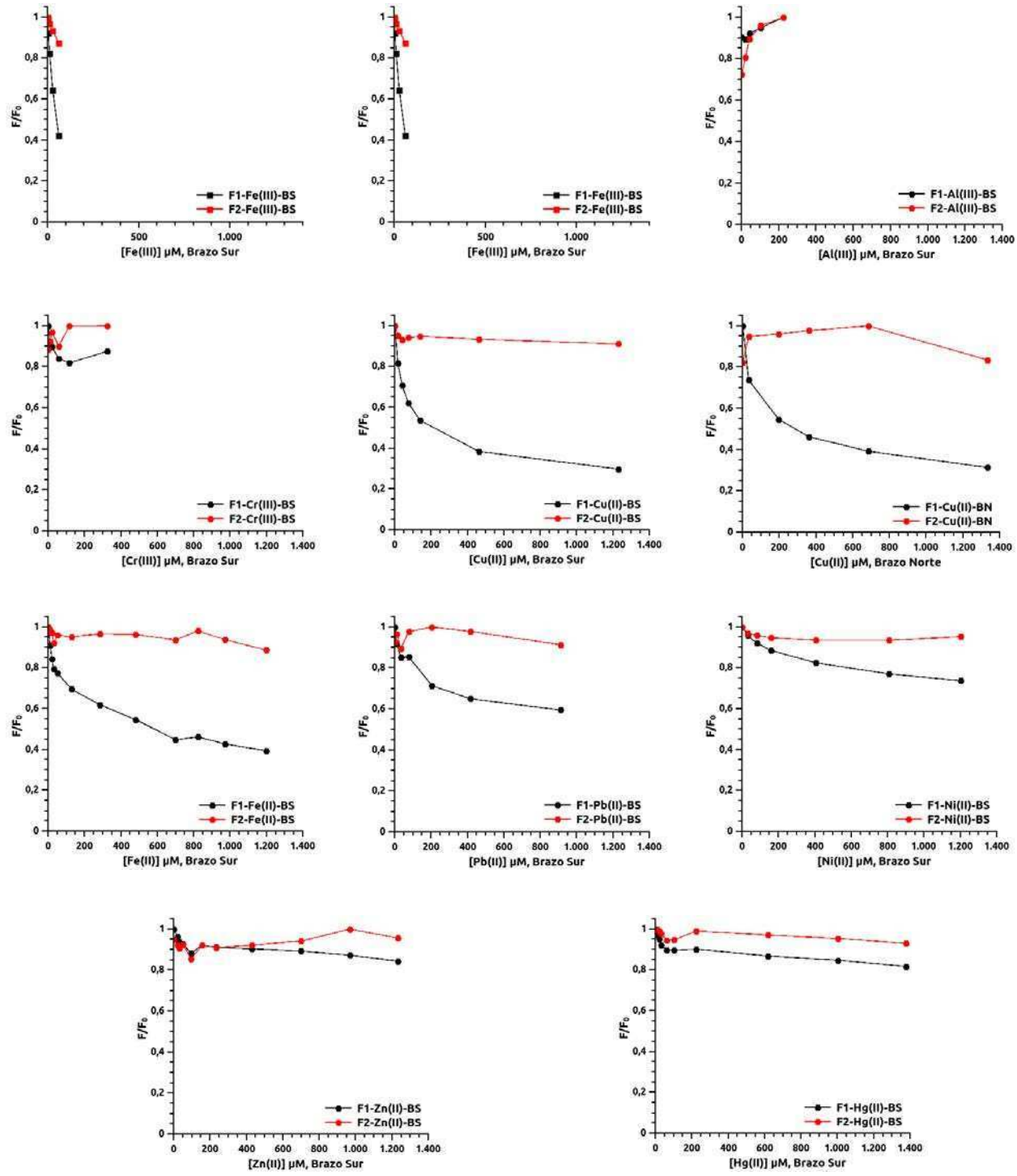


Figura 25 Perfiles de fluorescencia F/F_0 de los factores F1 y F2 normalizada por la fluorescencia máxima en cada caso. De izquierda a derecha y de arriba a abajo:Fe(III), Fe(III) BN, Al, Cr, Cu(II), Cu BN, Fe(II), Pb, Ni, Zn y Hg. Los casos en los que no se aclara el origen, la muestra es del BS. La escala de los ejes es la misma en todos los casos para facilitar la comparación.

La atenuación global inducida por el resto de los metales oscila entre el 14,2% para el níquel y 667% para el hierro. En la Figura 25 se observa que excepto en el caso del Al, la variación más importante en la fluorescencia la experimentó F1. Este resultado indica que los grupos de

fluoróforos que presentan mayor grado de conjugación son además los que muestran mayor capacidad de interactuar con metales. Por ese motivo, se seleccionó para realizar las estimaciones de afinidad.

En la Figura 25 se muestra gráficamente la atenuación experimentada por ambos factores. Se graficó la intensidad de fluorescencia de cada componente relativa al valor inicial, F/F_0 vs. [Me].

De los dos componentes, F1 fue el que presentó menor ruido, mientras que para F2 se observan fluctuaciones grandes (excepto para el Fe(III) y el Al). Esto sugiere que el grado de interacción entre este factor y los metales divalentes es despreciable al pH de trabajo. En todos los casos, la fluorescencia varía abruptamente a concentraciones bajas de metal, y en los casos en los que no se indujo rápidamente la precipitación, la curva de F1 se suaviza asintóticamente indicando la saturación de los sitios asociados a la fracción atenuable de la fluorescencia.

3.3.6.2.1 Cálculo de los parámetros de ajuste k, H_0, f_q

A partir del análisis de los cambios en la emisión, ya sea atenuación o exaltación, se obtuvieron tres parámetros que describen la interacción metal-ligando: el número de sitios (H_0) de *binding*, las constantes aparentes de afinidad (k) y la fracción de la fluorescencia atenuable por cada metal. Los tres primeros se estimaron a partir los perfiles de la ecuación (1) y (2) descriptas en la sección 3.2.5.2. Los componentes utilizados en los cálculos fueron los que presentaron mayor variabilidad (F2 para Al y F1 para el resto; Tabla 18). Ohno *et al.* (2008) concluyen que solo dos de los tres componentes descriptos por PARAFAC muestran atenuación o exaltación monotónica requerida para modelar complejación. En este trabajo, el tercer componente al que hacen referencia esos autores no se modeló ya que no aportó a la explicación de la variación de la fluorescencia en las titulaciones y el segundo (F2) que sí se tuvo en cuenta en primera instancia, se descartó posteriormente dado que su comportamiento no fue monotónico y la estimación de constantes (k) a partir del mismo carece de sentido físico (Figura 25).

La estimación de la variable H_0 arrojó desvíos muy grandes y por ello se la expresó a través de

una cota máxima. En consecuencia, el único análisis posible es que para Fe(II) y Pb, el número de sitios fue menor a 2 10^{-4} y para el resto, menor a 1 10^{-5}. El mismo efecto fue observado por otros autores (Bai *et al.*, 2008; Berkovic *et al.*, 2013) quienes concluyeron que este fenómeno no afecta la calidad de las k_s calculadas.

La capacidad de ligar metales por parte de los AH está relacionada, mayormente, con el contenido de grupos funcionales ácidos. A pesar de ello, la concentración de sitios complejantes H_0 es generalmente menor a la de grupos ácidos (Figura 22). Esta diferencia puede deberse a varios factores, entre ellos: 1) que los complejos sean bi- o multidentados entre distintas moléculas de AH, 2) que los complejos sean bidentados del tipo salicílico o ftálico y/o 3) a la presencia de grupos ácidos no accesibles por el metal debido a impedimentos estéricos, competencia con protones o efectos electrostáticos inducidos por la presencia de otro metal complejado en un sitio vecino (Tipping, 2002; Plaza *et al.*, 2005; Plaza *et al.*, 2006).

Tabla 19 Resultados del ajuste a las ecuaciones (1) y (2), con H_0: número de sitios de *binding*, log *k*: logaritmo de la constante aparente de *binding*, f_{nq}: fracción no atenuable, f_q: fracción atenuable, Factor: componente sobre el que se realizó la estimación y *CF*: concentración final de metal.

Metal	H_0 (M)	log *k*	f_{nq}	f_q	Factor #	CF (µM)
Al–BS	5,2 10^{-5}	5,15	0,72	0,28	2, Aumenta	225
Cr–BS	<1,5 10^{-5}	5,75	0,78	0,22	1, Atenúa	325
Cu–BS	<7,5 10^{-5}	5,20	0,35	0,65	1, Atenúa	1330
Cu–BS	<4,1 10^{-5}	5,20	0,29	0,71	1, Atenúa	1230
Fe(II)–BS	<2 10^{-4}	4,87	0,22	0,78	1, Atenúa	1390
Fe(III)–BN	2,9 10^{-5}	5,41	0,00	1,00	1, Atenúa	120
Fe(III)–BS	1,1 10^{-5}	5,39	0,00	1,00	1, Atenúa	60
Hg–BS	<7,1 10^{-5}	5,36	0,84	0,16	1, Atenúa	1380
Ni–BS	<2,2 10^{-4}	4,57	0,69	0,31	1, Atenúa	1200
Pb–BS	<1,6 10^{-4}	4,99	0,56	0,44	1, Atenúa	910
Zn–BS	<9,2 10^{-5}	5,43	0,88	0,12	1, Atenúa	1230

La interacción metal-ligando se puede evaluar utilizando dos parámetros, las constantes y la fracción de fluorescencia atenuada (f_q). Mientras que el primero da idea de la afinidad de la

interacción, el segundo brinda información sobre la cantidad de sitios, en otras palabras, la capacidad de carga.

En la Tabla 19 se observa que las constantes de afinidad por todos los metales estuvieron dentro del mismo orden de magnitud, aunque la capacidad de carga difirió sensiblemente. Este resultado sugiere que la fracción de sitios afines a metales como Zn o Hg es baja, y ello puede deberse a que estos son más propensos a asociarse con residuos del tipo -SH cuya frecuencia es baja. En contraste, metales como Fe, Cu, Ni, Pb, Cr o Al que son mas afines por los carboxilatos que Zn o Hg, atenuaron una fracción de fluorescencia mayor (Tipping, 2002).

Tanto el *quenching* como el grado de asociación de las SH con los metales son muy dependientes del material húmico utilizado, del pH y de las longitudes de onda de excitación y emisión escogidas (para el caso de los espectros sincrónicos). Un ejemplo de ello es que Saar y Weber (1980) no registraron variaciones en la fluorescencia de un ácido fúlvico en presencia de Cu a pH<4,0 mientras que el mismo metal atenuó aproximadamente el 70% de la fluorescencia de los AH de Caviahue.

Retornando a las constantes de afinidad, cabe resaltar que el orden de magnitud promedio (k~10^5) indica una fuerte interacción de los AH con todos los metales estudiados si se tiene en cuenta el bajo pH. Además, se hallaron en el orden de las calculadas por otros autores, para diversos metales y a valores generalmente más altos. Por ejemplo, Zhao y Nelson (2005) describieron para un AF una log k=5,1 para Fe y Al (pH=4,0) mientras que Ohno *et al.* (2008) observaron log k_{Al} =5,9 para un AH (pH=4,5), siendo estos valores similares a los determinados para Al y Fe en esta tesis (Tabla 19). Otro ejemplo de la dependencia con la composición del material extraído lo constituye el trabajo de Luster *et al.* (1996), en el que hallaron una log k=8,1 para un AH a pH 4,5.

Con los metales divalentes ocurre lo mismo, ya que los mismos autores (Luster *et al.*) informaron una log k_{Cu}=7,5 para un AH mientras que Plaza *et al*. (2006) calcularon para otro AH un valor de Log k_{Cu}=5,5, ambos a pH 6,0. En general, las constantes de afinidad de Cu, Zn, Hg y Pb por diversas fuentes de MOD se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que las halladas

para los AH de Caviahue (comparar Tabla 19 con Tabla 20; Luster *et al.*, 1996; Esteves da silva *et al.*, 1998; Lu y Jaffe, 2001; Plaza *et al.*, 2006; Mounier *et al.*, 2011; Berkovic *et al.*, 2013; McIntyre y Guéguen, 2013). En contraste, la afinidad de Ni (log *k*=4,57) o Cr (log *k*=5,75) por los AH estudiados en esta tesis resultaron dos órdenes de magnitud mayores que las determinadas en AF por Schnitzer y Khan (1970) y Saar y Weber (1980) para el primero, y Bidoglio *et al*. (1997) para el segundo. Esta diferencia puede dar cuenta de una mayor fuerza de interacción o deberse a la naturaleza del análisis, dado que como se mencionó en la sección 3.2.5.2 en nuestro caso se estudió la variación total de la matriz mientras que en los otros casos se utilizaron longitudes de onda individuales.

En la Tabla 20 se muestra un cuadro comparativo completo de las log *k* obtenidas por otros autores para ácidos húmicos, fúlvicos y MOD calculadas a partir de titulaciones fluorométricas y potenciométricas, cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración secuencial con marcación radiactiva (RT), y en la Tabla 21 se lista un resumen de los intervalos de las log *k* de la Tabla 20. De esta información se desprende que las constantes determinadas mediante la técnica fluorométrica son generalmente mayores que las estimadas por otros métodos.

Irving y Williams (1953) predijeron que el orden de afinidad por los metales divalentes debe ser: Mn(II)<Fe(II)<Co(II)<Zn(II)<Ni(II)<Cu(II). A esta serie se la conoce con el nombre de los autores y hace referencia a las estabilidades relativas de los complejos formados por estos metales. Si bien la estabilidad debería ser máxima para el Ni, los complejos octaédricos formados por el Cu pueden deformarse y ello les aporta mayor estabilidad, explicando las constantes más altas para este último. En nuestro caso, el orden resultó distinto (Zn>Cu>Pb>Fe(II)>Ni), sin embargo los dos metales que se desviaron de la serie, Ni y Zn, indujeron una atenuación inferior al 20% de la fluorescencia y el cálculo de sus constantes no es confiable debido al error experimental asociado. En cambio, si se evalúa el orden en función de la capacidad de carga (f_q; Fe(II)>Cu>Pb>Ni>Zn). la única desviación corresponde al Fe(II), que en nuestro sistema mostró una afinidad superior por los AH que la predicha por la serie. Otros autores también hallaron ordenamientos distintos de los que prevé esta

serie, por ejemplo Pb>Cu>Zn (Plaza *et al.* 1996; Chang Chien *et al.*, 2006), Cu>Zn>Ni (Baker y Khalili, 2007) o Cu=Zn>Ni (Kostić *et al.*, 2013).

Por otra parte, la relación estequiométrica entre metal y ligando suele ser modelada por autores que determinan la concentración de metal libre y complejado utilizando los modelos termodinámicos ya mencionados (NICA-Donnan, WHAM o EPN). En numerosas ocasiones se ha hecho referencia a la sencillez del modelo propuesto Ryan y Weber (1982) dado que asume una relación metal-ligando de 1:1 y que la constante es un promedio de todos los sitios complejantes de un mismo fluoróforo sin discriminar entre los de alta y baja energía. Recientemente, Kostić *et al.* (2013) hallaron mediante el método de Schubert de cromatografía de intercambio iónico, que Ni, Pb, Cu, Zn y Co forman complejos 1:1 con ácidos húmicos a pH 4,0. Sin embargo, otros han concluido que los AH forman quelatos bi o multidentados dentro y entre moléculas que se agregan utilizando al metal como agente aglutinante (Malcom, 1985; Mayer, 1985;Tipping, 1993; Tipping 1994; Tipping, 2002; Tipping *et al.*, 2002; Kloster *et al.*, 2013; Orsetti *et al.*, 2013, entre otros). Por ello, en esta tesis no se pretende realizar inferencias respecto de la estequiometría de la unión sino analizar la afinidad de la interacción y comparar la capacidad de carga de los AH por los metales estudiados.

Tabla 20 Constantes de afinidad (log *k*) para AH, AF y MOD obtenida de distintas fuentes. Las *k* fueron calculadas utilizando diversos métodos que están especificados el la última columna, TFluo: titulación fluorométrica, I.I.: intercambio iónico, TP: titulación potenciométrica, RT: técnica radiotracer. La marca * indica que trabajaron con el mismo material.

Autores	Metal	Log *k*	pH	Material	Método
Schnitzer y Hansen, 1970	Ni	3,1	3,0	AF	TFluo
Saar y Weber, 1980	Ni	2,8	4,0	AF	
Blaser *et al.*, 1980	Al	4,6	5,0	SH de compost de hojas	
Shotyk y Sposito, 1988	Fe(III)	5,3	4,5	SH de compost de hojas	
	Al	4,8			

Browne y Driscoll, 1993	Al	4,2	4,7	AF*	
Esteves da Silva y Machado, 1996	Al	5,6 y 4,6	–	AF	
Luster *et al.*, 1996	Cu	7,5 y 5,8	6,0 y 5,0	AH	
	Al	8,1 y 5,8			
Bidoglio *et al.*, 1997	Cr	2,1	4,5	AH	
		2,4	5,5		
Esteves da silva *et al.*, 1998	Cu	4,2 y 4,5	3,5	AF	
	Fe(III)	5,0 y 5,6			
Lu y Jaffe, 2001	Hg	4,1 y 5,3	8,0	DOM	
Zhao y Nelson, 2005	Fe(III)	5,1	4,0	AF*	
	Al	5,1			
Plaza *et al.*, 2006	Cu	4,7 y 5,5	6,0	AH	
	Zn	4,1 y 4,4			
	Pb	4,9 y 5,8			
Fu *et al.*, 2005	Hg	5,0-5,7	8,0	DOM	
Ohno *et al.*, 2008	Fe(III)	4,3 y 4,5	4,7	AH	
	Al	5,0 y 5,9			
Mounier *et al.*, 2011	Cu	5,7	6,0	MOD	
McIntyre y Guéguen, 2013	Cu	4,9 y 5,4	7,8	Exudado de alga	
Berkovic *et al.*, 2013	Hg	4,4-5,3	2,0	AF	
		4,6-4,9	7,0		
Pandey *et al.*, 2000	Cu	5,3	3,5	AH	I.I.
	Ni	3,2			
	Zn	2,7			
	Pb	3,7			
	Fe(III)	5,0			
Christl *et al.*, 2001	Cu	2,8 y 8,5	4,0	AH	TP
	Pb	1,6 y 5,4			
Nifant'eva *et al.*, 2001	Cu	5,4	5,0	AH	RT
	Zn	4,5			
Tipping *et al.*, 2002	Fe(III)	2,6	2,5	AH	TP
	Al	2,6			
Baker y Khalili, 2005	Cu	2,0-5,3	4,0-5,0	AH	I.I.
	Ni	1,6-3,2			
	Zn	2,7-4,7			
	Pb	2,8-5,3			

Kostić *et al.*, 2013	Cu	2,3	4,0	AH	I.I.
	Ni	2,2			
	Zn	2,3			
	Pb	2,5			

Tabla 21 Intervalos de log *k* calculadas por otros autores, mediante titulaciones fluorométricas y otras técnicas, consignadas en la Tabla 20. Los intervalos marcados con – indican que no se encontraron datos para esos metales.

Metal	Intervalo de log *k* TFluo	Intervalo de log *k* otros métodos
Cu	4,2-7,5	2,0-8,5
Zn	4,1-4,4	2,3-4,7
Pb	4,9-5,8	1,6-5,4
Ni	2,8-3,1	1,6-3,2
Hg	4,4-5,7	–
Fe(III)	4,3-5,6	2,6-5,0
Al	4,2-8,1	2,6
Cr(III)	2,1-2,4	–

Ryan y Weber (1982) y Ohno *et al.* (2008) monitorearon la variación *scattering* inducido por concentraciones crecientes de Fe(III) y Al en titulaciones fluorométricas de AH, y lo relacionaron un aumento en la agregación provocado por esos metales. En esta tesis, los metales estudiados también indujeron un aumento en la intensidad del *scattering* (Rayleigh de 2do orden) aunque con distinta intensidad (Fe(III)>Al>Cr>Fe(II) >Cu>Zn>Pb>Ni>Hg; Tabla 18). En comparación con el orden determinado para f_q, solo se modifica la posición de Al, Cr y Zn, que inducen mayor agregación a concentraciones menores (los primeros posiblemente debido a que son trivalentes).

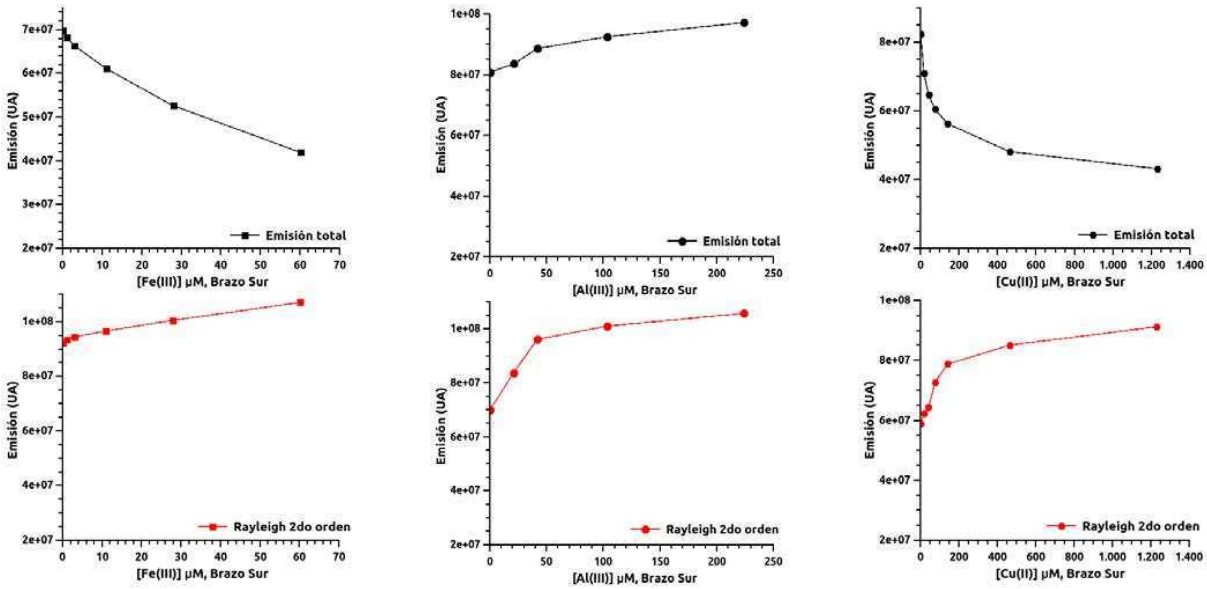


Figura 26 **Variación en la emisión total (sin Rayleigh) y del Rayleigh de segundo orden en función de la concentración de metal. De izquierda a derecha: Fe(III), Al y Cu del BS.**

Cabannis y Shuman (1986) y Ohno *et al.*, (2008) sugieren que el abordaje multidimensional permite un monitoreo integral del comportamiento de los distintos fluoróforos ante los agregados de metal, y permiten asegurar que el *quenching* observado se debe a su asociación con metales y no a fenómenos de agregación/precipitación. En nuestro caso los resultados indican que los fenómenos asociados al *scattering* a pH 3,0 son mayores que a pH 5,0 y que los informados por Ohno *et al.*, (2008) para las mismas concentraciones de Fe(III) y Al, sugiriendo que la agregación a pH ácido es mayor. En línea con la sugerencia de estos autores, la descomposición de las contribuciones relativas de los dos factores fluorescentes identificados, permite afirmar que la atenuación de la fluorescencia de F1 (utilizado en el cálculo de las constantes) no fue inducida por el incremento en la agregación de los AH dado que en todos los casos la fluorescencia de F2 se conserva prácticamente inalterada. Sumado a esto, la corrección por efectos de filtro interno permite descartar el efecto de absorción debida a la agregación.

3.4 Conclusiones

Hipótesis 1: Los ácidos húmicos de los tres sitios de muestreo BN, C y BS son similares en sus características estructurales.

Se acepta la primera hipótesis dado que los ácidos húmicos de los tres sitios de muestreo Brazo Norte, Centro y Brazo Sur son similares en sus características estructurales de acuerdo con los estudios espectroscópicos realizados.

Hipótesis 2: Los AH son de carácter autóctono

Se acepta la hipótesis acerca del origen autóctono de los ácidos húmicos de los sedimentos de Caviahue.

Hipótesis 3: No existen diferencias significativas entre los AH del lago Caviahue respecto de los de otros ambientes neutros o alcalinos.

Se acepta la tercer hipótesis debido a que la única diferencia que presentaron los ácidos húmicos aislados del sediemento de Caviahue respecto a los de otros ambientes de agua dulce neutros o alcalinos de agua dulce es el contenido de azufre sensiblemente mayor, aunque comparte esta característica con los obtenidos de sedimentos marinos.

Hipótesis 4: La capacidad de complejar metales traza de los ácidos húmicos es comparable con las halladas para ambientes circumneutros.

Se acepta la cuarta hipótesis dado que la capacidad de los ácidos húmicos de complejar hierro, aluminio y metales traza se encuentra en el mismo orden de magnitud que las halladas por otros autores para material húmico extraído de la columna de agua o los sedimentos de cuerpos de agua circumneutros, aunque para zinc y cromo fueron mayores.

Capítulo 3

Relación de *Keratococcus rhaphidioides* con materia orgánica disuelta, hierro, manganeso y aluminio. Estudio de la composición de la pared celular de *K.rhaphidioides* en busca de relaciones con su tolerancia al medio extremo.

4 Capítulo 3: Relación entre *Keratococcus rhaphidioides* y materia orgánica disuelta, hierro, manganeso y aluminio. Estudio de la composición de la pared celular de *K. rhaphidioides* en busca de relaciones con su tolerancia al medio extremo.

4.1 Introducción

Los ambientes extremos son aquellos en que alguna variable física o química como pH, contenido de sales, temperatura, etc. se aleja de la media (o mediana) mundial (Rothcshild y Mancinelli, 2001). Los organismos que habitan este tipo de ecosistemas son considerados extremófilos y el término hace referencia a la capacidad de proliferar de forma *óptima* en al menos una de esas condiciones. Las aguas del Lago Caviahue constituyen un ambiente de este tipo debido a la alta actividad de H^+ (reflejada en su bajo pH 2,0-3,0) y a la alta carga de una amplia variedad de elementos en concentraciones que exceden el umbral de protección de la vida acuática establecido en la Ley General del Ambiente, entre ellos el Fe (20 mg L^{-1}), Mn (1 mg L^{-1}) y Al (27 mg L^{-1}) (ver sección 1.1 y 2.1.1). Existen tres categorías que permiten clasificar a los organismos de acuerdo con su tolerancia a la acidez: 1) los *acidófilos extremos* poseen el óptimo de crecimiento a pH<3,0, los *acidófilos moderados* a pH entre 3,0 y 5,0 y los *acidotolerantes* a pH<5,0 aunque toleran (sobreviven) a pH menores (Johnson, 2008).

En el Lago Caviahue se han identificado ocho especies de algas que toleran el bajo pH del lago (ver sección 1) siendo *Keratococcus rhaphidioides* la especie dominante del fitoplancton (abundancia de 90%; Pedrozo *et al.*, 2001; Brankatschk, 2007; Beamud *et al.*, 2007, 2010). *K.rhaphidioides* es un alga ácidófila moderada (Schultz, inédito) con forma de medialuna y cloroplasto parietal laminar (Figura 27, A). El biovolumen promedio en el lago es de 139 μm^3 mientras que la biomasa es de 1,47 mg peso fresco L^1 (2008-2015; Baffico, inédito). Además en la Figura 27, B se muestra una micrografía electrónica de transmisión en la que se observan el

pirenoide, gránulos de almidón céreo,con borde difuso, rodeándolo parcialmente y el cloroplasto parietal.

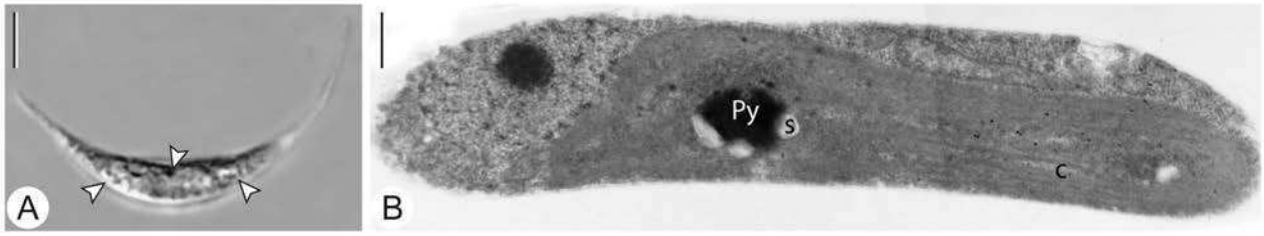


Figura 27 **Micrografías de *Keratococcus rhaphidioides*. A: micrografía óptica (las puntas de flecha señalan el cloroplasto), la barra equivale a 5 µm ; B:micrografía electrónica de transmisión en la que se indican el cloroplasto, el pirenoide y los gránulos de almidón; la barra equivale a 0,5 µm (cortesía de Sabina Schultz).**

4.1.1 Exposición a metales

La exposición a metales induce inhibición del crecimiento, síntomas de estrés oxidativo a nivel celular (en el caso de metales redox como el Fe; de Vos et al. 1992), incremento de metabolitos antioxidantes como carotenos, vitaminas C y E, glutatión reducido, fenoles, etc., enzimas detoxificantes como ascorbato peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, etc; (Hall, 2002; Pinto *et al.*, 2003; Sabatini *et al.*,. 2009; Sinha *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010), proteínas de shock térmico (Heatshock proteins, HSPs; Hall, 2002; Heckathorn *et al.* 2004; Spijkerman *et al.*, 2007), reducción de transportadores de membrana por retroalimentación negativa (en ambas direcciones) y adsorción a la pared celular y exudados (Hall, 2002). El fotosistema II (PSII) de plantas y algas es particularmente sensible al estrés inducido por metales redox y por lo tanto la fotosíntesis uno de los procesos más afectados (Heckathorn *et al*., 2004; Ikegami *et al*., 2005).

En la concentración apropiada, el Fe y Mn son co-factores de numerosas enzimas y proteínas que catalizan reacciones como la ruptura de la molécula de agua en el fotosistema II o participan en la cadena de transporte de electrones en la membrana del cloroplasto (entre muchas otras funciones), por ello su incorporación está fuertemente regulada (Blaby-Hass y Merchant, 2012). Sin embargo, en exceso inducen síntomas de estrés, pudiendo resultar letales (Sinha *et al.*, 2007; Sinha *et al*. 2009; Keller *et al.*, 2012).

En la bibliografía existen pocos registros de ensayos con concentraciones altas de Fe o Mn dado que en los ambientes circumneutros, marinos o dulciacuícolas su concentración es baja o limitante (Hudson y Morel, 1990) y los organismos acuáticos están adaptados a lidiar con su presencia (Loeffelman *et al.*, 1986; Linton *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2012). Al pH circumneutro de la mayoría de los sistemas acuáticos el Mn disuelto existe en la forma de ion libre mientras que el Fe se encuentra mayormente complejado a materia orgánica disuelta por lo que su disponibilidad es aun menor (Sunda, 1989).

Ejemplos de estudios de la respuesta de algas a altas concentraciones de Fe y Mn (>1 mg L^{-1}) se encuentran en el trabajo de Guseva (1939), Gerloff y Skoog (1957), Csatorday *et al.* (1992), Rai y Chandra (1992), Spijkerman *et al.* (2007) y Keller *et al.* (2012). El trabajo de Spijkerman *et al.* (2007) llama particularmente la atención dado que estudiaron el efecto de concentraciones muy altas de Fe (>400 mg L^{-1}) y Zn (>3 mg L^{-1}) sobre *Chlamydomonas acidophila* (aislada de un lago ácido de mina) en dos matrices distintas, por un lado el agua de estos lagos esterilizada por filtración y por otro en medio de cultivo sintético enriquecido en cada uno de los metales. Sus resultados motivaron en parte el diseño experimental del presente capítulo dado quelos autores hallaron diferencias mínimas en el crecimiento del alga en presencia de Zn, mientras que el Fe resultó en la inhibición total del crecimiento solo en el medio de cultivo, sugiriendo que la matriz del lago tiene un efecto protector ante el alto contenido de este metal.

Por otra parte, la toxicidad del aluminio ha sido extensamente estudiada en la comunidad fitoplanctónica y como en cultivos unialgales. Los umbrales de toxicidad hallados en la bibliografía describen un amplio abanico de concentraciones, variando entre algunos µg L^{-1} para *Chlorella pyrenoidosa* y 13,5 g L^{-1} para *Galderia sulphuraria* (Gensemer y Playle, 1999). Asimismo, los efectos inhibitorios resultan muy dependientes del pH (Heilwell *et al.*, 1983; Gensemer, 1991; Parent y Campbell, 1994; Rai *et al.*, 1998; Gensemer y Playle, 1999) especialmente bajo concentraciones inhibitorias a valores de pH entre 5,0 y 6,0. Algunos autores proponen que esta dependencia se debe a que la especie más tóxica del metal es $Al(OH)^{+2}$ y su máxima solubilidad se

encuentra a pH cercano a 6,0 (Heillwell et al., 1983; Gensemer, 1991; Parent y Campbell, 1994). Del mismo modo que ocurre para otros metales, la tolerancia de las algas acidófilas a altas concentraciones de este metal también ha sido ampliamente estudiada, aunque los ensayos con estas algas se realizaron generalmente al pH óptimo de crecimiento o a pH neutro, por lo no fueron expuestas al rango de mayor toxicidad informado.

En los últimos años, la síntesis y potencial utilización de nanopartículas en el tratamiento de aguas y la industria ha sido extensamente estudiada (e.g. nano Al_2O_3). Por ejemplo, Sadiq *et al.* (2011) y Pakrashi *et al.* (2013) evaluaron su toxicidad sobre *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.* y *Chlorella ellipsoidea*, hallando que las dos primeras son más tolerantes (CI_{50}~40 mg nAl_2O_3 L^{-1}) que la última (CI_{50}~1 mg nAl_2O_3 L^{-1}).

4.1.2 Modelos de toxicidad

Las algas acidófilas son extremadamente tolerantes a altas concentraciones de metales pesados (Whitton, 1970). Esto se debe a la reducción significativa de los sitios de unión en la membrana y a la baja tasa de internalización causada por la alta actividad de H^+ en las aguas ácidas (Olaveson y Stokes 1989; Gimmler *et al.*,1991; Parent y Cambell, 1994; Nalewajko *et al.* 1997). Otro mecanismo de reducción de toxicidad es el desplazamiento de metales tóxicos por metales básicos (e.g. Ca^{+2}). Cabe destacar también que en la matriz del agua ácida natural existen compuestos como $Si(OH)_4$, F^- o sustancias húmicas disueltas que poseen gran afinidad por los metales disueltos (e.g. Al, Fe, Pb o Cu) y forman complejos estables que disminuyen su reactividad y biodisponibilidad (Driscoll *et al.*, 1980; Backer y Schotfield, 1982; Birchall *et al.*, 1989).

Las observaciones mencionadas en el párrafo anterior están de acuerdo con dos modelos utilizados en la predicción de toxicidad de metales en algas y otros organismos acuáticos, el FIAM (Free Ion Activity Model o modelo de actividad de ion libre) y el BLM (Biotic Ligand Model o modelo de ligando biótico).

El FIAM es el más antiguo y fue propuesto por Morel y Hering en 1993 en base a numerosos

estudios de internalización de metales (Campbell, 1995). El modelo asume que, 1) que el intercambio con metales ocurre principalmente en la membrana celular, 2) que la interacción con la membrana puede ser descripta como un equilibrio de complejación, 3) que el fenómeno de complejación entre el metal y su transportador, y la internalización ocurren rápido de modo que pueda establecerse un pseudo-equilibrio entre el metal en solución y la superficie de la membrana, 4) que la respuesta biológica depende estrictamente de la concentración de complejos de superficie metal:ligando, 5) que en el rango de concentraciones estudiado el número de sitios ligando sobre la superficie permanece constante y que las variaciones en la concentración de complejos depende exclusivamente de la concentración de metal libre [Me^{+z}] y 6) que durante el tiempo de exposición estudiado la naturaleza de la superficie biológica permanece constante. Estas suposiciones limitan la aplicabilidad del modelo aunque sus resultados son consistentes con los resultados experimentales a pH fijo y concentración de sitios conocida (Campbell, 1995). En resumen, la dependencia de este modelo con la concentración libre de metal es alta dado que es la que moldea el equilibrio con los ligandos en la membrana.

El BLM por su parte, fue propuesto en la International Copper Association (2000) y sostiene que la concentración libre de un metal [Me^{+z}] es un parámetro necesario pero no suficiente para predecir su toxicidad debido a que su interacción con los sitios fisiológicamente activos en la membrana y pared celular de los organismos acuáticos depende también de otros factores como pH, fuerza iónica, concentración de Ca, Mg, Fe y materia orgánica disuelta (especialmente SH). Por lo tanto, la concentración de metal que más importa a la hora de predecir un efecto potencialmente tóxico es la del metal adsorbido a la superficie celular (tanto en células desnudas como con cubiertas celulares). Ma *et al.*, (2003) aplicaron exitosamente y por primera vez el modelo BLM en su estudio de toxicidad del Cu sobre *Scenedesmus subspicatus*.

4.1.3 Efecto de quelantes naturales y sintéticos

La importancia de las sustancias húmicas en los sistemas acuáticos naturales ha sido revisada en

el capítulo 2, por lo tanto aquí se hará referencia a su efecto directo sobre las algas, a su rol en la especiación de metales en solución y al resultado de esta interacción con la toxicidad.

Los reportes del efecto que tienen las SH sobre el crecimiento de microalgas y otros organismos acuáticos son muy diversos. En algunos casos se observan efectos positivos, como incrementos en la tasa de crecimiento (Prakash *et al.* 1973; Steinberg y Bach, 1996; Heil, 2005), en el contenido de clorofila (Lee y Bartlett, 1976), en la fijación de carbono (Knauer y Buffle, 2001) o en el biovolumen (Tulonen *et al.*, 1992). Además, también se han observado efectos negativos como la inhibición del crecimiento (Nielsen y Ekelund, 1993; Imai *et al*., 1999), el aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática (Vigneault *et al.*, 2000) y en la internalización de Pb (Slaveykova *et al.*, 2003; Slaveykova, 2007). Además, se han informado interferencias con el fotosistema II y disminución de la fluorescencia debido a la interacción de quinonas con los fotosistemas (Pflugmacher *et al.*, 2006), inducción intracelular (Blokhina *et al.*, 2003; Timofeyev *et al*., 2006) y extracelular de ROS (Southworth y Voelker 2003; Peng *et al.*, 2006; Page *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013).

Por otra parte, en su función quelante las SH (y los quelantes sintéticos como NTA) poseen la capacidad de reducir la toxicidad de los metales sobre la biota acuática. Ello ocurre debido principalmente a dos motivos, 1) al complejarlos fuertemente la proporción de metal libre disuelto disminuye y 2) compiten por el metal con los sitios ligando descriptos por los modelos FIAM y BLM. Este efecto ha sido comprobado por numerosos autores, entre ellos en el trabajo de Ma *et al.* (2003) en el que observaron la disminución de la adsorción de Cu sobre la pared de *Scenedesmus subspicatus* en presencia de EDTA y AF con el concomitante aumento de la sobrevida. Sin embargo, en un trabajo paradigmático Campbell *et al.* (1997) determinaron que los AF se adsorben sensiblemente sobre la pared celular de *Chlorella pyrenoidosa* (12,5 mg AF m^{-2} a pH<5,0) y que la interacción se incrementa conforme disminuye el pH. Más tarde, Slaveykova y Wilkinson (2002); Slaveykova *et al.* (2003) y Slaveykova (2007) hallaron que los AF pueden formar complejos ternarios (pared celular-AF-Pb) sobre la pared de *Chlorella kesslerii* a pH 6,0, induciendo un

aumento en la internalización de Pb de un orden de magnitud respecto de ensayos con y sin quelantes sintéticos. En base a este descubrimiento, los autores propusieron una modificación al BLM dado que la formación de los complejos ternarios posee un efecto concentrador del metal sobre la pared e implica un aumento de su biodisponibilidad.

4.1.4 La pared celular

Una técnica tradicionalmente empleada en el estudio de polisacáridos de las paredes celulares de plantas superiores es la utilización de cultivos de líneas celulares de diferentes especies (véase por ejemplo, Popper y Fry, 2005). Los estudios pioneros al respecto se iniciaron en el grupo de Peter Albersheim en los años 70, quien además observó que la composición de los exudados al medio de cultivo reflejaba la composición de las paredes celulares (Keegstra *et al.,* 1973). Del mismo modo, se puede pensar que los polisacáridos que se solubilizan en el medio de cultivo de las microalgas pueden proveer información, al menos parcial, de ciertos polisacáridos de la pared celular (Allard y Tazi, 1992). Además, esta materia orgánica liberada a la solución tendrá la capacidad ligar iones inorgánicos tanto en cultivos como en su entorno natural.

La injerencia que tiene la pared celular de las algas en la tolerancia a distintos metales se hace evidente en el rol que le asigna el BLM a los ligandos bióticos. Además, su composición es determinante en la capacidad de adsorber metales. La revisión de la bibliografía revela que el contenido de metales como Fe, Mn, Al, Pb y Cu, entre otros, asociados a la pared celular de distintas algas es muy variable. Por ejemplo, Rai y Chandra (1992) encontraron que a pH 8,0 la pared de *Hydrodyction reticulatum* puede contener 260 μmol Fe g^{-1}, 10 μmol Mn g^{-1}, 0,84 μmol Cu g^{-1}.y 1,29 μmol Pb g^{-1} de alga seca. Por su parte, Jackson y Bistricki (1995) determinaron que *Trachelomonas sp.* y *Strombomonas sp.* pueden contener hasta 10,5 mmol Fe g^{-1}, 180 μmol Mn g^{-1} y 100 μmol Cu g^{-1} de alga seca, y además hallaron que las algas más ricas en Fe adsorbido almacenaron menor cantidad de metales traza. Por último, Stevens *et al.* (2001) estudiaron el contenido de Fe, Mn y Al sobre la pared celular de *Klebsormidium rivulare* colectadas de drenajes

ácidos de mina y obtuvieron dos resultados de mayor importancia, 1) cuando la concentración de Fe en el agua es superior a 20 mg L^{-1}, este metal es el mayoritario en la pared del alga y 2) el Al se adsorbe siete veces menos que el Fe, a concentraciones equiparables de metal disuelto.

4.1.5 Objetivos

- Caracterizar el efecto que poseen en medio sintético las altas concentraciones de Fe, Mn y Al determinadas históricamente en el Lago Caviahue sobre el crecimiento, fluorescencia *in vivo*, contenido de clorofila y biovolumen de *Keratococcus rhaphidioides*.
- Determinar si existen diferencias en el efecto inducido por los metales en presencia de dos fuentes de materia orgánica quelante, NTA y ácidos fúlvicos aislados del lago.
- Estudiar la composición de la pared celular de *Keratococcus rhaphidioides*, su capacidad de adsorción de P, Fe, Al, Mn, Zn, Cu, Cr y Pb, y evaluar su rol potencial en la tolerancia a la alta concentración de estos metales.

4.1.6 Hipótesis

- No existe diferencia en la tolerancia de *Keratococcus rhaphidioides* ante la exposición de Fe, Mn y Al entre agua del lago y medio sintético conteniendo NTA y ácidos fúlvicos como fuente de materia orgánica quelante.
- La pared celular de *Keratococcus rhaphidioides* se asemeja a la de otras algas de la clase Trebouxiophyceae.
- La pared celular de *Keratococcus rhaphidioides* posee un alto contenido de ácidos urónicos y debido a ello, una gran capacidad de ligar metales.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Obtención del material de estudio

4.2.1.1 Algas utilizadas en los bioensayos

Keratococcus rhaphidioides fue aisladas del Lago Caviahue y mantenidas en cultivo axénico en medio de cultivo sintético “7L” cuya composición se muestra en la Tabla 22 (Schultz, inédito). Brevemente, el proceso de aislamiento constó de tres etapas: se sembraron inóculos provenientes de muestras de agua colectadas en el Lago Caviahue, en medios minerales diseñados para asemejar el agua del ambiente. Luego se tomaron alícuotas de los cultivos iniciales y se sembraron en placas de Petri con el mismo medio de cultivo mineral solidificado con agar (al 4%). Finalmente se aislaron colonias libres de hongos y bacterias, y se inocularon en frascos de cultivo de 50 mL conteniendo medio “7L”. Los inóculos se mantuvieron en una cámara de cultivo con una temperatura de 8°C e irradiación PAR con una intensidad de 80 µmol fotón $m^{-2}s^{-1}$.

Tabla 22 Medio de cultivo diseñado para el aislamiento y mantenimiento de *K.rhaphidioides*, y para la realización de todos los bioensayos. Entre paréntesis se aclara la concentración en µg L^{-1} de los metales enriquecidos en los bioensayos.

Macronutrientes	**Concentración (mM)**	Micronutrientes	**Concentración (µM)**
KNO_3	1	$FeCl_3$	2,6 (145)
$MgSO_4$	0,5	$ZnSO_4$	0,5
$CaCl_2$	0,25	$MnCl_2$	0,5 (27,5)
NaH_2PO_4	1	$Mo_7(NH_4)_4O_{24}$–$4H_2O$	0,07
Quelantes	**Concentración (mg L^{-1})**	H_3BO_3	24
NTA	2,5	$CuSO_4.5H_2O$	0,5
Ácidos fúlvicos	2,5	$CoCl_2.6H_2O$	0,5
		Vitaminas	**Concentración (M)**
		B12	$7,4x10^{-13}$
		Biotina	$1,5x10^{-13}$
		B1	$1x10^{-13}$

4.2.1.2 Recolección de *Keratococcus rhaphidioides* para la determinación de la composición de su pared celular

Keratococcus rhaphidioides fue recolectada del Lago Caviahue en tres estaciones del mismo año contando el tiempo a partir del primer muestreo. Las estaciones escogidas fueron invierno (*I*), primavera (*P*) y verano (*V*), y los muestreos se corresponden con los meses de Agosto de 2011, Diciembre de 2011 y Marzo de 2012. La recolección de las algas se realizó a través de la filtración de cientos de litros de agua del lago por membranas de 45 y 10 μm. El volumen retenido por la última membrana fue lavado tres veces con medio de cultivo utilizado como buffer a pH 3,0 para remover el exceso de sales sin provocar lisis celular. Dado el gran volumen de agua filtrado en cada caso, se utilizó una bomba de inmersión sumergida a dos metros de profundidad. En todos los casos, el filtrado se realizó *in situ* en los tres sitios mencionados en los capítulos uno y dos: BN, C y BS.

Debido a que la abundancia de *K. rhaphidioides* es superior al 90% (Pedrozo *et al.*, 2001; Brankatschk, 2007; Beamud *et al.*, 2007, 2010), los resultados de la composición de la pared se referirán exclusivamente a esta especie.

Finalmente, las células fueron liofilizadas y conservadas en frascos cerrados con parafilm hasta su posterior procesamiento.

4.2.1.3 Recolección de *Keratococcus rhaphidioides* para el estudio de adsorción de metales y fósforo a la pared celular

El alga fue recolectada del Lago Caviahue en Marzo de 2015 por filtración como se detalló en 4.2.1.2, exceptuando el lavado con medio de cultivo. En el laboratorio, se filtraron alícuotas de 200 mL del concentrado de agua del lago por GF/F de 0,7 μm de diámetro de poro y se secaron en estufa a 60ºC. Se obtuvieron diez filtros de los cuales cinco se lavaron con Na-EDTA 0,5 M para desorber los iones en contacto con la pared y los restantes se trataron con $NaNO_3$ 0,5 M. Las soluciones de lavado se filtraron por gravedad durante 30 minutos.

Además, se filtró por triplicado agua destilada y agua de lago (pre-filtrada por membrana de 0,2 μm) para ser utilizados como blanco. Con estos filtros se procedió del mismo modo que con los concentrados de algas.

Todos los filtros se digirieron con H_2SO_4 y H_2O_2 a ebullición (Carter, 1993), los extractos se diluyeron a 100 mL y se determinó el contenido de Fe, Mn, Cu, Cd, Pb, Cr y Zn por absorción atómica a la llama y el contenido de fósforo (Murphy y Riley 1969) y aluminio (Hatch 14290-99) por colorimetría. Finalmente, se estimó la adsorción como la diferencia entre el contenido de metal proveniente de los digestos lavados con ambas soluciones utilizando como blanco los filtros de agua de lago prefiltrada. Las diferencias se analizaron mediante ANOVA y el nivel de significación se fijó en α=0,05.

4.2.2 Bioensayos

Se realizaron tres series de bioensayos con el fin de estudiar la tolerancia de *K.rhaphidioides* a las elevadas concentraciones de los tres metales mayoritarios del lago: hierro, manganeso y aluminio, y su interacción con distintas fuentes de MO quelante: ácido nitrilotriacetico (NTA), ácidos fúlvicos aislados del lago y sin quelante, en el medio sintético “7L”. En el esquema presentado en la Figura 28 se detalla el diseño experimental de los ensayos. El pH fue de 3,0 en todos los casos ya que es el valor registrado en el lago actualmente.

NTA	Ácidos fúlvicos	Sin quelante
Control	Control	Control
Agua de lago	Agua de lago	Agua de lago
Fe 8 mg L^{-1}	Fe 8 mg L^{-1}	Fe 8 mg L^{-1}
Fe 20 mg L^{-1}	Fe 20 mg L^{-1}	Fe 20 mg L^{-1}
Al 27 mg L^{-1}	Al 27 mg L^{-1}	Al 27 mg L^{-1}
Mn 1 mg L^{-1}	Mn 1 mg L^{-1}	Mn 1 mg L^{-1}
15 días	15 días	15 días

Figura 28 Esquema del diseño experimental de las tres series de bioensayos con metales y MO.

La concentración nominal de metales se verificó por espectrofotometría de absorción atómica.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado en frascos de cultivo plásticos de 50 mL (Nunclon®) que permitieron la observación directa al microscopio invertido.

En todos los casos el volumen de medio de cultivo (o agua de lago) utilizado fue de 20 mL más 500 µL de inóculo.

4.2.2.1 Concentraciones de metales

Durante los últimos 15 años el grupo de trabajo (GECARA) realizó determinaciones periódicas de la concentración de nutrientes no metálicos como: P, N, Si y S, y metálicos como: Na, Ca, Mg, K, Fe, Mn y Al, entre otros. Las concentraciones promedio determinadas fueron las utilizadas en los bioensayos. El valor intermedio de Fe se agregó como consecuencia del registro de un valor bajo en la serie de datos.

Los tratamientos consistieron en el enriquecimiento de cada uno de los metales en el medio "7L", agregando cantidad necesaria para alcanzar las concentraciones finales. En todos los casos se realizaron simulaciones de la especiación química de todos los componentes del medio de cultivo en Visual MINTEQ 3.0 para estimar la concentración libre, de complejos inorgánicos y asociada a los quelantes de los metales estudiados.

El agua de lago fue utilizada como control transversal a todos los tratamientos dado que esta no contuvo agregado de ningún metal o fuente de MO. Además, los ácidos fúlvicos se aislaron del lago un año después de concluidos los otros bioensayos y en el transcurso de ese tiempo se observaron cambios en la tasa de crecimiento del alga en el medio sintético (Schultz y Cabrera, inédito). De esta forma, se evitó atribuir diferencias a los tratamientos cuando estas pueden deberse al estado fisiológico del alga a inocular. En todos los casos, el agua de lago se enriqueció en $N–NO_3^-$ y vitaminas para que no haya limitación.

4.2.2.2 Fuentes de materia orgánica

Dependiendo de la estación del año, la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) en el

lago oscila entre 0,3 y 3,4 mg L^{-1} (Nichela, inédito). En los bioensayos tradicionales se utilizan quelantes para mantener en solución el Fe y los metales traza dado estos pueden precipitar al pH en que comúnmente se realizan y a que se han registrado crecimientos anormales en los cultivos en que estos no han sido empleados (Schiariti *et al.,* 2004). En aguas naturales, la función quelante recae sobre las sustancias húmicas, siendo los ácidos fúlvicos (AF) la fracción disuelta predominante.

Debido a que la MO llega a ser muy baja (<0,3 mg L) se decidió estudiar la respuesta de las algas a los distintos metales con y sin MO quelante en el medio sintético. Tradicionalmente se utilizan quelantes alifáticos como NTA o EDTA que poseen tres o cuatro grupos acetato respectivamente. Debido a que, como se mencionó anteriormente, la MO quelante en los sistemas naturales está compuesta mayormente por AF, se procedió a purificar los AF aislados en la sección 3.2.2 de acuerdo con el protocolo sugerido por la IHSS. Para ello se adsorbieron en la resina hidrofóbica XAD-8 utilizando una columna cromatográfica, empleando un flujo de 0,4 mL por minuto. Luego se lavó con 500 mL de HCl 0,1M y se eluyó con NaOH 0,1M. El eluído se descationizó utilizando una resina Amberlite (H^+) y se agregó a la solución de micronutrientes y hierro.

Las concentraciones finales de quelantes en el medio de cultivo fueron:

- NTA =2,5 mg L^{-1}
- AF=2,5 mg L^{-1}

reflejando la concentración determinada en el momento en que se recolectó el agua de lago con que se realizaron los bioensayos. Los agregados, como se mencionó anteriormente, se realizaron a los tratamientos que involucraron medio de cultivo. La matriz del agua del lago no fue modificada en cuanto al contenido de MO.

4.2.2.3 Tiempos finales de los bioensayos

El tiempo final de los bioensayos se determinó en función de experiencias preliminares. Los

tiempos escogidos fueron los que permitieron cuantificar las diferencias en el crecimiento inducidas por los distintos tratamientos (Figura 28).

4.2.2.4 Cuantificación del crecimiento

El crecimiento se monitoreó a través de micrografías obtenidas en un microscopio invertido "Leica", utilizando el método desarrollado por Utermöhl (1958). La superficie del campo de la fotografía se determinó utilizando un portaobjetos graduado.

Se tomaron alícuotas de los cultivos en los días 0, 1, 3, 5, 7, 10 y 15, se fijaron en lugol-ácido acético al 5% y se colocaron en cámaras para recuento de 16 mm de diámetro. Se tomaron seis imágenes de cada réplica con un aumento de 200x.

El crecimiento se expresó de acuerdo con la ecuación,

$$C_r = \frac{(C_f - C_i)}{C_i} \quad (1)$$

donde C_r es el crecimiento relativo, C_f es número de células en el punto final del ensayo y C_i es el número de células inicial de cada tratamiento. La abundancia de algas en los inóculos se relevó individualmente debido a diferencias significativas ($p<0,0001$) en ensayos preliminares. El parámetro de crecimiento se expresó en unidades relativas (UR) dado que es adimensional.

Las tasas de crecimiento se calcularon de acuerdo con,

$$\mu = \frac{(lnC_f - lnC_i)}{t} \quad (2)$$

donde μ es la tasa de crecimiento, t es el tiempo en días, C_i y C_f el número de células inicial y final.

4.2.2.5 Biovolumen

El cálculo del biovolumen de se realizó de acuerdo con la ecuación,

$$V = \frac{d^2}{8} \cdot (2b - d + a) \cdot \left(\frac{\pi^2}{6} + 1\right) \quad (3)$$

donde V es el volumen, d es el diámetro máximo, a es la distancia entre los extremos de la

medialuna y *b* la distancia entre la línea imaginaria trazada entre los extremos y el borde opuesto en el punto de diámetro máximo (Hillebrand *et al.*, 1999; Figura 29).

Las mediciones se realizaron sobre las imágenes tomadas para recuento y el valor de volumen corresponde al promedio de entre 30 y 40 mediciones realizadas en algas seleccionadas al azar provenientes de las tres réplicas.

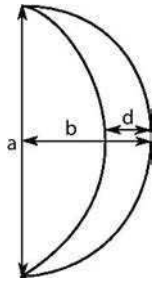


Figura 29 Esquema 2D de *Keratococcus rhaphidioides* y de las dimensiones obtenidas para el cálculo del biovolumen (imagen cortesía de Sabina Schultz).

4.2.2.6 Microscopía óptica

Se tomaron micrografías con un microscopio óptico (Olympus BX51, Japón y Zeiss Axioskope equipado con iluminación de doble contraste y cámara Olympus C5060) luego del recuento final de células con la finalidad de evaluar el efecto de los tratamientos sobre la morfología celular del alga.

4.2.2.7 Indicadores metabólicos

4.2.2.7.1 Fluorescencia *in vivo*

Al tiempo final estipulado para cada alga se realizaron las cosechas correspondientes y se tomaron mediciones de fluorescencia de la Clorofila *a in vivo* con un fluorímetro (Turner Designs) con lámpara de luz blanca y filtros de 340-500 nm para la excitación y >665 nm para la emisión. La fluorescencia fue referida *a posteriori* al número de células final de cada cultivo. Para los cultivos en los que se utilizó ácidos fúlvicos como quelante, la fluorescencia nativa de estos últimos fue restada mediante el uso de un blanco con la misma concentración de AF y metal empleada en los cultivos.

4.2.2.7.2 Extracción de clorofila *a*

Se filtraron alícuotas de 2,5 mL de cada cosecha por filtros GF/F de 0,7 µm, y se realizó una extracción con 7 mL de acetona 90% por 18 horas a 4°C. Al cabo de ese tiempo, los extractos fueron centrifugados a 4000 rpm con el fin de remover el material particulado (EPA 445.0). La fluorescencia de la clorofila *a* de los extractos se midió en fluorómetro (sección 4.2.2.7.1). La ecuación utilizada para calcular la concentración de clorofila *a* en los extractos fue,

$$[Clorofila\ a] = F\frac{r}{r-1}(R_b - R_a)\frac{V_{ext}}{V_{fil}} \quad (4)$$

donde F_s es el factor de sensibilidad del equipo, r relación entre antes y después de acidificar una solución pura de clorofila, R_b la fluorescencia antes de acidificar, R_a la fluorescencia después de acidificar, V_{ext} el volumen del extracto y V_{fil} el volumen de muestra filtrada (EPA 445.0).

Finalmente la concentración fue normalizada por célula y biovolumen.

4.2.2.8 Producción de radicales ·OH en el medio de cultivo

Para determinar la producción de radicales ·OH en el medio de cultivo, se procedió del mismo modo que para los bioensayos (detallado en esta sección) con la modificación del agregado de benceno en lugar de inocular con algas. Al cabo de 15 días se determinó la presencia de fenol en el medio de cultivo por HPLC. Para ello se utilizó un equipo HP-Waters con bomba Delta 600 y detector de arreglo de diodos Waters 2998, con una columna Phenomenex Hyperclone 5 µm ODS-C18 120A, de 250x4,6 mm. La fase móvil se preparó mezclando acetonitrilo (ACN) con un buffer acuoso a pH 3,0 (11 mM H_3PO_4 y 6,4 mM de trietilamina) en proporción 25:75 ACN:buffer. El flujo utilizado fue 1 mL mim^{-1}.

4.2.2.9 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de ANOVA para la determinación de diferencias significativas en el crecimiento entre los tratamientos con metales, biovolumen, fluorescencia y contenido de clorofila

a. Las diferencias se validaron utilizando la prueba de Tukey a posteriori. El nivel de significación se fijó en $\alpha = 0,05$. El grado de correlación de las variables se determinó utilizando la prueba de Pearson. Todos los análisis se realizaron utilizando Infostat 2014.

4.2.3 Extracción y determinación de la composición de monosacáridos de la pared celular

Las algas liofilizadas, correspondientes a los tres períodos mencionados en la sección 4.2.1.2 fueron sometidas al protocolo de extracción esquematizado en la Figura 30. Previo a comenzar la primera extracción en agua a temperatura ambiente (RT-1) el material algal se resuspendió en 20 mL de agua destilada y se sometió a ultrasonicación con pulsos de 20 segundos a una frecuencia de 20 kHz en baño de hielo a 0°C. Para ello se utilizó un sonicador de vástago Sonics & Materials Vibra Cell.

4.2.3.1 Consideraciones generales

Las evaporaciones se llevaron a cabo en evaporador rotatorio Büchi RE 111 con baño termostatizado Büchi 461 a presión reducida y temperaturas de baño no superiores a los 45 °C.

En las extracciones y fraccionamiento se utilizaron agitadores magnéticos con manta calefactora Cole–Palmer Instrument Company 4658 y Velp Scientifica ARE 15L

Las centrifugaciones se realizaron en equipos Sigma Laboratory Centrifuges 4K15C a 12000 rpm y refrigeradas a 6°C.

Las muestras en solución acuosa se liofilizaron en equipo Virtis 10–304 a presiones inferiores a los 200 militorr y temperaturas del condensador cercanas a los –55°C.

Las diálisis se realizaron a temperatura ambiente utilizando tubos de celulosa Spectrapor (corte de peso molecular 3500 Da) en sistema abierto contra agua corriente (48 h) y luego en sistema cerrado contra agua destilada (24 h).

Las determinaciones colorimétricas se realizaron por duplicado, en la región visible del espectro y medidas en un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company) empleando celdas cilíndricas.

Todos los extractos, excepto los provenientes de la extracción alcalina fuerte, se hidrolizaron mediante el método de hidrólisis total (sección 4.2.3.3.1.1) mientras que solo las correspondientes a KOH y NaOH se sometieron a la hidrólisis de polisacáridos fibrilares (sección 4.2.3.3.1.2) ya que el material fibrilar como la celulosa solo parcialmente con el primer método (Morrison, 1988).

Las cromatografías gas–líquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett–Packard HP5890 A equipado con detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno cono gas portador (flujo 1 $mL.min^{-1}$ aproximadamente), con una presión de cabeza de 15 psi y una relación de split de aproximadamente 90:1.

Los espectros de masa se efectuaron en un espectrómetro de masa Trio–2VG Masslab acoplado a un cromatrógrafo gaseoso HP–5890 A y en un equipo Shimadzu GCMS–QP 5050 A, a un potencial de ionización de 70 eV.

4.2.3.2 Métodos colorimétricos

Sobre todos los extractos (se indicarán los casos en que la muestra resultó insuficiente) se determinaron: el contenido de hidratos de carbono (HdC), proteínas y ácidos urónicos totales.

4.2.3.2.1 Determinación cuantitativa de hidratos de carbono totales (Dubois *et al.*, 1956)

Reactivos y soluciones:

- A: ácido sulfúrico en grado analítico (98%).
- B: fenol al 5% en agua destilada.

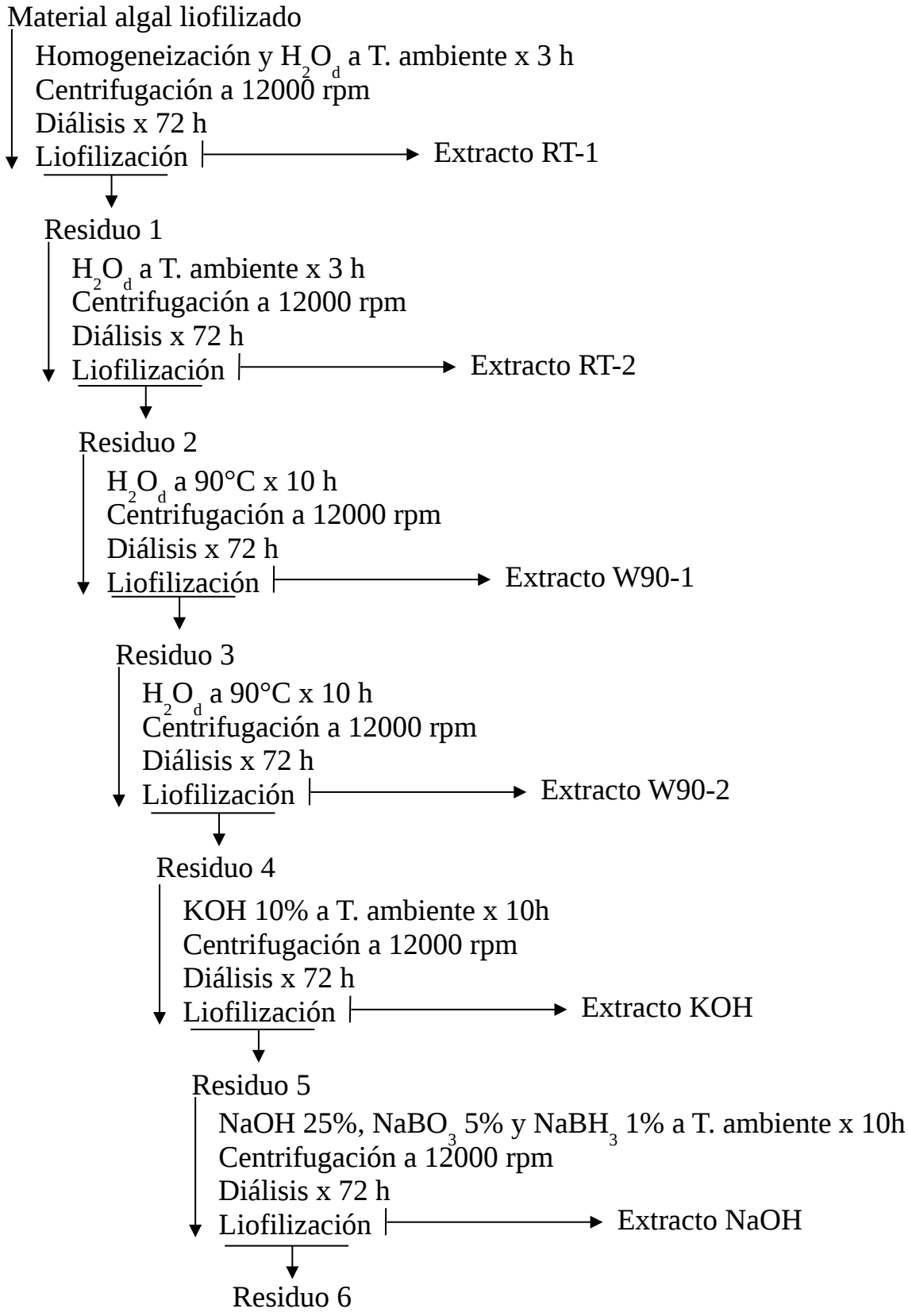


Figura 30 **Esquema de la marcha de extracción y fraccionamiento de la pared celular de *K. Rhaphidioides.* H_2O_d: agua desionizada, RT: extracto en agua a temperatura ambiente, W90: extractos en agua a 90°C, KOH: extracto en hidróxido de potasio 10%, NaOH: extracto en hidróxido de sodio 25%.**

Procedimiento: a 0,5 mL de solución conteniendo hasta 35 µg de azúcar se agregaron 0,5mL de solución B y se mezcló. Luego se dejaron caer con un dispensador 2,5 mL de A directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar el máximo calentamiento. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Los valores obtenidos se refirieron a una curva de calibración confeccionada a partir de soluciones de galactosa.

4.2.3.2.2 Determinación de ácidos urónicos totales (Fillisetti–Cozzi y Carpita, 1991)

Reactivos y soluciones:

- A: Tetraborato de sodio 0,075 M en ácido sulfúrico concentrado.
- B: m–hidroxifenilo 0,15% en NaOH 0,5%.
- C: Ácido sulfámico (como sal de potasio) 4 M (pH 1,6).

Procedimiento: Se mezclaron 0,4 mL de muestra conteniendo hasta 50 µg de ácido urónico con 40 µL de C. Luego se agregaron 2,4 mL de A y se agitó vigorosamente. A continuación se calentó a 95–100°C durante 20 minutos. Al cabo de dicho tiempo se enfrió en baño de agua–hielo a 0°C. Por último se agregaron 80 µL de B, se agitó y se dejó reposar. Luego de 10 minutos y antes de una hora se leyó la absorbancia a 525 nm.

Los valores obtenidos se refirieron a una curva de calibración confeccionada a partir de soluciones de ácido galacturónico.

4.2.3.2.3 Determinación cuantitativa de proteínas totales (Lowry *et al.*, 1951)

Reactivos y soluciones:

- A: Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0,1N.

- B: $CuSO_4.5H_2O$ al 5% en solución de tartrato de sodio y potasio al 1%.
- C: 50 mL de A + 1 mL B.
- D: Reactivo de Folin–Ciocalteu (Merck), diluido al 50% inmediatamente antes de ser usado.

Procedimiento: A 0,4 mL de solución conteniendo hasta 500 µg de proteínas por mL se agregaron 2 mL de solución C. Se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos. Al cabo de ese tiempo se agregó agitándo vigorosamente 0,2 mL de solución D. Luego de 30 minutos se leyó la absorbancia a 500 nm. (La absorbancia de la solución D debe ser inferior a 0,04).

Los valores obtenidos se contrastaron con una curva de calibración confeccionada a partir de soluciones de albúmina de suero bovino en concentraciones conocidas.

4.2.3.3 Determinación de los azúcares componentes

4.2.3.3.1 Métodos de hidrólisis

4.2.3.3.1.1 Hidrólisis ácida total (Albersheim *et al.*, 1967)

Se disolvieron 2 mg de las muestras en solución de TFA 2N en viales con tapa de teflón y se llevaron a estufa a 120º durante 90 minutos. Luego los hidrolizados se llevaron a sequedad con agregados sucesivos de agua destilada bajo corriente de aire hasta eliminación total del ácido.

4.2.3.3.1.2 Hidrólisis de polisacáridos fibrilares (Morrison, 1988)

Se disolvieron 2 mg de las muestras en TFA puro y se llevó a estufa a 37°C por 1 hora. Luego se agregó agua en cantidad suficiente hasta diluir el ácido al 80% y se llevó a estufa a 100°C por 1 hora. Finalmente se volvió a diluir hasta alcanzar una concentración de 2M y se llevó a estufa a 120ºC durante 90 minutos. Los hidrolizados se llevaron a sequedad con agregados sucesivos de agua destilada bajo corriente de aire hasta eliminación total del ácido.

4.2.3.3.1.3 Preparación de los alditoles peracetilados (Turner y Cherniak, 1981; Shea y Carpita, 1988)

A las muestras secas provenientes de las hidrólisis contenidas en los vilaes se les agregaron 0,5 mL de hidróxido de amonio 1 M y se redujeron con borohidruro de sodio (aproximadamente 5 mg) durante una noche a temperatura ambiente. Al cabo de la reducción, se destruyó el exceso de agente reductor con ácido acético glacial, agregado gota a gota hasta cese de efervescencia. El exceso de sodio se eliminó mediante intercambio con resina Amberlite IR–120 (H^+). Las muestras se filtraron para separar la resina y llevaron a sequedad bajo corriente de aire. Se eliminó el ácido bórico como borato de metilo mediante cinco agregados sucesivos de metanol, llevando a seco cada vez. Las muestras se mantuvieron en desecador de vacío durante una noche. La acetilación procedió con el agregado de anhidrido acético: piridina (1:1) en vial con tapa de teflón llevado a estufa a 100ºC durante 45 minutos. El producto peracetilado se extrajo con cloroformo:agua (2:1), lavando el extracto clorofórmico tres veces con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos veces con agua destilada. Por último se secó la muestra mediante el agregado de sulfato de sodio anhidro, se evaporó el cloroformo y se almacenó en freezer a –20°C para evitar su degradación hasta el momento de su inyección en el cromatógrafo gaseoso.

4.2.3.3.2 Análisis de los alditoles peracetilados por cromatografía gas-líquido

Los monosacáridos componentes de los polisacáridos hidrolizados fueron analizados como alditoles peracetilados utilizando una columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de espesor de fase estacionaria. Las corridas cromatográficas se hicieron en condiciones isotérmicas a 220°C, fijando las temperaturas del inyector y del detector a 240°C. La asignación de las señales se realizó mediante comparación con una mezcla estándar de monosacáridos derivatizados en idénticas condiciones a las de las muestras. La identidad de los picos se corroboró mediante cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa (CGL-EM).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Bioensayos

4.3.1.1 Modelado de las especies químicas presentes en el medio de cultivos

De acuerdo con la simulación en Visual MINTEQ el Mn estuvo mayormente como ion libre (Mn^{+2}), aunque las constantes de afinidad de AF por Mn consignadas en la base de datos del programa son bajas en comparación con los valores bibliográficos. Dado que este parámetro puede ser modificado, se reemplazó el valor de log *k* de -1,1 por 2,6 (extraído de Tipping *et al.,* 2002) y la predicción cambió notablemente ya que la proporción de metal quelado creció de <1% al 12%. Con NTA la situación fue distinta debido a que la log *k* utilizada por el programa coincide con la reportada por Anderegg (1982) luego de una intensa revisión bibliográfica. Además, otros autores reportaron que el Mn^{+2} tiene baja tendencia a formar complejos con quelantes orgánicos en ambientes con alta fuerza iónica (Sunda, 1989).

Asimismo, la mayor proporción de Fe estuvo asociada a formas inorgánicas de fósforo y no es llamativo dada la alta concentración de ortofosfato disponible en el medio de cultivo. En todos los tratamientos la especie mayoritaria fue $FeHPO_4^+$ (83% en Fe_8 y 97% en Fe_{20}) seguido de Fe-NTA (3,5%) o Fe-AF (3,1%) en los cultivos con quelante y de $FeH_2PO_4^{+2}$ (4,1%) en los cultivos sin materia orgánica. El Fe^{+3} libre estuvo en todos los casos por debajo de 1%.

El comportamiento del Al fue similar dado que un alto porcentaje del metal estuvo en formas inorgánicas (<90%). Las especies predominantes en NTA fueron Al^{+3} (50%), $AlHPO_4^+$ (29%), Al-NTA (7%) y $AlSO_4^+$ (6%) mientras que en AF fueron Al^{+3} (49%), $AlHPO_4^+$ (26%), $AlSO_4^+$ (21%) y Al-NTA (2,5%). Debido al bajo pH al que se realizó el estudio, la alta carga de Fe y Al no resultó llamativo la baja proporción de estos metales formando complejos con los quelantes orgánicos ni que la distribución global de ambos metales fuera similar.

Schecher y McAvoy (1992) modelaron las especies de Al a distintos pH y concluyeron que a

pH<4,0 el 97% del metal estaba en la forma libre (Al^{+3}). Nuestra simulación incorporó altas concentraciones de nutrientes y por ello la diferencia. A pH 3,0 las constantes de afinidad (como log *k*) de HPO_4^{-2} y SO_4^{-2} por el aluminio son aproximadamente 7,0 (Nordstrom y May, 1996). Del mismo modo, dado que la log *k* del AlF^- es de ~7,0 la proporción de la forma libre en el lago es aun menor.

4.3.1.2 Respuesta de *Keratococcus rhaphidioides* a la combinación de hierro, manganeso, aluminio con distintas fuentes de materia orgánica

NTA

El análisis estadístico del crecimiento relativo al día 15 permitió diferenciar tres grupos (p<0,0001). En primer lugar Mn y Fe_8 (5,1±0,1 UR), luego Control, Lago y Fe_{20} (2,4±0,5 UR) y por último Al (0,11 UR) (Figura 31). Del mismo modo, la tasa de crecimiento (μ, 5 días) en Mn y Fe_8 (μ=0,172) fue significativamente superior (p<0,0001) a la de Control, Lago y Fe_{20} (μ=0,016) mientras que este último grupo se diferenció de Al a partir del quinto día.

Las algas expuestas a Al no se dividieron a lo largo de todo el bioensayo. Además, hacia el día 15 se observó un alto grado de vacuolización, fragmentación del cloroplasto (similares a los evidenciados en la Figura 32, C) y la aparición de protuberancias y bifurcaciones en los extremos (Figura 32, B). El contenido de clorofila *a* por unidad de volumen (fg Clo *a* μm^{-3}) y la fluorescencia *in vivo* (URF 10^{-6} células) resultaron significativamente menores que en los otros tratamientos (p<0,0001 y p=0,0004, respectivamente), reflejando el estrés inducido por este metal (Figura 33). Sin embargo, la similitud entre la medición inicial y final de fluorescencia reveló que no hubo degradación significativa del pigmento.

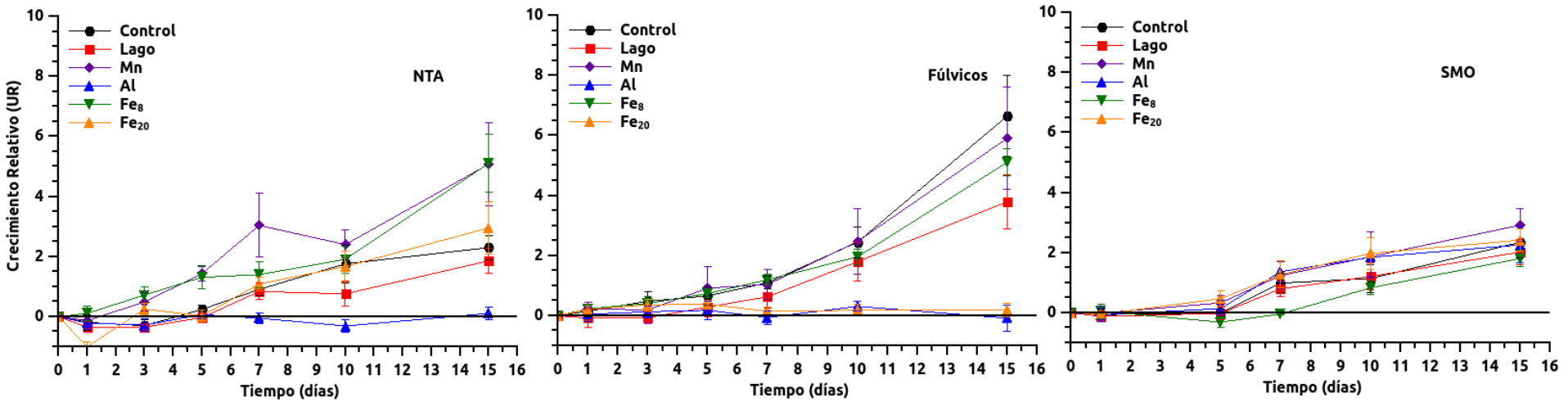


Figura 31 Crecimiento relativo al inóculo inicial de *K. rhaphidioides*, para los días 1, 3, 5, 7, 10 y 15. De izquierda a derecha se encuentran los gráficos de los ensayos con NTA, AF y SMO.

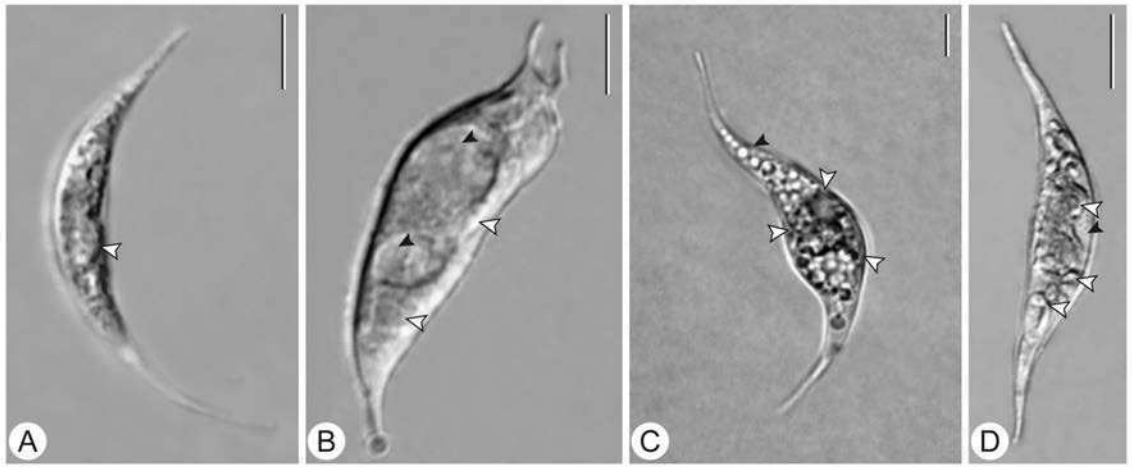


Figura 32 Micrografías de *K.rhaphidioides*. A: Control; B: Al-NTA, C: Fe-AF; D: Al-AF. Las puntas de flecha blancas indican el cloroplasto mientras que las negras señalan vacuolas.

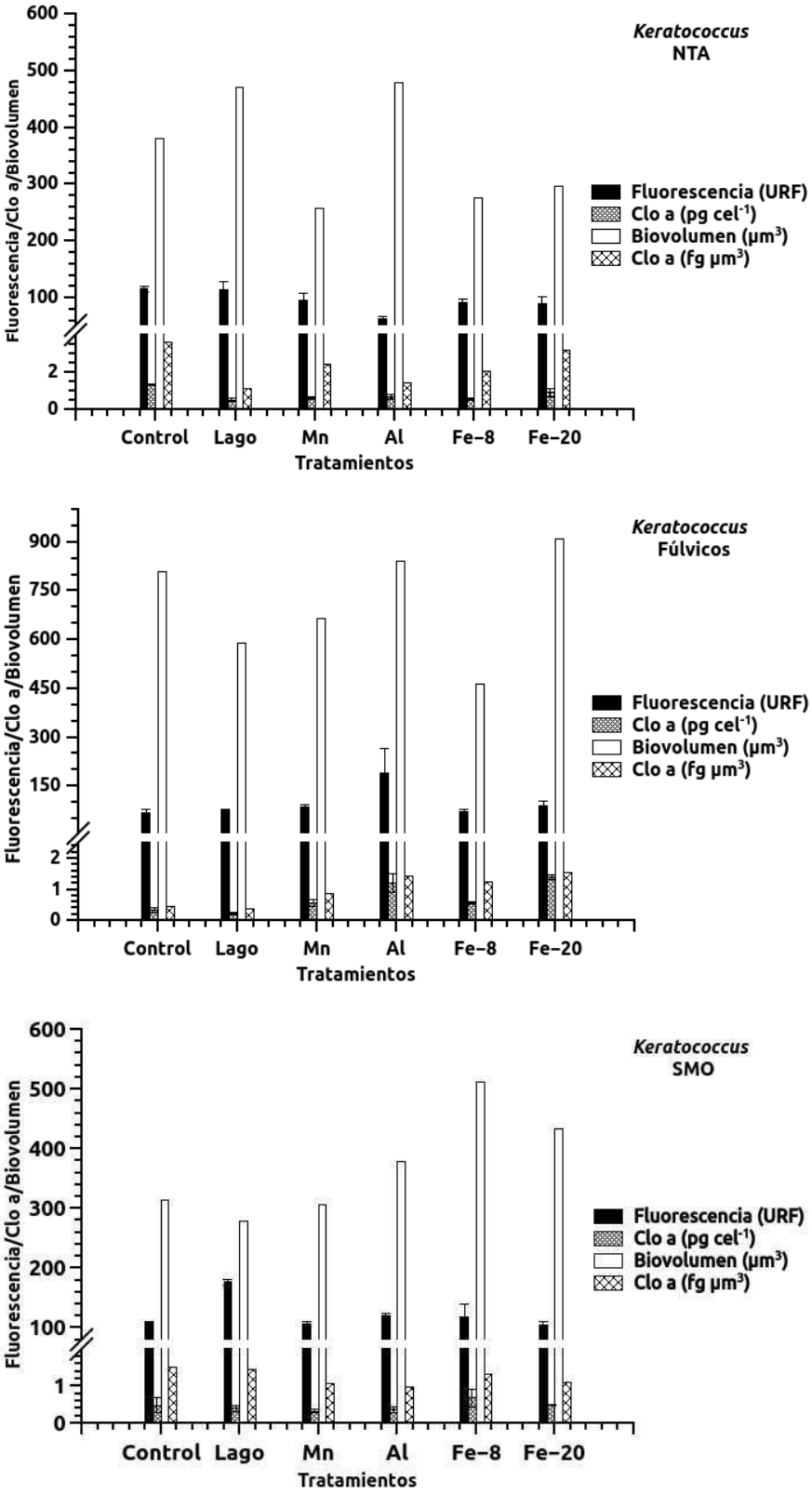


Figura 33 Fluorescencia *in vivo* (10^6 células), concentración de clorofila por célula y μm^3, y biovolumen de *K.rhaphidioides* con NTA, AF y SMO.

Por otra parte, el biovolumen fue máximo en las algas cultivadas en agua de lago y Al (470 y 480 μm^3 respectivamente), mientras que el control tuvo un valor intermedio (380 μm^3), y Mn, Fe_8 y Fe_{20}

tuvieron las células más pequeñas (276±19 μm^3). Los tratamientos con mayor tasa de división celular presentaron individuos de menor tamaño y que esta tendencia fue directamente proporcional a los valores de fluorescencia *in vivo* (Figura 33).

En los cultivos con Fe_{20} se detectó parte del metal precipitado en forma de óxidos anaranjados adheridos a la pared las algas, uniéndolas como eslabones en una cadena. Luego, del tratamiento con el fijador (lugol/acético), el precipitado se desprendió de las paredes y se depositó en el fondo de las cámaras de recuento. Los óxidos de hierro extraen otros elementos de la solución por co-precipitación y además adsorben grandes cantidades de fósforo. Cabe señalar que la diferencia de crecimiento en comparación con Mn y Fe_8 puede deberse a la disminución de nutrientes disueltos y/o de su biodisponibilidad (Gerhardt y Westermann, 1995). A pesar de ello, este fenómeno no resultó tóxico dado que su crecimiento no difirió significativamente del control o del agua de lago.

Ácidos fúlvicos

En el punto final del bioensayo con ácidos fúlvicos (AF) se formaron dos grupos mediante contrastes ($p<0,0001$). Por un lado, las algas de Control, Mn, Fe_8 y Lago (5,46±1,1 UR) que respondieron positivamente a los tratamientos y por otro Al y Fe_{20} (0,05±0,19) donde no hubo división celular (Figura 31). Es destacable que tanto si se analizan los perfiles de crecimiento a lo largo de todo el ensayo o si se aplica un contraste puntual, las diferencias entre Lago y el resto de los tratamientos del primer grupo se tornan significativas ($p>0,0001$; $p>0,0013$). Esto no ocurrió en el punto final debido que el bajo rendimiento en una réplica de Mn aumentó la fuertemente la varianza. Se considerará que el crecimiento en los tres tratamientos fue mayor que en Lago.

La tasa de crecimiento (μ, 5 días) de las algas en Control, Mn y Fe_8 (μ=0,113) resultó significativamente superior ($p=0,019$) que en Al, Fe_{20} y Lago (μ=0,049), aunque este último respondieron creciendo activamente a partir del tercer día.

La combinación de Al-AF y Fe_{20}-AF resultó tóxica para *K.rhaphidioides* del mismo modo que Al-NTA y a diferencia de lo ocurrido en Fe_{20}-NTA, el hierro no precipitó. Las algas sometidas a

estos tratamientos se mostraron igualmente vacuolizadas, con el cloroplasto fragmentado y replegado hacia el centro de la célula (Figura 32, C y D). Además, estos tratamientos también indujeron las células más grandes (840 y 910 μm^3 respectivamente) seguidas de las algas en Control (800 μm^3), Lago, Mn y Fe_8 (573±100 μm^3) (Figura 33). Si bien se observó la misma tendencia que en NTA, el biovolumen en AF fue del doble para todos los tratamientos excepto en agua de lago.

La fluorescencia *in vivo* por célula en Al fue significativamente superior que en el resto de los tratamientos ($p=0,0043$; Figura 33) y del mismo modo que en NTA, no se registraron diferencias entre los valores inicial y final mientras que en Fe_{20} se observó una disminución del 50% ($p<0,0001$). La diferencia en la fluorescencia por célula entre Al-AF y Al-NTA (64 y 192 URF 10^{-6} células) se debió a las condiciones iniciales de los inóculos. Por otra parte, el contenido de clorofila (por célula y biovolumen) también resultó mayor para las algas afectadas por Al y Fe_{20} ($p<0,0001$), sugiriendo una disminución en la concentración relativa del pigmento en Control, Mn, Lago y Fe_8 respecto del inóculo inicial (Figura 33).

Sin materia orgánica (SMO)

En el ensayo sin fuente de MO quelante las algas de Al, Mn y Fe_{20} comenzaron su crecimiento desde el día uno ($\mu=0,053$) mientras que en Control, Lago y Fe_4 respondieron luego del quinto día ($\mu=0,003$). De todos modos, el crecimiento final fue similar para todos los tratamientos (2,44±0,32 UR; $p<0,05$) aunque Mn estuvo levemente por encima del resto (Figura 31). En todos los casos las algas mostraron características estructurales conservadas excepto por el mayor biovolumen en Fe_8 y Fe_{20} (47% superior; Figura 33) y una muy baja frecuencia de células con deformaciones similares al alga en la Figura 32-B.

La fluorescencia *in vivo* resultó marcadamente superior en las algas de Lago (176 URF; $p<0,0001$) mientras que para los tratamientos restantes se formó un grupo homogéneo (112±7 URF). Sin embargo, no se hallaron diferencias en el contenido de clorofila *a* ($p>0,05$ para ambas estimaciones).

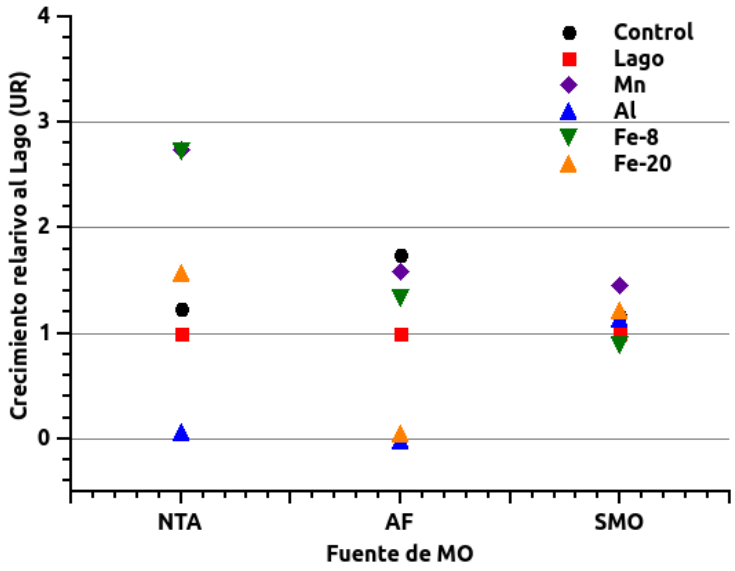


Figura 34 **Crecimiento de *K.rhaphidioides* en todos los tratamientos relativos al Lago.**

Tanto en poblaciones naturales como en cultivos de microalgas ocurren mutaciones espontáneas preselectivas (Costas *et al.*, 1998; Costas *et al.*, 2001; Rodriguez y Velez, comunicación personal), que provocan la adquisición o pérdida de la tolerancia a una sustancia tóxica sin presión selectiva. Por otra parte, se mencionó en la sección 4.2.2.4 que el estado fisiológico del alga inoculada puede condicionar la respuesta a los mismos tratamientos en bioensayos realizados a tiempos distintos. Debido a ambas observaciones se decidió normalizar el crecimiento de todos los cultivos al de agua de lago (Figura 34) y de este modo evitar inferencias erróneas acerca del efecto provocado por un metal o fuente de MO.

Efecto de los ácidos fúlvicos

La presencia de AF en el medio de cultivo indujo distintas respuestas dependiendo del metal enriquecido. En primer lugar, la combinación con Al y Fe tuvo un efecto inhibitorio del crecimiento que será discutido *in extenso* más adelante. En segundo lugar, la interacción con el medio de cultivo basal (Control), con Mn y con la concentración de Fe más baja provocó un leve aumento en el crecimiento respecto del tratamiento en agua de lago. Además, indujo un aumento marcado en el biovolumen de todos los tratamientos, un efecto ya observado por Tulonen *et al.* (1992) (tanto en los que el efecto fue positivo como en los que resultó negativo).

Efecto del manganeso

Retornando nuevamente a la Figura 34 (y Figura 31) se observa que con NTA, el Mn tuvo un efecto significativamente positivo sobre el crecimiento dado que sin quelante todos los tratamientos respondieron del mismo modo que en Lago mientras que en AF solo se diferenciaron levemente de Control (siendo este último el medio más prolífico). La tasa de crecimiento en este metal sugiere el mismo patrón, indicando que su combinación con NTA resultó más beneficiosa. En contraste, Gerloff y Skoog (1957) observaron que 2 mg L^{-1} Mn resultaron tóxicos para *Microcystis aeruginosa* en medio de cultivo sintético con bajas concentraciones de Ca y Fe, aunque este efecto se revirtió con el enriquecimiento de estos metales. En contraste, la misma concentración de Mn en el agua de lago del que aislaron el alga no indujo efectos deletéreos sugiriendo que esta matriz compleja amortigua la toxicidad del metal. Del mismo modo, Guseva (1939) observó que luego de una inundación del reservorio Uchinskii (Rusia) el alto contenido de Mn disuelto resultó tóxico para el fitoplancton, mientras que Csatorday *et al.* (1992) describieron inhibición en la síntesis de clorofila en cultivos de *Anacystis nidulans* con concentraciones de 2 mg L^{-1}. Por su parte, Rai y Chandra (1992) realizaron ensayos *in vitro* con el alga verde *Hydrodictyon reticulatum* y hallaron que 5 mg L^{-1} de Mn disueltos indujeron una reducción en la biomasa y el contenido de clorofila del 52% y 41% respectivamente. Asimismo, determinaron que 10 mg L^{-1} de Fe provocaron una disminución de 21% en la biomasa del alga y de 37% en la concentración de clorofila. Cabe destacar que la menor tolerancia de las algas mencionadas puede deberse a que ninguna de ellas está adaptada a las concentraciones presentes en Caviahue, como podría suponerse de *K.rhaphidioides.*

Una posible explicación para el aumento significativo en el crecimiento únicamente con NTA es que la presencia de complejos metal:quelante favorezca la movilidad del metal a través de la pared celular del alga. En un estudio que se discutirá en la sección 4.3.2.5 en el lago la adsorción de Mn a la pared de *K.rhaphidioides* no es significativa.

Efecto del aluminio

Del análisis de la Figura 34 (y la Figura 31) llama la atención que el Al resultó toxico para

K.rhaphidioides únicamente en presencia de quelantes orgánicos.

El efecto tóxico del aluminio se destaca por reducciones drásticas en la tasa de crecimiento o el mantenimiento de la biomasa (como peso seco) mientras que la eficiencia cuántica (medida como inducción de la clorofila *a*) y la incorporación de nutrientes son menos sensibles (Al-Hamdani, 1997; Rai *et al.*, 1998; Sadiq *et al.*, 2011; Pakrashi *et al.*, 2013; Bagnoud-Velásquez *et al.*, 2014). Asimismo se registraron alteraciones en la morfología de las células que incluyen aumento de tamaño en *Monoraphidium griffithii, Monoraphidium dybowskii* y *Stichococcus sp.;* disminución en *Asterionella ralfsii* y aberraciones como la aparición de cuernos, bifurcaciones, ondulaciones en la membrana celular, vacuolización y fragmentación del cloroplasto o de la membrana tilacoidal cuando la concentración es muy elevada (Törnqvist y Claesson, 1983; Sacan *et al.*, 2007; Pakrashi *et al.*, 2013).

Las algas acidófilas como *K.rhaphidioides* son muy tolerantes a la exposición a Al. Por ejemplo, la concentración necesaria para inducir la reducción del 50% del crecimiento en *Dunalliela acidophila* es mayor a 270 mg L^{-1} a pH 1,0 y mayor a 135 mg L^{-1} a pH 7,0, en *Chlamydomonas acidophila* mayor a 20 mg L^{-1} a pH 3,0, en *Cyanidium caldarium* de 13,5 g L^{-1} a pH 3,0 y en *Chlorella saccarophila* de 25 mg L^{-1} a pH 3,0. Asimismo, las algas acidotolerantes también poseen umbrales de toxicidad altos, como por ejemplo *Euglena gracilis* (>20 mg L^{-1}; pH 3,0) o *Dunaliella parva* (270 mg L^{-1}; pH 1,0 aunque a pH 5,0 la IC_{50} es de 1 mg L^{-1}) (Gimmler *et al.*, 1991; Fölsom *et al.*, 1996; Yoshimura *et al.*, 1999; Perreault *et al.*, 2010). Sin embargo, algunos autores han sugerido que la especie más tóxica de este metal es el hidróxido soluble $Al(OH)_2^+$, que ocurre a pH~6,0 (Gensemer, 1991; Riseng *et al.*, 1991; Parent y Campbell, 1994) y está de acuerdo con los valores más bajos de concentración inhibitoria descriptos para las algas no acidófilas.

Por otra parte, Hörnström *et al.* (1995) estudiaron el efecto de 0,4 a 2 mg Al^{+3} L^{-1} en medio sintético sin y con agregados de agua de un lago húmico sobre el crecimiento de *Monoraphidium dybowskii,* y hallaron esta combinación indujo una disminución del efecto tóxico del metal pH 4,8 mientras que exacerbó el efecto deletéreo a pH 6,8. Este reporte es el único hallado en la

bibliografía que determina que la presencia de sustancias húmicas puede incrementar la toxicidad del aluminio.

Una posible explicación de la respuesta de *K.rhaphidioides* a aluminio en los bioensayos es que los complejos Al-NTA (1,9 mg L^{-1}) y Al-AF (0,7 mg L^{-1}) se encuentren adsorbidos sobre la pared del alga aumentado la biodisponibilidad del metal mientras que la forma libre (Al^{+3}) se liga en mucho menor proporción.

En favor de esta hipótesis Parent y Cambell (1994) hallaron significativamente menos Al^{+3} adsorbido sobre la pared de *Chlorella pyrenoidosa* a pH 4,3 (8 μg Al^{+3} m^{-2}) que a pH 4,6-6,0 (67 μg Al^{+3} m^{-2}) y sugirieron que cambios en las log *k* de los ligandos bióticos y en el potencial de membrana que limitan la interacción a mayor actividad de H^{+}. La misma hipótesis fue propuesta por Stokes (1986) y Gimmler *et al.* (1991) para explicar la tolerancia de los organismos acidófilos a altas concentraciones de metales potencialmente tóxicos mientras que posteriormente Gimmler (2001) demostró una relación inversamente proporcional entre el aumento del potencial Z en la pared de los organismos y una disminución en el *binding* de metales a pH<3,0.

Por su parte, Yoshimura *et al.* (1999) encontraron entre 15 y 32 μg Al^{+3} g^{-1} adsorbidos sobre la pared del alga acidófila *Cyanidium caldarium* cultivada en medio artificial (pH 2,0) conteniendo entre 2,7 y 13,5 g Al L^{-1} respectivamente, indicando un coeficiente de partición muy bajo.

Estudios más recientes indican que los ácidos fúlvicos y húmicos se adsorben fuertemente a la pared celular algas verdes como *Scenedesmus subspicatus, Chlorela kesslerii, Pseudokirchneriella subcapitata* y *Selenastrum capricornutum* (Campbell *et al*., 1997; Vigneault *et al.*, 2000; Knauer y Buffle, 2001; Slaveykova *et al.*, 2003; Slaveykova y Wilkinson, 2005; Vigneault y Campbell, 2005; Slaveykova, 2007; Lamelas y Slaveykova, 2007). Esta interacción es significativamente mayor a pH<5,0 llegando a valores de adsorción de 12,5 mg AF m^{-2} sobre *Chlorella pyrenoidosa* (pH 5,0; Campbell *et al.*, 1997) o 2 mg AF m^{-2} sobre *Chlorella kesslerii* (pH 6,0; Slaveykova *et al.*, 2003) desde una solución con 14 mg AF L^{-1} disueltos. Además, Slaveykova *et al.* (2003) determinaron que la adsorción de AF y Pb-AF sobre *C.kesslerii* no difiere y que la internalización de este metal es un

orden de magnitud mayor en presencia del quelante natural (Slaveykova y Wilkinson, 2002). Estas experiencias se realizaron sobre cultivos maduros con abundancias superiores a las determinadas en esta tesis y en tiempos no mayores a 60 minutos. En una variante del modelo experimental utilizado por Slaveykova *et al.* (2003), Slaveykova (2007) determinó que la adsorción es inversamente proporcional al número de células en cultivo. Finalmente, Vigneault *et al.*, (2000) observaron que la presencia de AF y AH en el medio de cultivo a pH 5,0 incrementa la permeabilidad de la membrana celular de *Selenastrum capricornutum* a fluoresceína diacetato en su forma no iónica. En otro trabajo del mismo grupo, Parent *et al*. (1996) determinaron que la toxicidad del aluminio está directamente relacionada con el incremento en la permeabilidad de la membrana (aunque a pH circumneutro el efecto de concentraciones crecientes de AF revirtió parcialmente el efecto tóxico). Estos trabajos puntualizan la evidencia de que la pared celular de las algas interactúa fuertemente con la materia orgánica natural y que el resultado depende del pH.

El recubrimiento de AF propuesto es tres órdenes de magnitud mayor que el de Al^{+3} determinado sobre la misma superficie (*C.pyrenoidosa*; Parent y Campbell, 1994) e implica que la exposición de las algas a una solución pre-equilibrada de Me-AF (como la utilizada en esta tesis) representaría un aumento drástico en la disponibilidad de aluminio.

En contraste, existen numerosas descripciones del efecto atenuador de NTA, EDTA, AF, AH o MON en la toxicidad de metales como Al, Cu, Pb, Cd, Ni, Ag, etc. (Morris y Russell, 1973; Sunda, 1975; Sunda y Lewis, 1978; Spencer y Nichols, 1983; Rai y Raizada, 1985; Riseng *et al.*, 1991; Florence *et al.*, 1992; Schiariti *et al.*, 1994; Campbell, 1995; Campbell *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Gledhill *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2003; Koukal, *et al.*, 2003; Slaveykova *et al.*, 2003; Sabatini *et al.*, 2009; Shahid *et al.*, 2012; entre otros). Resumiendo, a pH circumneutro la combinación entre bajas tasas de adsorción de MOD sobre las paredes celulares de las algas y disminución de la concentración libre de metales potencialmente tóxicos (e.g. Cu^{+2}, Al^{+3} o Pb^{+2}) como describe el modelo FIAM, explican el efecto atenuador observado en los trabajos citados mientras que a pH bajos la adsorción significativa de MOD sobre la pared de organismos implicaría un efecto

concentrador, aumentando la biodisponibilidad de los metales de acuerdo con la modificación al modelo de ligando biótico (BLM) propuesta por Slaveykova *et al.* (2003) y Slaveykova (2007). Esta variante consiste en que las predicciones de toxicidad realizadas en base a este modelo deberían ponderar los complejos ternarios formados por SH-Me-pared celular y no únicamente el metal adsorbido a los sitios ligando propios del alga como propone el modelo originalmente. Sin embargo, este fenómeno es dependiente del metal, el alga y la sustancia húmica (Campbell *et al.*, 1997; Knauer y Buffle, 2001; Slaveykova *et al,*, 2003; Slaveykova y Wilkinson, 2005; Vigneault y Campbell, 2005).

Efecto del hierro

Entre los autores que ensayaron concentraciones del metal comparables con las utilizadas en esta tesis, Rai y Chandra (1992) determinaron una disminución significativa en crecimiento de *Hydrodyction reticulatum* (como rendimiento en peso seco) concomitante con el aumento de Fe entre 0,1 y 10 mg L^{-1}, siendo del 27% respecto del control en el último caso.

Más recientemente, Spijkerman *et al.* (2007) ensayaron concentraciones de Fe comparables con las halladas en lagos ácidos de minas (e.g. Lago 111 o 107, Alemania) sobre *C.acidophyla* y hallaron que fuera de la matriz del lago ácido *C.acidophyla* no creció en ninguno de los tratamientos a lo largo de 14 días de ensayo, mostrando además menor contenido de clorofila *a* por célula que las algas crecidas en agua de lago. La respuesta negativa del alga fue relacionada con el engrosamiento mucilaginoso de la pared celular y con el alto contenido de Fe internalizado (0,2 pg cel^{-1} en el lago y 15,5 pg Cel^{-1} en el medio).

Por su parte, Keller *et al.* (2012) al comparar la toxicidad de nanopartículas de Fe_0 (Zero Valent Iron, nZVI) con la de Fe^{+2} y Fe^{+3} disueltos hallaron que el alga verde *P.subcapitata* tolera concentraciones de hasta 0,4, 10 y 25 mg L^{-1} respectivamente, mientras que el umbral de toxicidad para la Prymnesiophyceae *Isochrisis galbana* fue de 3 mg ZVI L^{-1} y mayor a 50 mg Fe L^{-1} disuelto. Sus resultados indicaron que el Fe_0 resultó muy tóxico y ello se debe a que induce la producción de radicales libres a nivel celular causando disrrupción de membranas, daño a proteínas, clorofila e

incluso ADN (Kim *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2012) mientras que las formas disueltas Fe^{+2} y Fe^{+3} son más tolerables aunque a concentraciones altas provocan el mismo efecto (Linton *et al.*, 2007; Sinha *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2012).

K.rhaphidioides respondió positivamente a todas las concentraciones de Fe ensayadas en presencia de NTA, induciendo un crecimiento 2,5 veces mayor en combinación con la concentración más baja (Fe_8), y levemente mayor que Control y Lago cuando el contenido de Fe fue el más alto (Fe_{20}; Figura 34). Análogamente a lo que ocurrió con Mn, la presencia de NTA al pH bajo ensayado puede estar aumentando la disponibilidad de este metal y por ello se observan efectos tan marcados.

El marcado efecto positivo sobre el crecimiento inducido por la combinación de Fe (o Mn) y NTA no se observó en presencia de AF. En este caso, la combinación con la concentración Fe_8 solo tuvo efectos sobre el biovolumen, mientras que con Fe_{20} provocó un efecto inhibitorio del crecimiento. Este último tratamiento fue el único en que la fluorescencia *in vivo* disminuyó (50%) respecto del inóculo inicial, indicando la posibilidad de daño oxidativo.

Dos hipótesis permiten explicar este fenómeno y ambas se relacionan con la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs). La primera es que la combinación de materia orgánica natural con grupos aromáticos como quinonas y catecoles (Paciolla *et al.*, 1999) indujera la producción de radicales oxidrilo (·OH) por efecto Fenton o foto-Fenton en presencia de hierro. De acuerdo con Paciolla *et al*. (2002) las reacciones involucradas en este proceso son,

$$Fe(III)+\cdot SH \rightarrow Fe(II)+SH^{+} \quad (5)$$

$$Fe(II)+O_2 \rightarrow Fe(III)+\cdot O_2^{-} \quad (6)$$

$$2\cdot O_2^{-}+2\,H^{+} \rightarrow O_2+H_2O_2 \quad (7)$$

$$Fe(II)+H_2O_2 \rightarrow Fe(III)+OH^{-}+\cdot OH \quad (8)$$

en ausencia de radiación lumínica o H_2O_2 exógena, aunque estas aceleran el proceso ampliando el la reserva de SH (reducida) o reduciendo directamente el Fe(III) (Westerhoff *et al.*, 1999; Lindsey y Tarr, 2000; Paciolla *et al.* 2002; Page *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013). La esquematización de este proceso se muestra en la Figura 35.

La producción de radicales ·OH debida a reacciones tipo Fenton o foto-Fenton en sistemas artificiales conteniendo sustancias húmicas (AF o AH), distintas fuentes de Fe y H_2O_2 ha sido ampliamente estudiada en los últimos años (Miller *et al.*, 2013). Recientemente, se ha comprobado la producción de radicales oxhidrilo sin agregado de H_2O_2 en sistemas irradiados y sin irradiar (ecuaciones 5 a 8). Algunos trabajos que emplearon concentraciones comparables a las de ambientes naturales son: la reacción entre AF y ferrihidrita (Southworth y Voelker, 2003), AH, *C.vulgaris* o *Anabaena cilindrica* y Fe^{+3} disuelto (Peng *et al.*, 2006), AH reducidos y Fe^{+2} disuelto o AF y Fe^{+2} disuelto (Miller *et al.*, 2013). Peng *et al.* (2006) determinaron además que el proceso es exacerbado conforme aumenta la abundancia de algas mientras que en los otros trabajos encontraron una relación lineal entre el aumento de Fe^{+2} disponible y la oxidación de compuestos orgánicos.

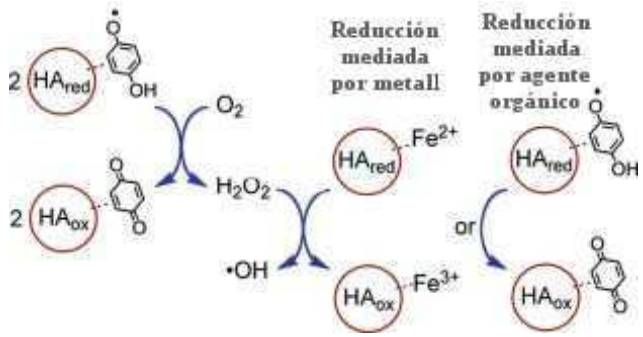


Figura 35 **Esquematización de la producción de radicales H_2O_2 y ·OH mediada por quinonas presentes en SH y Fe^{+2} (tomado de Page *et al.*, 2012).**

Esta hipótesis motivó el estudio de la generación de radicales ·OH en las condiciones de cultivo empleadas en esta tesis. Para ello se siguieron los mismos pasos que en la preparación del bioensayo reemplazando la inoculación con al alga por el agregado de benceno (sonda de radicales ·OH) al límite de su solubilidad. Al cabo de 15 días se detectó por HPLC la presencia de trazas fenol sugiriendo que la generación de estos radicales oxidantes se produce en las condiciones ensayadas. En la Figura 36 se muestran los cromatogramas y espectros de absorbancia de fenol puro (arriba) y de una muestra conteniendo AF y Fe disueltos (abajo). En ambos casos las flechas conectan dos picos con tiempos de retención ligeramente distintos (la temperatura ambiente difirió abruptamente entre ambas determinaciones) aunque con el mismo espectro de absorbancia, el del fenol. Sin embargo, la presencia de este radical se observó también en ausencia de Fe indicando que los AF

extraídos del lago contienen una porción de metal residual posiblemente formando complejos no disociados en los lavados con HCl 1M. Como se mencionó en el capítulo 2, existe una fracción de Fe remanente que no puede ser eliminada en el proceso de purificación (Knicker, comunicación personal).

En suma, la observación radicales ·OH en el medio de cultivo sin algas realizada en esta tesis, la determinación del incremento en la producción de radicales debido a reacciones tipo Fenton en presencia de *C.vulgaris* (Peng *et al.*, 2006), el efecto de adsorción sobre la pared celular descripto para distintos AF (Campbell *et al.*, 1997), el aumento en la permeabilidad de la membrana inducido sobre *S.capricornutum* (Vigneault *et al.*, 2000) y la capacidad intrínseca de los AF de reducir el Fe(III) a Fe(II) (Paciolla *et al.*, 2002) dan fuerza a esta hipótesis.

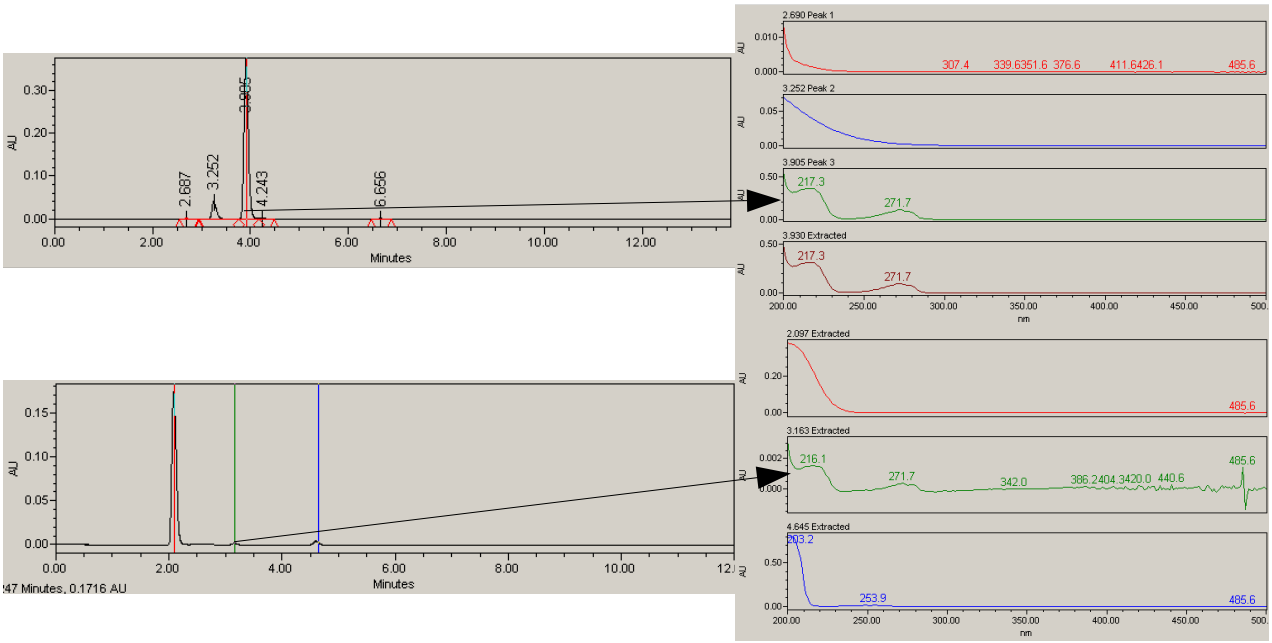


Figura 36 **Cromatogramas de Fenol puro (arriba) y de una muestra con 2,5 mg AF L^{-1} y 20 mg Fe L^{-1}.**

Por otra parte, una segunda interpretación del efecto tóxico observado es posible y está basada en un posible aumento en la internalización de Fe. Este metal tiene la capacidad de inducir la producción de EROs en el citoplasma u organelas como mitocondrias y cloroplastos (Linton *et al.*, 2007; Sinha *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2012) con el concomitante daño oxidativo.

En estudios de supervivencia de *Escherichia coli* expuesta a nanopartículas de Fe_0 (nZVI) y Fe^{+2}

disuelto, Kim *et al.* (2010) hallaron la presencia de especies radicalarias en el protoplasma de las bacterias (presumiblemente ·OH y Fe(IV)) por medio de ensayos de fluorescencia empleando 3'-*p*-aminofenil fluoresceína y 3'-*p*-hidroxifenil fluoresceína. El efecto provocado por nZVI fue más evidente aunque ambas formas de Fe indujeron disminución de la sobrevida. Los autores concluyeron que la diferencia se debió a que la alta afinidad de las nanopartículas por la pared celular bacteriana generó un efecto concentrador similar al propuesto para los AF sobre *K.rhaphidioides*, aunque los autores no determinaron si las especies radicalarias se generan en la vecindad de la membrana celular de la bacteria o dentro del protoplasma, debido al ingreso del metal y a la generación de EROs en cantidades no amortiguables por las defensas antioxidantes.

Asimismo, estudios sobre la macrofita *Bacopa monnieri* demostraron un alto grado de correlación entre la tasa de internalización de Fe, el aumento de indicadores de daño oxidativo (como peróxidos lipídicos), del contenido citoplasmático de especies antioxidantes y de enzimas detoxificantes tanto en tejido foliar como de raíz (Sinha *et al.*, 2007).

Debido a la alta carga de hierro ensayada y al posible incremento en la permeabilidad de la membrana inducida por los AF, es posible que la captación de Fe se incremente por encima de su umbral de toxicidad, induciendo la producción de especies reactivas del oxígeno por encima de su capacidad detoxificante. Esta interpretación es más factible si se tiene en cuenta que una concentración alta de Fe_8 no tuvo el mismo efecto negativo sobre el crecimiento de las algas que Fe_{20}, indicando que en presencia de AF el umbral de toxicidad de este metal se encuentra entre ambas concentraciones ensayadas mientras que en su ausencia se encuentra por encima de la más alta.

Las dos hipótesis planteadas no son necesariamente contrapuestas, siendo lo más probable que la toxicidad inducida por el alto contenido de Fe se deba a un efecto sinérgico de ambos fenómenos. Para su confirmación será necesario estudiar minuciosamente la producción intra y extracelular de radicales libres.

4.3.2 Pared celular de *K. Rhaphidioides*

4.3.2.1 Extracción de polisacáridos de la pared celular de *K.rhaphidioides*

De la marcha de extracción se obtuvieron cinco fracciones: RT–1+2, W90–1 y 2, KOH y NaOH (Figura 30), con los rendimientos indicados en la Tabla 23. Los extractos de agua a temperatura ambiente se reunieron en un único extracto, RT. Por otra parte, las fracciones RT y W90–1 mostraron un precipitado insoluble al ser sometidas a diálisis exhaustiva que se separó previo a la liofilización, obteniéndose una fracción soluble (S) y otra precipitada (P).

Tabla 23 Rendimientos de extracción, informados como porcentaje de la masa algal inicial, de las cinco fracciones con sus sub–fracciones solubles (S) y precipitadas (P). En los casos en que no se aclara el tipo de sub–fracción, esta es (S). ext: extracciones.

Muestra	Primavera (%)	Verano (%)	Invierno (%)
RT (S)	3,1	2,9	0,9
RT (P)	1,7	2,1	2,4
Total RT	4,8	5,0	3,3
W90–1 (S)	6,9	4,5	3,8
W90–1 (P)	1,3	–	1,1
Total W90–1	8,2	4,5	4,9
Total W90–2	4,5	3,4	4,2
KOH	17,6	20,4	21,5
NaOH	1,1	3,3	5,5
Total ext. acuosa	17,4	12,9	12,4
Total ext. Alcalina	18,7	23,7	27,0
Total	36,2	36,6	39,4

Si bien la extracción acuosa evita la presencia de proteínas contaminantes en los extractos (Immerzeel y Pauli, 2006) tiene la desventaja de potenciales pérdidas de material soluble en agua (Pettolino *et al.*, 2012), implicando que la reducción en el rendimiento en los pasos sucesivos de agua fría y caliente puede deberse tanto a la no solubilización del material de la pared como de la pérdida de productos de PM<3500 Da durante la diálisis. Del mismo modo, es esperable un

incremento en el rendimiento de la extracción con KOH debido al arrastre del material residual (Tabla 23).

Los rendimientos de extracción difirieron levemente para las algas recolectadas durante las distintas estaciones (Tabla 23). Los extractos de RT fueron 32% mayores para las muestras de *P* y *V* que para las de *I*. Por otra parte, para los extractos de W90–1, *V* e *I* resultaron 43% menores que *P*, mientras que para W90–2, las fracciones *I* y *P* superaron en un 25% a la de *V*. En suma, las algas recolectadas en primavera poseen un 28% más de polisacáridos solubles en agua correspondientes a la matriz amorfa (Aspinall, 1982; Immerzeel y Pauli, 2006).

La fracción más rica en los extractos con KOH fue *I* (21,5% respecto de la masa inicial), seguida de *V* (20,4%) y *P* (17,6%) mientras en los extractos con NaOH el porcentaje de hidratos de carbono (HdC) en las algas de *I* resultó aproximadamente un 60% mayor que para las recolectadas en *V* y *P*. Sin embargo, la proporción de material extraído en este paso fue mínimo (Tabla 23).

Los rendimientos totales no variaron en más de 9% indicando que la proporción de material extraído mediante el protocolo empleado no difiere sensiblemente en las distintas estaciones del año.

4.3.2.2 Composición de los extractos

El contenido de HdC, proteínas y ácidos urónicos fue altamente variable, entre y dentro de los distintos extractos (Tabla 24). La proporción de HdC fue mayor para los extractos de *P*=*V* que para los de *I*, siendo la extracción en agua caliente la que tuvo el mayor rendimiento.

La tendencia estacional observada para ácidos urónicos fue la misma que para HdC (*P*=*V*>*I*) siendo los extractantes alcalinos los más eficientes. Al no utilizar una extracción en medio alcalino leve como bicarbonato de sodio o quelantes de calcio como CDTA cabe la posibilidad de que una porción de los polisacáridos ácidos no fueran removidos en las extracciones acuosas y de allí el mayor rendimiento en las alcalinas comúnmente asociadas a polisacáridos fibrilares (Vierhuis *et al.*, 2000). Por otra parte, la proporción de urónicos relativa al contenido de HdC osciló entre 4,0 y

32,2% fue similar a la informada por Allard y Casadevall (1990) para *Botryococcus braunii* (9,3 a 21,8%).

El ordenamiento estacional del contenido proteico total fue *P*>*V*>*I* (excepto para KOH donde se invirtió el orden). El rendimiento de las extracciones alcalinas con KOH resultó muy superior al del resto mientras que los extractos RT, W90(P) y NaOH carecieron de material peptídico.

Tabla 24 Contenido porcentual de hidratos de carbono, proteínas y ácidos urónicos totales en los extractos (S) y (P) liofilizados. P: primavera, V: verano, I: invierno; DS: desvío estándar; $\%_{HdC}$: porcentaje de ácidos urónicos relativo al de HdC; MI: muestra insuficiente. En los casos en que no se aclara el tipo de subfracción, esta es (S). El guión indica que la cuantificación estuvo por debajo del límite de detección.

Muestra	Hidratos de Carbono		Proteínas		Ácidos Urónicos		
	%	DS	%	DS	%	DS	$\%_{HdC}$
P RT (P)	20,8	3,9	10,3	0,1	2,5	0,2	12,0
V RT (P)	24,6	0,5	5,5	1,6	1,1	0,1	4,5
I RT (P)	12,9	2,2	7,8	2,8	3,2	0,4	24,8
P W90–1 (P)	24,7	1,4	–	–	4,5	0,1	18,2
I W90–1 (P)	MI	MI	–	–	MI	MI	MI
P RT	53,8	4,8	–	–	2,3	0,1	4,3
V RT	39,6	9,3	–	–	1,9	1,1	4,8
I RT	44,4	3,0	–	–	1,8	0,6	4,1
P W90–1	82,7	8,4	8,1	4,5	3,3	0,7	4,0
V W90–1	71,9	4,1	8,6	3,5	3,2	2,5	4,5
I W90–1	27,3	0,4	3,9	0,2	2,3	0,5	8,4
P W90–2	45,3	1,0	13,0	1,2	4,4	1,1	9,7
V W90–2	48,4	6,4	4,0	0,5	5,5	0,6	11,4
I W90–2	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI
P KOH	21,8	0,7	26,9	4,5	3,5	0,3	16,1
V KOH	24,8	9,0	35,3	3,1	6,1	0,9	24,6
I KOH	13,1	4,8	47,2	4,3	2,3	1,0	17,6
P NaOH	37,1	0,8	–	–	1,9	1,6	5,1
V NaOH	20,2	4,4	–	–	6,5	1,5	32,2
I NaOH	8,6	2,4	–	–	–	–	-

Los extractos alcalinos y acuosos de verano e invierno rindieron el mismo porcentaje de azúcares (5,0%) respecto de la masa inicial mientras que en primavera el rendimiento de las extracciones

acuosas fue un 50% mayor. En contraste, el contenido proteico resultó en extractos alcalinos (KOH; 6,8% en *P* y 9,2% en *V* e *I*) mientras que el rendimiento de los acuosos fue de 1%. Esta diferencia es consecuente con la fuerza de extracción de solventes alcalinos fuertes.

4.3.2.3 Composición de monosacáridos neutros de los extractos

El producto RT de *V* difirió de los correspondientes a *P* e *I* principalmente por presentar un aumento marcado en el contenido de glucosa, en detrimento de manosa y galactosa. El mayor contenido de glucosa (15,0%) podría deberse a la acumulación de azúcares de reserva energética hacia fines del verano (Martin *et al.*, 2013) como consecuencia de la asimilación fotosintética de carbono en las condiciones de día largo (Tabla 25). *K.rhaphidioides* presenta un tipo de almidón denominado *céreo* (*waxi*, en inglés) caracterizado por poseer solo amilopectina en su estructura y carecer de amilosa (Schultz, inédito). La amilopectina es un α (1-4)-D-glucano con ramificaciones α (1-6) cada 25 a 30 residuos de glucosa muy similar al glucógeno animal (con α (1-6) cada 9 a 12 residuos). Su alto grado de ramificación facilita la digestión enzimática y la interacción con moléculas como el agua capaces de formar puentes de hidrógeno. A diferencia del almidón verdadero, este polímero adopta una forma tridimensional arborescente, es soluble en agua fría, tiene poca tendencia a la retrogradación (pérdida de agua cuando gelifica) y los granos que forma poseen bordes difusos (Figura 27, B) (Green *et al.*, 1975). La solubilización del polímero de reserva fue posible debido a la disrupción de las membranas celulares por sonicación.

Si se atribuye el porcentaje de glucosa en esta extracción como proveniente de la hidrólisis de amilopectina, la proporción de este azúcar de reserva fue de 24% en promedio para las tres estaciones.

Cordeiro *et al.*, (2005; 2008) investigaron la composición de la pared celular del fotobionte *Trebouxia sp.*, perteneciente a las Trebouxiophyceae del mismo modo que *K.rhaphidioides, y* describieron un mano-galactofuronano cuya proporción de monosacáridos neutros varió de acuerdo con el peso molecular. De este modo, la fracción >30 kDa tuvo una relación de xilosa, ramnosa,

arabinosa, manosa y galactosa de 1 : 4 : 2,5 : 4 : 21, que luego de dializar con membranas de 100 y 300 kDa varió a 0 : 1 : 3 : 8 : 24. La relación de estos azúcares neutros extraídos de *K.rhaphidioides* en agua a temperatura ambiente fue de: 1 : 3 : 1 : 5 : 14, semejante al producto de mayor peso molecular informado por Cordeiro *et al.* (2005,2008) (Tabla 25). Cabe señalar que ambos polisacáridos podrían ser equiparables al extraído de *K.rhaphidioides*, debido a que el corte de peso molecular de la bolsa de diálisis fue de 3,5kDa.

Tabla 25 Composición de monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción RT (S) luego de la hidrólisis con TFA 2M.

Azúcar	P RT (S)	V RT (S)	I RT (S)
3-*O*-metil fucosa	2	1	5
Ramnosa	5	6	11
Fucosa	5	3	4
Arabinosa	2	3	4
Xylosa	3	3	3
Manosa	18	9	14
3-*O*-metil galactosa	1	-	-
Galactosa	47	32	45
Glucosa	17	43	13

Por otra parte, Allard y Casadevall (1990) y Banerjee *et al.* (2002) hallaron un heteropolisacárido semejante en la matriz extracelular de *Botryococcus braunii* (*Trebouxophyceae*), con galactosa como el azúcar mayoritario y cantidades menores fucosa, arabinosa, ramnosa y ácidos urónicos.

La galactofuranosa fue descripta en paredes celulares de algas verdes (*Trebouxia*, *Asterochloris sp.)*, de la cianobacteria *Nostoc commune* (Cordeiro *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2007; Wieneke *et al.*, 2007), en polisacáridos extracelulares de *Chlamydomonas augustae* (Allard y Tazi, 1993) y *Coelastrum sphaericum* (Rodríguez y Cerezo, 1996) y en glico-conjugados de las paredes de bacterias, protozoos y hongos (Omarsdottir *et al.*, 2007). La conformación furanósica de la galactosa no se encuentra presente en células animales, por ello su presencia en patógenos como

Mycobacterium tuberculosis, Paracoccidioides brasiliensis, Aspergillus fumigatus y *Trypanosoma cruzi* es inmunogénica (Suzuki *et al.*, 1997; Levery *et al.*, 1998; Sassaki *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2008) constituyendo un posible mecanismo contra la herbivoría.

Otros azúcares como la 3-*O*-metilfucosa o la 3-*O*-metilgalactosa se encuentran con muy baja frecuencia y por lo tanto pueden ser utilizados como indicadores taxonómicos, del mismo modo que el patrón de ramificación (Ogawa *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1998*;* Schultink *et al.*, 2014). El primero de los metil azúcares solo fue reportado formando parte de polisacáridos en la pared celular y exudados de *Botryococcus braunii* (Allard y Casadevall, 1990; Banerjee *et al.*, 2002) y unido a carotenoides en las cianobacterias *Oscillatoria agardhii* y *O. bornetii*, asociado a fracciones lipídicas en los bivalvos *Corbicula sp.* (Itaska, 1966) e *Hyriopsis schlegelii* (Hori *et al.*, 1981) y a glicoproteínas glandulares del bivalvo *Odontocymbiolla magellanica* (Bigatti *et al.*, 2010). En contraste, la presencia de 3-*O*-metilgalactosa fue informada para numerosos organismos vegetales y animales como las algas *Chlorella vulgaris* (Ogawa *et al.*, 1994), *Ankistrodesmus densus* (Paulsen *et al.*, 1998), *Cryptomonas sp.* (Paulsen *et al*., 1992), *Porphiridium cruentun* y *P. aerugineum* (Percival y Foyle, 1979), en Charophyceae (O'Rourke *et al.*, 2015), en los hongos *Armillaria mellea* (Bouveng *et al.*, 1967) y *Lampteromyces japonicus* (Fukuda y Hamada, 1978)*;* en la laurácea *Sassafras albidum* (Springer *et al.*, 1965), en hojas de castaño (*Castanea sativa*; Bacon y Cheshire, 1971), en la corteza del olmo (*Ulmus glabre;* Hirst *et al.*, 1951; Barseti y Paulsen, 1985, 1991), en la licofita *Selaginella apoda* (Popper *et al.*, 2001) y en glicoproteínas de los caracoles *Helix pomatia* y *Lymnacea stagnails* (Hall *et al.*, 1977). La proporción de 3-*O*-metilgalactosa fue baja en todos los casos excepto en *A.densus* donde representó un 32% del total de los azúcares, sugiriendo una función estructural.

El análisis por CGL de los precipitados rindió mayormente manosa, galactosa y glucosa con trazas del resto de los azúcares. Nuevamente, si se atribuye la glucosa al polisacárido de reserva, la relación entre manosa y galactosa (2:1 y 3:1) sugiere la presencia de un galactomanano también descripto previamente para otras Trebouxiophyceae, (Rodrigues y da Silva Bon, 2001; Domozych

et al., 2012).

Tabla 26 Composición de monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción RT (P) luego de la hidrólisis con TFA 2M. Tr implica un contenido menor a 1%.

Azúcar	P - RT (P)	V - RT (P)	I - RT (P)
3-*O*-metil fucosa	tr	tr	tr
Ramnosa	tr	tr	tr
Fucosa	tr	tr	tr
Arabinosa	tr	tr	tr
Xylosa	tr	tr	tr
Manosa	20	16	23
3-*O*-metil galactosa	-	-	-
Galactosa	47	49	47
Glucosa	32	35	30

Tabla 27 Composición monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción W90-1 y 2 luego de la hidrólisis con TFA 2M. Para la segunda extracción en agua caliente solo se obtuvo producto de células de invierno.

Azúcar	P - 901	V - 901	I - 901	I - 902
3-*O*-metil fucosa	7	6	6	7
Ramnosa	10	10	11	10
Fucosa	10	9	11	10
Arabinosa	7	5	9	10
Xylosa	3	5	6	5
Manosa	12	18	17	20
3-*O*-metil galactosa	1	1	2	1
Galactosa	38	29	24	27
Glucosa	13	18	15	11

Del mismo modo que en las extracciones acuosas, el azúcar mayoritario en el extracto W90 fue

la galactosa, seguida de manosa y glucosa. En contraste, el contenido de ramnosa y arabinosa se duplicó en detrimento de galactosa y glucosa.

La proporción de xilosa, ramnosa, arabinosa, manosa, galactosa y glucosa sugiere nuevamente la presencia de un mano-galactofuronano dado que la relación de estos azúcares (1,0 : 2,0 : 1,5 : 3,6 : 5,3 : 2,8) se asemeja a la hallada por Cordeiro *et al.* (2005) (1,0 : 1,0 : 0,6 : 4,2 : 6,2 : 2,9) en un extracto alcalino de *Trebouxia sp.*

Los productos de la extracción con KOH fueron sometidos a dos métodos de extracción siendo el más drástico (Morrison, 1988) necesario para hidrolizar polisacáridos resistentes como la celulosa. En la Tabla 28 se pueden observar a grandes rasgos algunas diferencias en los resultados. Luego de la hidrólisis exhaustiva, las pentosas arabinosa y xilosa disminuyeron su porcentaje molar mientras que la glucosa y en menor medida la manosa lo aumentaron. Las primeras son más lábiles y una parte puede haberse degradado mientras que se favoreció la ruptura de enlaces glicosidicos de hexosas presentes en el material fibrilar, como celulosa o β-mananos descriptos para microalgas verdes (Rodríguez *et al.*, 1999). Debido en parte al procedimiento hidrolítico empleado, en extractos alcalinos de *Chlorella* y otras microalgas verdes se informaron porcentajes variables de monosacáridos relacionados con polisacáridos no fibrilares como ramnosa, fucosa y galactosa (Loos y Meindl 1982; Blumreisinger *et al.*, 1983; Allard y Casadevall, 1990; Takeda, 1991; Krienitz *et al.*, 1999, Rodríguez *et al.*, 1999, Cordeiro *et al.*, 2003, 2005, 2007, 2008, Shi *et al.*, 2007; Popper y Tuohy, 2010; Popper *et al.*, 2011; Juárez *et al.*, 2011). Conforme la marcha de extracción empleada progresa a medios más alcalinos, se observó una disminución de estos azúcares (e.g. ramnosa y fucosa) mientras que aumentó el contenido de monosacáridos relacionados con polisacáridos fibrilares (glucosa y manosa; comparar entre Tabla 27 y Tabla 28). Resultó destacable que el contenido de galactosa no disminuyó sensiblemente, sugiriendo nuevamente la presencia de un galactomanano como el informado por Cordeiro *et al.*, (2005) para *Trebouxia.*

En los productos extraídos con KOH se observó un incremento en el porcentaje de proteínas que osciló entre *27% (P* KOH) y 47% (*I* KOH), coincidente con el alto contenido observado por otros

autores (Cordeiro *et al.*, 2003, 2005, 2007, 2008).

Tabla 28 Composición de monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción KOH, luego de las hidrólisis con TFA 2M y de Morrison (M).

Azúcar	P - KOH	V - KOH	I - KOH	P - KOH (M)	V - KOH (M)	I - KOH (M)
3-*O*-metil fucosa	4	4	4	3	3	3
Ramnosa	6	5	5	5	4	4
Fucosa	3	3	5	3	3	4
Arabinosa	18	13	9	8	9	5
Xylosa	9	13	10	3	5	9
Manosa	16	17	21	22	20	20
3-*O*-metil galactosa	1	2	2	2	2	1
Galactosa	26	26	20	21	26	16

El contenido de proteínas en las paredes celulares de microalgas es altamente variable, pasando de paredes compuestas íntegramente por una red compleja de 25 a 30 glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) en el género *Chlamydomonas* y otras volvocales, a paredes compuestas por polisacáridos neutros y ácidos con contenidos variables de polipéptidos. En las paredes del segundo tipo, las microfibrillas de celulosa se encuentran entrecruzadas por hemicelulosas y embebidas en una pared de pectinas y proteínas ricas en arabinogalactanos (AGPs) y extensinas conjuntamente con enzimas relacionadas al ensamblado de la pared (Domozych y Domozych, 2014). Si bien en el presente trabajo no se realizó una caracterización estructural de los azúcares de la pared, la composición de monosacáridos sugiere la presencia de celulosa y mananos como polisacáridos fibrilares entrecruzados por hemicelulosas (xiloglucanos) responsables de la flexibilidad de este material. Las hemicelulosas se encuentran presentes en todos los organismos vegetales aunque su composición y combinación de los distintos tipos es especie-específica, y es debido a ello que se las utiliza como indicadores taxonómicos (Atalla, 2005; Hoffman *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2008; Sørensen *et al*., 2010; Popper *et al.*, 2011; Fangel *et al.*, 2012).

Tabla 29 Composición monosacáridos neutros (en % molar) de la fracción NaOH, luego de la hidrólisis de Morrison. Tr implica un contenido menor a 1%.

Azúcar	P - NaOH	V - NaOH	I - NaOH
3-*O*-metil fucosa	-	-	-
Ramnosa	-	-	-
Fucosa	-	-	-
Arabinosa	2	4	2
Xylosa	19	17	23
Manosa	10	6	11
3-*O*-metil galactosa	-	-	-
Galactosa	3	4	3
Glucosa	66	68	60

El perfil de monosacáridos neutros en la fracción alcalina NaOH presentó diferencias marcadas respecto del resto de los extractos, entre ellas: la ausencia de ramnosa, fucosa y metil azúcares, un bajo contenido de arabinosa y galactosa (<4%) y un alto porcentaje de glucosa, xilosa, manosa, comúnmente relacionadas con polisacáridos asociados a la matriz fibrilar. La presencia de celulosa, β-mananos, β-xilanos y xiloglucanos fue informada para algas verdes de las clases Charophyceae (Domozych *et al.*, 2009), Chlorophyceae (Painter, 1983; Lahaye *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1999; Tsekos, 1999; Nemcova 2003; Lahaye y Robic, 2007), Ulvophyceae (Percival, 1979; Lahaye y Robic, 2007; Estevez *et al.*, 2009; Ciancia *et al.*, 2012) *y* Trebouxiophyceae (Cordeiro *et al.* 2003, 2005; Nemcova, 2003; Rodrigues y da Silva Bon, 2011). Es destacable la disminución del porcentaje molar de manosa en los extractos de NaOH respecto de los de KOH. Rodríguez *et al.* (1999) informaron para *Coelastrum sphaericum* la presencia de un manano con uniones β-(1→4) aunque con baja proporción de horquillas en la cadena lineal de estructura regular como consecuencia de enlaces β-(1→2). Estos repliegues en la cadena impiden el empaquetamiento del polisacárido y como consecuencia es removido más fácilmente que la celulosa. Además, estas irregularidades actuarían como moduladores de la resistencia mecánica de la pared.

4.3.2.4 Composición de monosacáridos neutros y contenido proteico en cultivos axénicos unialgales de *Keratococcus rhaphidioides*, en co-cultivo con la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* y en el agua intersticial de los sedimentos

Luego de 20 días de cultivo, el único monosacárido identificado en el exudado fue galactosa. Sin embargo, las señales a los tiempos de retención de los demás azúcares estuvieron presentes aunque con intensidades fuera del rango de integración del equipo. Esas señales resultaron evidentes luego de 90 días de cultivo axénico, cuando el hidrolizado de los polisacáridos extracelulares de *K.rhaphidioides* continuaron rindiendo una alta proporción de galactosa (66%) seguida de manosa (9%) y porcentajes molares por debajo del 6% para el resto de los azúcares (Tabla 30). Esta composición, incluida la presencia de 3-*O*-metilfucosa, es coincidente con la hallada para exudados de *B.braunii* (Allard y Casadevall, 1990; Banerjee *et al.*, 2002). Por otra parte, la proporción de glucosa, arabinosa, manosa y galactosa resultó similar a la determinada por Cordeiro *et al.* (2005) en un extracto acuoso de *Trebouxia sp.* (1,0 : 1,2 : 1,8 : 13,2 vs. 1,0 : 1,4 : 1,6 : 16,0).

La relación entre los monosacáridos hallados en el medio del cultivo mixto de *K.rhaphidioides y R.mucilaginosa* resultó distinta a la del cultivo axénico, registrándose un aumento de glucosa y manosa en detrimento de galactosa y una disminución en el contenido proteico (de 11,0 a 3,6%; Tabla 30). Ello puede deberse a la utilización y/o consumo de los azúcares conjuntamente con aminoácidos por parte de la levadura como fuente de carbono y nitrógeno, y a la posterior secreción o lixiviación de polisacáridos propios. No puede descartarse que la presencia de la levadura haya actuado como elicitoria sobre el alga induciendo cambios en el tipo de HdC secretados.

Tabla 30 Composición monosacárídica y contenido proteico del agua intersticial del sedimento de BN y BS, y exudados de *Keratococcus rhaphidioides* con, K_1: 20 días, K_2: 90 días, y *K+R*: 90 días, y el alga inoculada con la levadura acidotolerante *Rhodotorula mucilaginosa* aislada del agua intersticial del sedimento del BN. Los azúcares se expresaron como % molar. Tr implica un contenido menor a 1%.

Azúcar	BN_{int}	BS_{int}	Cultivo K_1	Cultivo K_2	Cultivo *K+R*
HdC mg mL^{-1} H_2O_{int}	0,06	0,13	-	-	-
3-*O*-metil fucosa	3	1	tr	2	tr
Ramnosa	17	14	tr	5	4
Fucosa	18	20	tr	2	5
Arabinosa	8	7	tr	6	8
Xylosa	16	14	tr	5	3
Manosa	15	21	tr	9	21
Galactosa	15	20	100	66	22
Glucosa	7	3	tr	5	37
Proteínas (%)	3,4	3,6	11,6	13,7	3,6

Finalmente, los polisacáridos aislados del agua intersticial de los sedimentos de los brazos (BN y BS) poseen un alto grado de similitud, sin embargo cabe señalar que su concentración en el BS resultó el doble de la del BN (0,13 y 0,06 g L^{-1} de agua intersticial respectivamente). Estos azúcares, poseen la misma proporción de galactosa, manosa, arabinosa y 3-*O*-metilfucosa que el exudado del cultivo mixto, y mientras que el contenido de ramnosa, xilosa y fucosa fue mayor, el de glucosa fue mucho menor, sugiriendo que posiblemente ese azúcar sea consumido por la microflora de los sedimentos. El contenido neto de hidratos de carbono en el agua intersticial representa un aporte considerable al *pool* de materia orgánica disuelta sedimentaria, a pesar de la diferencia hallada entre los brazos.

4.3.2.5 Adsorción de hierro, manganeso y fósforo a la pared celular de *K.rhaphidiodes*

El análisis de los digestos de las algas lavadas con Na-EDTA y nitrato de sodio ($NaNO_3$) arrojó

diferencias significativas en el contenido de Fe y P, mientras que la concentración de Mn fue la misma en ambos casos y la de Zn, Pb, Cd, Cu y Cr estuvieron por debajo del límite de detección (0,05 mg g^{-1} de alga seca; Tabla 31). El extracto de la digestión de los filtros se consumió intentando determinar el contenido de aluminio por el método Hatch (las determinaciones se realizaron por duplicado) aunque no se lograron obtener los datos debido a una contaminación con el metal en el sistema de medición. Luego de buscar el origen de la misma se concluyó que el origen más probable fueron los reactivos.

Dado que las muestras se obtuvieron concentrando algas del lago por medio de redes de plancton (45 y 10 µm), se asumió que los fenómenos de adsorción sobre la pared celular del alga estaban en equilibrio. Además, al no concentrar el agua la relación del contenido disuelto/adsorbido de los distintos metales no fue modificada.

Tabla 31 Adsorción de nutrientes a la pared celular de *K. Rhaphidioides*. E_{ads}: elemento adsorbido; ps:peso seco; *Π*: coeficiente de partición entre el nutriente adsorbido y su concentración en la columna de agua; M_{ads} y M_{tot}: masas adsorbida y total en el lago (en toneladas).

Elemento	E_{ads} (µmol g^{-1} ps)	E_{ads} (µmol 10^6 cel^{-1})	*p* valor	Π (L g^{-1})	M_{ads}	M_{tot}
Fe	79	1,71	0,009	0,28	310	7584
P	63	1,35	0,020	3,92	136	237
Mn	$1,1x10^{-3}$	$2,38x10^{-5}$	0,098	0,06	4,87	474

La masa de Fe adsorbido fue de 79 µmoles g^{-1} de alga seca (4,46 mg g^{-1}) mientras que la de P fue de 63 µmoles g^{-1} de alga seca (1,96 mg g^{-1}). Expresando la masa de estos elementos en µmoles . 10^6 $células^{-1}$, los valores obtenidos fueron de 1,71 y 1,35 respectivamente (Tabla 31). El Fe^{+3} (disuelto o en forma de óxido) y el PO^{-4} tienen tendencia a formar complejos ternarios con carboxilatos (-COO^{--}-Fe^{+3}-PO^{-4}; Gerke 1992; Gerke y Hermann 1992; Paludan y Jensen, 1995). De acuerdo con las determinaciones colorimétricas, el contenido de ácidos urónicos en la pared de *K.rhaphidioides* osciló entre 40 y 390 µmoles g^{-1} alga seca, según el extracto (Tabla 24). La relación hallada entre fósforo, hierro y ácidos urónicos sugiere la presencia de este tipo de complejos. Además, otros azúcares como la celulosa o los galactomananos pueden contribuir como superficies de adsorción aunque para estimar las distintas afinidades es necesario realizar ensayos sobre los polisacáridos

fraccionados.

De acuerdo con la información consignada hasta aquí, el coeficiente de partición de P sugiere que la pared celular de *K.rhaphidioides* es muy eficiente en su captación y almacenamiento desde la columna de agua (0,45 mg P L^{-1}; ver sección 1.1).

Considerando la biomasa seca promedio *K.rhaphidioides* en el lago Caviahue durante los últimos ocho años (rango 0,034-0,940 mg L^{-1}, 0,22 mg L^{-1} en promedio; Baffico, inédito) como el 15% del peso fresco (Wetzel y Likens, 1990; O'Reilly y Dow, 2015), y proyectando la capacidad de adsorción determinada en este estudio, el P asociado a la pared de *K.rhaphidioides* constituiría entre el 0,01 y 0,36% respecto del P total en la columna de agua. Este valor es bajo comparado con el obtenido para microalgas verdes en cultivo axénico como *Scenedesmus quadricauda* (10%; Yao *et al.*, 2011) o *Chlorella pyrenoidosa* (20%; Robinson, 1998). Asimismo, el contenido celular de P en *K.rhaphidioides* (incorporado más adsorbido) representa entre el 1 y 2,5%% del total del lago. Este valor no es comparable con el 98,0% informado para *Scenedesmus oblicuus* (Martínez *et al.*, 2000) o el 99% para *C.vulgaris* (de-Bashan y Bashan, 2010) también determinados en cultivos axénicos.

Por otra parte, el contenido de Fe adsorbido a la pared celular de *K.rhaphidioides* llegaría a representar el 0,02% del total disponible en el lago, mientras que el contenido celular estaría cerca del 0,07% (5 toneladas).

La capacidad de adsorción de Fe por la pared celular de *K.rhaphidioides* (0,079 mmol L^{-1}) resultó baja cuando se la compara con otras microalgas, por ejemplo: *Chlorella vulgaris* (1,1 mmol g^{-1} de alga seca a pH 2,0; Aksu y Kutsal, 1990), *Klebsormidium rivulare* (hasta 0,39 mmol g-1 de alga seca a pH~3,0; Stevens *et al.*, 2001), *Hydrodyction reticulatum* (hasta 0,82 mmol g-1 de alga seca a pH~8,0; Ray y Chandra, 1992), las Euglenophyta *Strombomonas sp. y Trachelomonas sp.*, (10,5 mmol g^{-1} de alga seca a pH~7,2; Jackson y Bistricki, 1995). Estos últimos autores determinaron también que el contenido de Fe en ambas Euglenophyta resultó inversamente proporcional a la acumulación de metales traza como Cu, Zn o Pb, sugiriendo una tendencia similar a la hallada en esta sección.

Las determinaciones realizadas en esta tesis indican que la pared de *K.rhaphidioides* es más afín por el Fe que por los metales traza evaluados, aunque el Al podría competir por los sitios ligando en la pared. En este punto cabe recordar que Stevens *et al*. (2001) determinaron que la pared de *Klebsormidium rivulare* es siete veces más afín por Fe que por Al. De acuerdo con estos resultados, y teniendo en cuenta que la concentración de Fe en el lago es al menos tres órdenes de magnitud mayor que el de metales traza como Pb, Zn, Cu, Cd, etc., la saturación en Fe de los ligandos bióticos del alga puede constituir un mecanismo de atenuación de la toxicidad potencial inducida por estos metales, en línea con el modelo BLM.

4.4 Conclusiones

Hipótesis 1: No existe diferencia en la tolerancia de Keratococcus rhaphidioides ante la exposición de Fe, Mn y Al entre agua del lago y medio sintético conteniendo NTA y ácidos fúlvicos como fuente de materia orgánica quelante.

Se rechaza la primera hipótesis dado que a diferencia de lo que ocurre en agua de lago o medio sintético sin quelantes, el aluminio indujo inhibición del crecimiento de *K.rhaphidioides* en presencia de NTA y ácidos fúlvicos mientras que 20 mg L^{-1} de hierro provocó el mismo efecto inhibitorio cuando se combinó con ácidos fúlvicos. Además, el enriquecimiento del medio de cultivo en hierro (8 mg L^{-1}) y el manganeso indujo un aumento en el crecimiento de *K.rhaphidioides* respecto de los cultivos en agua de lago.

Hipótesis 2: La pared celular de Keratococcus rhaphidioides se asemeja a la de otras algas de la clase Trebouxophyceae.

Se acepta la segunda hipótesis dado que los polisacáridos extraídos de la pared celular de *Keratococcus rhaphidioides* se asemejan a los reportados para otras Trebouxiophyceae como *Trebouxia* o *Botryococcus braunii*.

Hipótesis 3: La pared celular de Keratococcus rhaphidioides posee un alto contenido de ácidos urónicos y debido a ello, una gran capacidad de ligar metales.

Se rechaza el primer postulado de la tercer hipótesis debido a que el contenido de ácidos urónicos resulto bajo en comparación con el de otras algas mientras que se acepta el segundo dado que la pared posee una alta capacidad de ligar hierro.

Conclusiones generales

5 Conclusiones generales

El hierro en los sedimentos ambientes con pH cercano a la neutralidad está comúnmente asociado a las fases de carbonatos, óxidos, sulfuros y pirita, dependiendo su distribución del potencial reductor. En los sedimentos ácidos y anóxicos de Caviahue, este metal se encontró fuertemente correlacionado con el contenido de ácidos húmicos en la fracción residual (52%) y a la fracción correspondiente a pirita (38%).

Se halló una fuerte correlación entre fósforo, hierro y ácidos húmicos en el sedimento de Caviahue, sugiriendo que su dinámica está relacionada. El contenido de fósforo en los extractos del procedimiento secuencial empleado resultó cualitativamente comparable con el determinado por el método de Hieltjes y Lijklema (1980). Queda abierto el estudio de la potencial utilización del método de extracción de metales para la estimación de la distribución de P, en las fases geoquímicas a las que se encuentra comúnmente asociado.

El contenido de hierro total y los coeficientes de partición *Π*, indicaron que más allá de la distribución entre fases químicas, los depósitos de los Brazos Norte y Sur del Lago Caviahue son similares y mayores que el del Centro. Ello puede deberse al mayor volumen de agua en la columna suprayacente en BN y BS, lo que implicaría una mayor cantidad de material sedimentado.

La cantidad de hierro en los sedimentos es menor a la hallada por otros autores en ambientes neutros, debido a: 1) la alta solubilidad del metal debida al bajo pH y 2) las condiciones desfavorables para la mayoría de las fases químicas que se constituyen en los sedimentos.

El contenido de metales traza resultó similar al determinado en otros sedimentos (neutros o ácidos) nada o levemente contaminados, aunque la mayor diferencia radica en que la concentración de estos metales en la columna de agua de Caviahue es mayor que en los otros ambientes, y por lo tanto también su disponibilidad. Comparando con ambientes polucionados debido a la actividad minera, el contenido de Mn, Cu, Pb, Cr y Zn fue mínimo.

La actividad del Volcán Copahue puede influenciar al cuerpo de agua de, al menos, tres formas: 1) Una baja en la actividad conllevaría un aumento de pH en el agua del lago, con la consecuente precipitación de óxidos de hierro, enriqueciendo al sedimento en este y otros metales que co-precipitarían. 2) una disminución en el pH implicaría concentraciones más altas en el agua del lago debido a mayor solubilidad de los metales y a tasas menores de formación de pirita. 3) la mezcla y oxidación del sedimento debido a actividad sísmica implicaría la liberación de metales a la columna de agua debido a la disolución de pirita, aunque el contenido de metales potencialmente tóxicos en el sedimento del lago es baja.

Los resultados obtenidos en esta tesis avalan la existencia de un sistema buffer de hierro, que provoca la precipitación del metal cuando el contenido aportado por el RAS se encuentra por encima de la capacidad de carga del lago. Consecuentemente, su concentración en la columna de agua no aumenta en la proporción predicha por la relación de masas. Sin embargo, la existencia de una interpretación alternativa que supone para el hierro un comportamiento conservativo, implica la necesidad de un estudio más profundo.

La abundancia de AH en los tres sitios resultó significativamente distinta, siendo mayor en los brazos que en el Centro. Esta variable estuvo fuertemente correlacionada con el contenido de agua del sedimento, indicando que un mayor contenido de humedad favorece el proceso de humificación.

Las relaciones elementales e indicadores espectroscópicos permiten concluir que el origen de los AH del Lago Caviahue es autóctono. A pesar de que el material extraído de BN 8-12 y BS 0-2 mostró un mayor tamaño molecular que el resto de las muestras, en las otras variables su comportamiento no evidenció diferencias.

Los AH de Caviahue se diferencian principalmente de los extraídos de sedimentos lacustres neutros o alcalinos por su contenido significativamente mayor de azufre, y comparable con los de ambientes marinos, lo que indica que la disponibilidad de este elemento en el agua intersticial condiciona el proceso de humificación. Además, el contenido de hierro asociado a los AH es mayor

que el observado por otros autores, a pesar de los exhaustivos lavados con ácido.

Los espectros FT-IR permiten afirmar que los AH extraídos de los tres sitios son muy similares en cuanto al contenido cualitativo de grupos funcionales, presentando diferencias significativas en la proporción de residuos alifáticos y variaciones menores en el contenido relativo de residuos proteicos, quinonas, carboxilos y fenoles, siendo los extraídos del BS los más ricos en todos los casos. Además, la comparación con espectros obtenidos por otros autores, sugiere que el contenido global de grupos -OH es mayor al registrado para otros ambientes, del mismo modo que el de azufre.

La acidez debida a grupos carboxilos de los AH del BS resultó igual al promedio calculado para 410 muestras de AH de distintos ambientes, mientras que la debida a fenolatos fue dos veces mayor, probablemente debida al error inherente al método de estimación utilizado en esta tesis. Sin embargo, el contenido fenólico no es de gran importancia al pH de los sedimentos del lago y de trabajo.

El análisis con PARAFAC de las matrices de fluorescencia sugirió la presencia de dos componentes fluorescentes en todas las muestras de AH estudiadas y que a los pH estudiados no se registran variaciones significativas en su intensidad relativa. Estos factores poseen las mismas características que los determinados por otros autores para AH (F1, 360 Ex-460 Ex/495-500 Em y F2, 350 Ex/430-450 Em). En otros trabajos también se describe la presencia de un tercer componente fluorescente que explica la contribución de grupos de carácter “fúlvico” y que en las muestras del LC no contribuyó a explicar las variaciones de la fluorescencia inducida por metales y por ello fue desestimado. De los dos factores modelados solo F1 mostró *quenching* significativo, lo que está de acuerdo con ser el que mayor grado de conjugación presenta.

La asociación “*binding*” de metales por AH es un fenómeno muy importante en la química del sedimento ya que generalmente disminuye su biodisponibilidad, movilidad y transporte. El modelo utilizado para estudio de la asociación de los AH de Caviahue con distintos metales, permitió

estimar las afinidades relativas y la capacidad de carga para cada uno. Las constantes de *binding* se encontraron en el orden de 10^5 M^{-1} indicando la fuerte interacción entre los ligandos del AH y los metales estudiados. El orden de afinidad estuvo parcialmente de acuerdo con la serie de Irving y Williams dado que el Fe(II) presentó mayor afinidad por los AH que Cu.

En línea con la fuerte asociación entre Fe y AH discutida en el capítulo 1, el material húmico extraído del sedimento de Caviahue precipita rápidamente en presencia de concentraciones entre 60 y 120 µM de Fe^{+3} a pH 3,0. En general los metales trivalentes poseyeron mayor capacidad de inducir la agregación de los AH que los divalentes.

La combinación de 8 mg Fe L^{-1} y 1 mg Mn L^{-1} con NTA en medio de cultivo sintético a pH 3,0, indujo un incremento del crecimiento de *K.rhaphidioides,* mientras que este efecto no se observó cuando se utilizaron ácidos fúlvicos como materia orgánica quelante.

La combinación de Al con ambos quelantes (NTA y AF) resultó en la inhibición del crecimiento del alga y la fragmentación del cloroplasto, aberraciones morfológicas y vacuolización del citoplasma. Además, la combinación de una alta concentración de Fe con ácidos húmicos indujo el mismo efecto en el crecimiento y la morfología del alga que el Al, sumando en este caso la oxidación del 50% de la clorofila. En ambos casos se planteó que el mecanismo de toxicidad está asociado a la adsorción de la materia orgánica sobre la pared del alga, lo que lleva a un efecto concentrador del metal e induce un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática (en el caso de los ácidos fúlvicos). Además, en el caso de Fe, se detectó la formación de trazas de radicales ·OH. Este fenómeno sumado al posible aumento en la internalización de hierro y generación de EROs en el citoplasma.

Cuando no indujeron efectos inhibitorios, la presencia de ácidos fúlvicos estuvo acompañada por un leve aumento en el crecimiento de las algas cultivadas en el medio de cultivo respecto le agua del lago. Además, en todos los tratamientos se observó un aumento en el biovolumen celular de *K.rhaphidioides*.

La proporción de los monosacáridos neutros obtenidos a partir de la hidrólisis ácida de la pared celular de *K.rhaphidioides* resultaron similares, cualitativa y cuantitativa, a los azúcares reportados para distintos extractos de la pared del alga *Trebouxia sp.* cultivada en axenidad. La diferencia más importante entre los carbohidratos de ambas algas fue la presencia de fucosa y de metil azúcares en *K.rhaphidioides.* Sin embargo, el primero fue detectado en otra especie de *Trebouxia* y en el mismo porcentaje.

La 3-*O*-metil fucosa puede ser considerada un indicador taxonómico de la clase Trebouxiophyceae ya que solo fue descripto para *K.rhaphidioides* y *Botryococcus braunii,* ambas especies pertenecientes a este grupo algal.

Por otra parte, la 3-*O*-metil galactosa fue reportada para numerosos organismos del reino vegetal y animal, y aunque fue descripta para algas de otros *taxa* como *Ankistrodesmus densus*, *Porphyridium cruentum* o *P. aeruginosa,* su determinación en la pared de *K.rhaphidioides* constituye la segunda descripción para algas de su clase junto a *Chlorella vulgaris.*

No se observaron grandes diferencias para la composición de monosacáridos neutros entre las distintas estaciones del año, excepto por el contenido de glucosa asociado con polisacáridos de reserva energética al final del verano (*V*).

Los polisacáridos que *K.rhaphidioides* exuda al medio de cultivo cambian sensiblemente cuando el alga es co-inoculada con la levadura *R.mucilaginosa* respecto de los cultivos axénicos, siendo el aumento de glucosa y manosa en detrimento de galactosa y la disminución drástica en la proporción de proteína disuelta, los efectos más visibles.

La proporción de azúcares en el agua intersticial de los sedimentos de Caviahue constituye un aporte significativo al *pool* de materia orgánica disuelta. Asimismo, el porcentaje de algunos azúcares como galactosa, manosa, arabinosa y 3-*O*-metilfucosa presentan una gran similitud con la hallada en la pared de *K.rhaphidioides*, indicando que el aporte de esta alga al contenido de azúcar en el sedimento es significativo

Finalmente, la pared celular de *K.rhaphidioides* posee una alta capacidad de adsorber fósforo (1,96 mg g^{-1} de alga seca), conteniendo el 2,0% de este nutriente sobre el total disponible en la columna de agua. Asimismo, la tolerancia al ambiente ácido extremo y a la alta concentración de metales traza asociadas puede deberse a la saturación con hierro de los sitios ligando, desplazando por competencia a metales como el Cu^{+2} o Pb^{+2}. Este mecanismo está de acuerdo con la predicción del BLM de que altas concentraciones de cationes como Ca^{+2} y Mg^{+2} alivian el efecto inhibitorio causado por los metales mencionados.

6 Referencias bibliográficas

Abrameto , M., Gibelli , M., Aldalur , B. y Gil, M.I., 2014. Geoquímica de sedimentos de agua dulce: análisis multivariado e índices geoquímicos . En *Procesos Geoquímicos de la Superficie en América Latina* , Eds: Marcovecchio, J.E., Botté, S.E. y Freije, R.H. pp. 17-34.

Agemian, H. y Chau, A.S.Y., 1976. Evaluation of extraction techniques for the determination of metals in aquatic sediments. *Analyst*, 101, 761-767.

Agemian, H. y Chau, A.S.Y., 1977. A study of different analytical extraction methods for nondetrital heavy metals in aquatic sediments. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 6(1), 69-82.

Aho J. y Lehto, O., 1984. Effect of ionic strength on elution of aquatic humus in gel filtration chromatography. *Archives of Hydrobiology*, 101: 21-38.

Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. y MacCarthy, P., 1985. *Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization*. John Wiley & Sons, pp 1-12.

Aizenshtat, Z., Stoler, A., Cohen, Y., Nielen, H., 1982. The geochemical sulfur enrichment of recent organic matter by polysulfides in the Solar Lake. In Advances in Organic Geochemistry, 1981 (eds. Bjory *et al.*), pp. 279–288. Wiley & Sons.

Aksu, Z. y Kutsal, T., 1990. A comparative study for biosorption characteristics of heavy metal ions with C. vulgaris. *Environmental Technology*, 11(10), 979-987.

Albersheim, P.; Nevins, D.J.; English, P.D. y Karr, A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell–wall polysaccharides by gas–liquid chromatography. Carbohydr Res. 5: 340–345.

Allard, B., & Tazi, A., 1992. Influence of growth status on composition of extracellular polysaccharides from two Chlamydomonas species. *Phytochemistry*, 32(1), 41-47.

Allard, B. y Casadevall, E., 1990. Carbohydrate composition and characterization of sugars from the green microalga Botryococcus braunii. *Phytochemistry*, 29(6), 1875-1878.

Allen, E. T. y Day, A. L., 1935. *Hot springs of the Yellowstone National Park*. Carnegie Institute,Washington, USA.

Allen, H. E., Fu, G., Boothman, W., Di Toro, D. M. y Mahony, J. D., 1991. Determination of acid volatile sulfide and selected simultaneously extractable metals in sediment. *Office of Water Regulations and Standards, US Environmental Protection Agency*, Washington, USA.

Allen, H.E., Fu, G., Deng, B., 1993. Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 12(8), 1441–1453.

Alpert, N.L., Keiser, W.E., and Szymanski, H.A., 1964. *IR Theory and Practice of Infrared Spectroscopy*. Plenum, New York, 380 pp.

Alvarez-Puebla, R.A., Valenzuela-Calahorro, C. y Garrido, J.J., 2006. Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregation: a molecular modelling approach. *Science of the total environment*, 358(1), 243-254.

Anderegg, G., 1982. Critical survey of stability constants of NTA complexes. *Pure and Applied chemistry*, 54(12), 2693-2758.

Anderson, A.H. y Russell, J.D., 1976. Possible relationship between soil fulvic acids and polymaleic acid. *Nature*, 260, 597.

Ankley, G. T., Mattson, V. R., Leonard, E. N., West, C. W. y Bennett, J. L., 1993. Predicting the acute toxicity of copper in freshwater sediments: Evaluation of the role of acid-volatile sulfide. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(2), 315-320.

Anzecc, Armcanz, 2000. Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality. *Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, Canberra.* pp. 1-103.

American Public Health Association (APHA) 1992, Standard methods for the examination of water and wastewaters. 16ta ed. American Public Health Association, USA. p. 1250.

Arar, E. J. y Collins, G. B., 1997. *Method 445.0: In vitro determination of chlorophyll a and pheophytin a in marine and freshwater algae by fluorescence*. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Exposure Research Laboratory.

Aspinall, G.O., 1982. *The Polysaccharides.* Academic Press, pp 330.

Åström, M., 1998. Partitioning of transition metals in oxidised and reduced zones of sulphide–bearing fine–grained sediments. *Applied Geochemistry*, 13(5), 607–617.

Atalla, R., 2005. The role of the hemicelluloses in the nanobiology of wood cell walls: a systems theoretic perspective. In *Proceedings of the hemicelluloses workshop*, 37-57.

Avena, M. J., Koopal, L. K. y van Riemsdijk, W. H., 1999. Proton binding to humic acids: electrostatic and intrinsic interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 217(1), 37-48.

Baker, J. P. y Schofield, C. L., 1982. Aluminum toxicity to fish in acidic waters. In *Long-Range Transport of Airborne Pollutants*. Springer Netherlands,pp. 289-309.

Bacon, J.S.D., Cheshire, M.V., 1971. Apiose and mono-O-methyl sugars as minor constituents of the leaves of deciduous trees and various other species. *Biochemical Journal*, 124, 555–562.

Baffico, G. D., Diaz, M. M., Wenzel, M. T., Koschorreck, M., Schimmele, M., Neu, T. R. y Pedrozo, F., 2004. Community structure and photosynthetic activity of epilithon from a highly acidic (pH≤ 2) mountain stream in Patagonia, Argentina. *Extremophiles*, 8(6), 463-473.

Baffico, G.D., 2010. Epilithic algae distribution along a chemical gradient in a naturally acidic river, Río Agrio (Patagonia, Argentina). *Microbial ecology*, 59(3), 533-545.

Bagnoud-Velásquez, M., Brandenberger, M., Vogel, F., & Ludwig, C. (2014). Continuous catalytic hydrothermal gasification of algal biomass and case study on toxicity of aluminum as a step toward effluents recycling. *Catalysis Today*, *223*, 35-43.

Bai, Y.C., Wu, F.C., Liua, W, Lis, JY, Guoa, P.Q, Xing, B.S. y Zheng, J, 2008. Ultraviolet absorbance titration for determining stability constants of humic substances with Cu(II) and (Hg(II). *Anal. Chim. Acta*, 616, 115-121.

Bai X. L., Ding S. M., Fan C. X., Liu T., Shi D. y Zhang L., 2009. Organic phosphorus species in surface sediments of a large, shallow, eutrophic lake, Lake Taihu, China. *Environmental Pollution*, 157, 2507–2513.

Baker, H., & Khalili, F., 2005. A study of complexation thermodynamic of humic acid with cadmium (II) and zinc (II) by Schubert's ion-exchange method. *Analytica chimica acta*, *542*(2), 240-248.

Baker, H., & Khalili, F., 2007. Effects of pH and temperature on the interaction of Pb (II) with azraq humic acid studied with schubert's ion exchange method. *Annals of Environmental Science*, *1*(1), 8.

Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. y Banerjee, U. C., 2002. Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical reviews in biotechnology*, 22(3), 245-279.

Barsett, H., Paulsen, B.S., 1985. Separation of acidic polysaccharides from *Ulmus glabra* Huds. *Journal of Chromatography* , 329, 315–320.

Beamish, R.J., 1976. Acidification of lakes in Canada by acid precipitation and the resulting effects on fishes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 6(2-4), 501-514.

Beamud, S.G. 2009. Control del crecimiento y la distribución vertical del fitoplancton del Lago Caviahue. Tesis Doctoral, pp 160.

Beamud, S.G., Diaz, M.M. y Pedrozo, F.L., 2007. Summer phytoplankton composition and nitrogen limitation of the deep, naturally–acidic (pH 2.2) Lake Caviahue, Patagonia, Argentina. *Limnologica–Ecology and Management of Inland Waters.* 37(1), 37–48.

Beamud, S.G., Diaz, M.M., Baccalá, N.B. y Pedrozo, F.L., 2010. Analysis of patterns of vertical and temporal distribution of phytoplankton using multifactorial analysis: Acidic Lake Caviahue, Patagonia, Argentina. *Limnologica–Ecology and Management of Inland Waters.* 40(2), 140–147.

Beck, J. N. y Sneddon, J., 2000. Use of atomic absorption spectrometry for the determination of metals in sediments in south-west Louisiana. *Microchemical journal*, 66(1), 73-113.

Belzile, N., Joly, H. A. y Li, H., 1997. Characterization of humic substances extracted from Canadian lake sediments. *Canadian journal of chemistry*, *75*(1), 14-27.

Benison, K. C., Bowen, B. B., Oboh-Ikuenobe, F. E., Jagniecki, E. A., LaClair, D. A., Story, S. L. y Hong, B. Y., 2007. Sedimentology of acid saline lakes in southern Western Australia: newly described processes and products of an extreme environment. *Journal of Sedimentary Research*, 77(5), 366-388.

Berkovic, A.M., García Einschlag, F.S., Gonzalez, M. C., Diez, R.P. y Mártire, D.O., 2013. Evaluation of the Hg 2+ binding potential of fulvic acids from fluorescence excitation–emission matrices. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(2), 384-392.

Bertin, C. y Bourg, A. C., 1995. Trends in the heavy metal content (Cd, Pb, Zn) of river sediments in the drainage basin of smelting activities. *Water Research*, 29(7), 1729-1736.

Bidoglio, G., Ferrari, D., Selli, E., Sena, F. y Tamborini, G., 1997. Humic acid binding of trivalent Tl and Cr studied by synchronous and time-resolved fluorescence. *Environmental science & technology*, 31(12), 3536-3543.

Bigatti, G., Sacristán, H., Rodríguez, M. C., Stortz, C. A. y Penchaszadeh, P. E., 2010. Diet, prey narcotization and biochemical composition of salivary glands secretions of the volutid snail Odontocymbiola magellanica. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *90*(05), 959-967.

Birchall, J. D., Exley, C., Chappell, J. S. y Phillips, M. J., 1989. Acute toxicity of aluminium to fish eliminated in silicon-rich acid waters. *Journal of theoretical Biology*, 151(3), 417-428.

Blaby-Haas, C.E. y Merchant, S.S., 2012. The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(9), 1531-1552.

Blaser, P.; Fluhler, H.; Polomski, J., 1980. Metal-binding properties of leaf litter extracts. 1. Discontinuous spectrophotometric titration with iron and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44, 709–716.

Blodau, C., Peine, A., Hoffmann, S. y Peiffer, S., 2000. Organic matter diagenesis in acidic mine lakes. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 28(3), 123-135.

Blokhina, O., Virolainen, E. y Fagerstedt, K. V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.

Blouin, A.C., 1989. Patterns of plankton species, pH and associated water chemistry in Nova Scotia lakes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 46(1-4), 343-358.

Blumreisinger, M., Meindl, D. y Loos, E., 1983. Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry*, 22(7), 1603-1604.

Boult, S., Collins, D. N., White, K. N. y Curtis, C. D., 1994. Metal transport in a stream polluted by acid mine drainage —the Afon Goch, Anglesey, UK. *Environmental Pollution*, 84(3), 279-284.

Bouveng, H.O., Fraser, R.N., Lindberg, B., 1967. polysaccharides elaborated by Armillaria mellea (Tricholomataceae). Part II. Water-soluble mycelium polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 4, 20-31.

Bowles, E. C.; Antweiler, R. C.; MacCarthy, P., 1989. Acid-base titration and hydrolysis of Suwannee River fulvic acid;Open File Report 87557; U.S. Geological Survey: Denver, CO; pp 205–230.

Brankatschk, R., 2007 Identification of phytoplankton from the acidic Lake Caviahue, Argentina. MS Thesis, Lancaster University, England.

Brassell, S.C., Lewis, C.A., De Leeuw, J.W., De Lange, F., Sinninghe–Damst, J.S., 1986. Isoprenoid thiophenes: novel diagenic products in sediments? Nature, 320, 160–162.

Brock, T.D., 1973. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. *Science*, 179(4072), 480-483.

Browne, B. A.; Driscoll, C. T., 1993. pH-dependent binding of aluminum by a fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.*, 27, 915–922.

Buffle, J., 1977. Les substances humiques et leurs interactions avec les ions mineraux. In *Conference Proceedings de la Commission d'Hydrologie Appliquee de I'A.G.H.T.M.* L'Universite d'Orsay, pp. 3-10.

Butler, I. B., Rickard, D., 2000. Framboidal pyrite formation via the oxidation of iron (II) monosulfide by hydrogen sulphide. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 64(15), 2665–2672.

Cabaniss, S.E., 1992. Synchronous fluorescence spectra of metal-fulvic acid complexes. *Environmental science & technology*, 26(6), 1133-1139.

Cabaniss, S. E., & Shuman, M. S., 1986. Combined ion selective electrode and fluorescence quenching detection for copper-dissolved organic matter titrations. *Analytical Chemistry*, *58*(2), 398-401.

Calmano, W., Ahlf, W. y Bening, J.C., 1992. Chemical mobility and bioavailabity of sediment-bound heavy metals influenced by salinity. *Hydrobiologia*, 235(1), 605-610.

Campbell, P.G.C., 1995. Interactions Between Trace Metals and Aquatic Organisms: A Critique of the Free Ion Activity Model. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Eds: Tessier, A. y Turner, D.R. Vol. 3. New York: John Wiley & Sons, Incorporated, pp 45-102.

Campbel, P.G.C. y Stokes, P.M., 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(12), 2034-2049.

Campbell, P.G.C., Twiss, M.R. y Wilkinson, K.J., 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal Fish eries and Aquatic Science*, 54, 2543–2554.

Canfield, D.E., Raiswell, R., Westrich, J.T., Reaves, C.M. y Berner, R.A., 1986. The use of chromium reduction in the analysis of reduced inorganic sulfur in sediments and shales. *Chemical geology*, 54(1), 149-155.

Carter M. (Ed.) 1993, Soil sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Science. Lewis Pub., p. 823.

Chang Chien, S. C., Wang, M. C., y Huang, C. C. Reactions of compost-derived humic substances with lead, copper, cadmium, and zinc. Chemosphere, 64, 1353–1361.

Chao, T. T., 1984. Use of partial dissolution techniques in geochemical exploration. *Journal of Geochemical Exploration.* 20(2), 101–135.

Chen, C. Y., Lin, K. C. y Yang, D. T., 1997. Comparison of the relative toxicity relationships based on batch and continuous algal toxicity tests. *Chemosphere*, 35(9), 1959-1965.

Chen, W.; Westerhoff, P.; Leenheer, J. A. y Booksh, K, 2003. Fluorescence excitation−emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. Environ. Sci. Technol. , 37, 5701−5710.

Chirita, P., 2007. A kinetic study of hydrogen peroxide decomposition in presence of pyrite. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 21(3), 257-264.

Chiriţă, P., 2009. Hydrogen peroxide decomposition by pyrite in the presence of Fe (III)-ligands. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 23(3), 259-265.

Christl, I., Milne, C.J., Kinniburgh, D. y Kretzschmar, R., 2001. Relating ion binding by filvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 2. Metal Binding. *Environmental Science & Technology*, 35, 2512:2517.

Ciancia, M., Alberghina, J., Arata, P. X., Benavides, H., Leliaert, F., Verbruggen, H. y Estevez, J.M. , 2012. Characterization of cell wall polysaccharides of the coenocytic green seaweed Bryopsis plumosa (Bryopsidaceae, Chlorophyta) from the Argentine coast. *Journal of Phycology,* 48, 326–335.

Coble P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51: 325–346.

Coble, P.G., Green, S.A., Blough, N.V. y Gagosian, R.B., 1990. Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature* 348: 432–435.

Cordeiro, L.M., Reis, R.A., Tischer, C.A., Gorin, P.A., Ferreira, J.C. y Iacomini, M., 2003. Linear β-mannose-containing polysaccharide, β-xylan, and amylose from the cultured photobiont Trebouxia sp. of the ascolichen Ramalina celastri. *FEMS microbiology letters*, 220(1), 89-94.

Cordeiro, L. M., Carbonero, E. R., Sassaki, G. L., Reis, R. A., Stocker-Wörgötter, E., Gorin, P. A. y Iacomini, M., 2005. A fungus-type β-galactofuranan in the cultivated Trebouxia photobiont of the lichen Ramalina gracilis. *FEMS microbiology letters*, 244(1), 193-198.

Cordeiro, L. M., Sassaki, G. L. y Iacomini, M., 2007. First report on polysaccharides of Asterochloris and their potential role in the lichen symbiosis. *International journal of biological macromolecules*, 41(2), 193-197.

Cordeiro, L. M., de Oliveira, S. M., Buchi, D. F. y Iacomini, M., 2008. Galactofuranose-rich heteropolysaccharide from Trebouxia sp., photobiont of the lichen Ramalina gracilis and its effect on macrophage activation. *International journal of biological macromolecules*, 42(5), 436-440.

Costas, E., Nieto, B., Lopez-Rodas, V., Salgado, C. y Toro, M., 1998. Adaptation to competition by new mutation in clones of Alexandrium minutum. *Evolution*, 52, 610-613.

Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L. M., Agrelo, M., Garcia-Villada, L., Juste, J. y López-Rodas, V., 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of Dictyosphaerium chlorelloides (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea herbicide. *Phycologia*, 40(5), 391-398.

Csatorday, K., Gombos, Z. y Szalontai, B., 1984. Mn2+ and Co2+ toxicity in chlorophyll biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(2), 476-478.

Davis, C. B., Hartnell, R. D., Madge, P. D., Owen, D. J., Thomson, R. J., Chong, A. K. y Von Itzstein, M., 2007. Synthesis and biological evaluation of galactofuranosyl alkyl thioglycosides as inhibitors of mycobacteria. *Carbohydrate research*, 342(12), 1773-1780.

de-Bashan, L.E. y Bashan, Y., 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611-1627.

de Vos C.H.R., Vonk M.J., Vooijs R. y Schat H., 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in Silene cucubalus. *Plant Physiology,* 98:853–858.

Delmelle, P. y Bernard, A., 1994. Geochemistry, mineralogy, and chemical modeling of the acid crater lake of Kawah Ijen Volcano, Indonesia. *Geochimica et cosmochimica acta.* 58(11), 2445–2460.

Delpino, D., Varekamp, J.C. y Bermudez, A., 1997. Influencia de un sistema volcanico activo sobre un lago de origen glacial: Lago Caviahue, Neuquen, Argentina. *Proceedings of 7th International Conference on Lakes Conservation and Management*, Bariloche, Argentina. pp. 1–4.

Desai, M. V. M., y Ganguly, A. K., 1970. *Interaction of trace elements with the organic constituents in the marine environment*. Bhabha Atomic Research Centre, Bombay (India).

Devesa–Rey, R., Díaz–Fierros, F., Barral, M.T., 2010. Trace metals in river bed sediments: An assessment of their partitioning and bioavailability by using multivariate exploratory analysis. *Journal of environmental*

management. 91(12), 2471–2477.

Diaz, M. M. y Pedrozo, F. L., 1996. Nutrient limitation in Andean-Patagonian lakes at latitude 40-41 S. *Archiv für Hydrobiologie*, 138(1), 123-143.

Diaz, M., Pedrozo, F., Reynolds, C., Temporetti, P. 2007. Chemical composition and the nitrogen–regulated trophic state of Patagonian lakes. *Limnologica–Ecology and Management of Inland Waters*, 37(1), 17–27.

Dimitrijevic, M., Antonijevic, M. M. y Jankovic, Z., 1996. Kinetics of pyrite dissolution by hydrogen peroxide in perchloric acid. *Hydrometallurgy*, 42(3), 377-386.

Domozych, D. S., Ciancia, M., Fangel, J. U., Mikkelsen, M. D., Ulvskov, P. y Willats, W. G., 2007. The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Current challenges in plant cell walls*, 73.

Domozych DS, Sørensen I, Willats WGT., 2009. The distribution of cell wall polymers during antheridium development and spermatogenesis in the charophycean green alga, Chara corallina. *Annals of Botany*, 104:1045–56

Domozych, D. S. y Domozych, C. E., 2014. Multicellularity in green algae: upsizing in a walled complex. *Frontiers in plant science*, 5, 1-8.

Driscoll, C. T., Baker, J. P., Bisogni, J. J. y Schofield, C. L., 1980. Effect of aluminium speciation on fish in dilute acidified waters. *Nature*, 284, 161-164.

Driscoll, C.T., 1984. A procedure for the fractionation of aqueous aluminium in dilute acidic waters. Int. J. Environ. *Analytical Chemistry*, 16, 267-283.

Dubois, M.; Gilles K.A.; Hamilton J.K.; Rebers P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 28: 350–356.

Engebretson R. R. y Von Wandruszka, R., 1994. Microorganization in dissolved humic acids. *Environmental Science and Technology*, 28: 1934-1941.

Engebretson, R. R., Amos, T. y von Wandruszka, R., 1996. Quantitative approach to humic acid associations. *Environmental science & technology*, 30(3), 990-997.

Ephraim J.H., Pettersson, C., Nordén, M. y Allard, B., 1995. Potentiometric titrations of humic substances: Do ionic strength effects depend on the molecular weight? *Environmental Science and Technology*, 29: 622–628.

Esteves da Silva, J.C.G., Machado, A.A.S.C. y Garcia, T.M.O., 1995. Beryllium(II) as a probe for study of the interactions of metals and fulvic acids by synchronous fluorescence spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 49, 1500-1506.

Esteves da Silva, J.C.G. y Machado, A.A.S.C., 1996. Interaction of fulvic acids with Al(III) studied by self-modeling curve resolution of second-derivative fluorescence spectra. *Applied spectroscopy*, 50, 436-443.

Esteves da Silva, J.C.G.; Machado, A.A.S.C.; Oliveira, C. J. S.; Pinto, M.S.S.D.S., 1998. Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu(II), Fe(III) and UO_2^{2+} . *Talanta*, 45, 1155– 1165.

Estevez, J. M, Kasuli, L., Fernandez, P. V., Dupree, P. y Ciancia, M. , 2009. Chemical in situ characterization of macromolecular components of the complex cell walls from the coenocytic green alga Codium fragile. *Glycobiology* 18, 250–259.

Fairey, R., Long, E.R., Roberts, C.A., Anderson, B.S., Phillips, B.M., Hunt, J.W., Puckett, H.R. y Wilson, C.J., 2001. An evaluation of methods for calculating mean sediment quality guideline quotients as indicators of contamination and acute toxicity to amphipods by chemical mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20:2276-2286.

Fangel, J.U., Pedersen, H.L., Vidal-Melgosa, S., Ahl, L.I., Salmean, A.A., Egelund, J. y Willats, W.G., 2012. Carbohydrate microarrays in plant science. In *High-Throughput Phenotyping in Plants*. Humana Press, pp. 351-362.

Fellman, J.B., Hood, E. y Spencer, R.G.M., 2010. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: a review. *Limnology and Oceanography*, 55: 2452–62.

Ferdelman, T. G., Church, T. M. y Luther, G. W., 1991. Sulfur enrichment of humic substances in a Delaware salt marsh sediment core. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55(4), 979-988.

Fichot C.G. y Benner R., 2012 The spectral slope coefficient of chromophoric dissolved organic matter (S275–295)asa tracer of terrigenous dissolved organic carbon in river–influenced ocean margins. Limnol Oceanogr, 57(5): 1453–1466.

Filip, Z., Alberts, J. J., Cheshire, M. V., Goodman, B. A. y Bacon, J. R., 1988. Comparison of salt marsh humic acid with humic-like substances from the indigenous plant species Spartina alterniflora (Loisel). *Science of the total environment*, 71(2), 157-172.

Fillisetti–Cozzi, T. M.. C. y Carpita, N. C. 1991. Measurement of uronic acids with interference form neutral sugars. Analyt. Biochem. 197: 157–162.

Flaig, W., 1960. Comparative chemical investigations on natural humic compounds and their model substances. In *Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society, Series A*, pp. 149-162.

Florence, T.M., Powell, H.K.J., Stauber, J.L. y Town, R.M., 1992. Toxicity of lipid-soluble copper (II) complexes to the marine diatom Nitzschia closterium: amelioration by humic substances. *Water Research*, 26(9), 1187-1193.

Folsom, B. R., Popescu, N. A. y Wood, J. M., 1986. Comparative study of aluminum and copper transport and toxicity in an acid-tolerant freshwater green alga. *Environmental science & technology*, 20(6), 616-620.

Fooken, U. y Liebezeit, G., 2000. Distinction of marine and terrestrial origin of humic acids in North Sea surface sediments by absorption spectroscopy. *Marine Geology*, *164*(3), 173–181.

Förstner, U., Wittmann, G.T.W., 1983. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer Science & Business Media.

Francois, R., 1987. A study of the extraction conditions of sedimentary humic acids to estimate their true in situ sulfur content. *Limnol. Oceanogr*, 32(4), 964-972.

Franklin, N. M., Stauber, J. L., Markich, S. J. y Lim, R. P., 2000. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (Chlorella sp.). *Aquatic toxicology*, 48(2), 275-289.

Friese, K., Wendt–Potthoff, K., Zachmann, D. W., Fauville, A., Mayer, B., Veizer, J., 1998. Biogeochemistry of iron and sulfur in sediments of an acidic mining lake in Lusatia, Germany. *Water, Air, and Soil Pollution.* 108(3–4), 231–247.

Fu, P. Q., Wu, F. C., y Liu, C. Q., 2004. Fluorescence exitation-emission matrix characterization of a commercial humic acid. *Chinese Journal of Geochemistry*, 23(4), 309-318.

Fu, P.Q., Liu, C.Q. y Wu, F.C., 2005. Three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopic characterization of dissolved organic matter. *Chinese Journal of Geochemistry*, 23 (4), 309-318.

Fuchs, W., 1930. Huminsauren. *Kolloid Z*, 52, 248-252;

Fuchs, W., 1931. *Die Chemie der Kohle*. Springer, Berlin, 53, 124-126.

Fukuda, K. y Hamada, A., 1978. 3-O-Methylgalactose found in polysaccharides of Lampteromyces japonicus. *Biochimica et Biophysica Acta* 544, 445–447.

Gaedke, U. y Kamjunke, N., 2006. Structural and functional properties of low-and high-diversity planktonic food webs. *Journal of Plankton Research*, 28(7), 707-718.

Galán, E., Gómez-Ariza, J. L., González, I., Fernández-Caliani, J. C., Morales, E., y Giráldez, I., 2003. Heavy metal partitioning in river sediments severely polluted by acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt. *Applied Geochemistry*, 18(3), 409-421.

Gamble, D.S., Schnitzer, M. y Skinner, D.S., 1977. MnII-fulvic acid complexing equilibrium measurements by electron spin resonance spectrometry. *Canadian Journal of Soil Science*, 57, 47-53.

Gammons, C.H., Wood, S.A., Pedrozo, F., Varekamp, J.C., Nelson, B.J., Shope, C.L. y Baffico, G.D. 2005. Hydrogeochemistry and rare earth element behavior in a volcanically acidified watershed in Patagonia, Argentina. *Chemical Geology*, 222(3), 249–267.

Garcia–Mina, J. M., Sanchez–Diaz, M., Iniguez, J. 1995. The ability of several iron (II)–Humic complexes to provide available iron to plants under adverse soil conditions. In Abadia, J. (Ed), *Iron Nutrition in Soils and Plants*. Dordrecht, Netherlands. pp. 235–239.

Gardner, J. L. y Al-Hamdani, S. H., 1997. Interactive effects of aluminum and humic substances on Salvinia. *Journal of Aquatic Plant Management*, 35, 30-34.

Geller W, Klapper, H. y Schultze M 1998 Natural and anthropogenic sulfuric acidification of lakes. Acidic mining lakes: acid mine drainage, limnology and reclamation. Eds: Geller W, Klapper H y Salomons W. Springer, Berlin. pp. 3–14.

Gensemer, R.W., 1991. The effects of pH and aluminum on the growth of the acidophilic diatom Asterionella ralfsii var. americana. *Limnology and oceanography*, 36(1), 123-131.

Gensemer, R. W. y Playle, R. C., 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Critical reviews in environmental science and technology*, 29(4), 315-450.

Gerhardt, A., y Westermann, F., 1995. Effects of precipitations of iron hydroxides on Leptophlebia marginata (L.) (Insecta: Ephemeroptera) in the field. *Archiv fur Hydrobiologie. Stuttgart*, 133(1), 81-93.

Gerke, I. 1992. Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentration of citric acid. Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde 155, 339-343.

Gerke, J. y Hermann, R., 1992. Adsorption of orthophosphate to humic-Fe. Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde ZeitschriR fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde 155, 233-236.

Gerloff, G. C. y Skoog, F., 1957. Availability of iron and manganese in southern Wisconsin lakes for the growth of

Microcystis aeruginosa. *Ecology*, 3*8*(4), 552-556.

Ghosh K. y Schnitzer, M., 1980. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Science*. 129: 266–276.

Ghosh, K. y Schnitzer, M., 1979. UV and visible absorption spectroscopic investigations in relation to macromolecular characteristics of humic substances. *Journal of Soil Science*, 30, 735-745.

Gimmler, H., Treffny, B., Kowalski, M. y Zimmermann, U., 1991. The resistance of Dunaliella acidophila against heavy metals: the importance of the zeta potential. *Journal of plant physiology*, 138(6), 708-716.

Gimmler, H. y Weis, U., 1992. Dunaliella acidophila–life at pH 1.0. *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*, Capítulo 5, pp 99-133.

Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E. J., Soldi, M. S. y Sierra, M. M. D., 2004. Elemental compositions, FT-IR spectra and thermal behavior of sedimentary fulvic and humic acids from aquatic and terrestrial environments. *Geochemical Journal*, 38(3), 255-264.

Gledhill, M., Nimmo, M., Hill, S. J. y Brown, M. T., 1997. The toxicity of copper (II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. *Journal of Phycology*, 33(1), 2-11.

Gleyzes, C., Tellier, S., Astruc, M., 2002. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 21(6), 451–467.

Golterman, H.L., 1996. Fractionation of sediment phosphate with chelating compounds: a simplification, and comparison with other methods. *Hydrobiologia*, 335, 87-95.

Golterman, H.L., 2004. The Chemistry of Phosphate and Nitrogen Compounds in Sediments. *Kluwer Academic Publichers, London*, 280 pp.

Green, M.M., Blankenhorn, G. y Hart, H., 1975. Which starch fraction is water-soluble, amylose or amylopectin?. *Journal of Chemical Education*, 52, 11, 729-730.

Groot, C.J. y Golterman H.L., 1990. Secuential fractionation of sediment phosphate. *Hydrobiologia*, 192, 143-148.

Gross, S. y Robbins, E. I., 2000. Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. *Hydrobiologia*, 433(1-3), 91-109.

Guseva, K. A., 1939. The blooming of the Uchinskii reservoir. *Bull. Soc. Naturalistes, Moscow, Sect. Biol*, 48, 30-32.

Gyure, R. A., Konopka, A., Brooks, A. y Doemel, W., 1987) Algal and bacterial activities in acidic (pH 3) strip mine lakes. *Applied and environmental microbiology*, 53(9), 2069-2076.

Håkanson, L y Jansson, M., 1983. Principles of Lake Sedimentology. *Springer-Verlag, Heidelberg*, 316 pp.

Hall, R.L., Wood, E.J., Kamberling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegenthart, F.G., 1977. 3-O-Methyl sugars as constituents of glycoproteins. Identification of 3-O-methylgalactose and 3-O-methylmannose in pulmonate gastropod haemocyanins. *Biochemical Journal* 165, 173-176.

Hall JL., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53:1–11

Hayes, M.H.B. y Swift, R.S., 1978. The chemistry of soil organic colloids. In *The Chemistry of Soil Constituents.* Eds: Greenland, D.J. y Hayes, M.H.B.. Wiley-Interscience, New York, pp. 179-230.

He, Z., Ohno, T., Cade-Menun, B.J., Erich, M.S. y Honeycutt, C. W., 2006. Spectral and chemical characterization of phosphates associated with humic substances. *Soil Science Society American Journal*, 70, 1741.

Heckathorn, S. A., Mueller, J. K., LaGuidice, S., Zhu, B., Barrett, T., Blair, B. y Dong, Y., 2004. Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany*, 91(9), 1312-1318.

Heil, C.A., 2005. Influence of humic, fulvic and hydrophilic acids on the growth, photosynthesis and respiration of the dinoflagellate Prorocentrum minimum (Pavillard) Schiller. *Harmful Algae*, 4(3), 603-618.

Helliwell, S., Batley, G. E., Florence, T. M., and Lumsden, B. G., 1983. Speciation and toxicity of aluminum in a model freshwater. *Environmental Technology. Letters*, 4, 141–144.

Helms, J.R., Stubbins, A., Ritchie, J.D., Minor, E.C., Kieber, D.J. y Mopper, K., 2008. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 53: 955–69.

Henriksen, A. y Wright, R.F., 1978. Concentrations of heavy metals in small Norwegian lakes. *Water Research*, 12(2), 101-112.

Hering J.H., Morel F.M., 1988 Humic acid complexation of calcium and copper. *Environmental Science and Technology.* 22, 1234–1237.

Hieltjes, A.H. y Lijklema, L., 1980. Fractionation of inorganic phosphates in calcareous sediments. *Journal of Environmental Quality*, 9(3), 405–407.

Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollingher, U. y Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*, 35(2), 403-424.

Hirst, E.L., Hough, L., Jones, J.K.N., 1951. Constitution of the mucilage from the bark of *Ulmus fulva* (slippery elm mucilage). Part III. The isolation of 3-monomethyl-d-galactose from the products of hydrolysis. *Journal of the Chemical Society*, 323–325.

Hoffman, M., Jia, Z., Peña, M. J., Cash, M., Harper, A., Blackburn, A. R. y York, W.S., 2005. Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydrate Research*, 340(11), 1826-1840.

Hori, T., Sugita, M. y Shimizu, H., 1981. Identification of β-d-mannosylceramide in hepatopancreas of the fresh-water bivalve, Hyriopsis schlegelii. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 665(1), 170-173.

Hörnström, E., Harbom, A., Edberg, F. y Andren, C., 1995. The influence of pH on aluminium toxicity in the phytoplankton species Monoraphidium dybowskii and M. griffithii. *Water, Air, and Soil Pollution*, 85(2), 817-822.

Huerta–Diaz, M.A., Morse, J.W., 1990. A quantitative method for determination of trace metal concentrations in sedimentary pyrite. *Marine Chemistry.* 29, 119–144.

Huerta–Diaz, M.A., Morse, J.W., 1992. Pyritization of trace metals in anoxic marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 56(7), 2681–2702.

Hudson, R.J., y Morel, F. M.M., 1990. Iron transport in marine phytoplankton: Kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnology and Oceanography*, 35(5), 1002-1020.

Huffman, E. W. D., Stuber, H. A., (1985). Analytical methodology for elemental analysis of humic substances en *Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization.* Eds: Aiken, G.R., Mcknight, M.D., Wershaw, R.L. y MacCarthy, P. John Wiley & Sons, pp 433-456.

Hummel, J.P. y Dreyer, W.J., 1962. Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 63, 530-532.

Hur, J., Lee, D.H. y Shin, H.S., 2009. Comparison of the structural, spectroscopic and phenanthrene binding characteristics of humic acids from soils and lake sediments. *Organic Geochemistry*, 40(10), 1091-1099.

Ikegami, I., Nemoto, A. y Sakashita, K., 2005. The formation of Zn-Chl a in Chlorella heterotrophically grown in the dark with an excessive amount of Zn 2+.*Plant Cellular Physiology*, 46:729–735

Imai, A., Fukushima, T. y Matsushige, K., 1999. Effects of iron limitation and aquatic humic substances on the growth of Microcystis aeruginosa. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(10), 1929-1937.

Immerzeel, P. y Pauly, M., 2006. profiling methods for the analysis of cell wall polysaccharides. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 36(1), 145-155.

International Copper Association, 2000. The biotic Ligand Model, A Computational Approach for Assessing the Ecological Effect of Metals in Aquatic Systems. Internatioanl Copper Association.

Irving, H.M.N.H. y Williams, R. J. P., 1953. The stability of transition-metal complexes. *Journal of the Chemical Society*, 637, 3192–3210.

Ishiwatari, R., 1973. Chemical characterization of fractionated humic acids from lake and marine sediments. *Chemical Geology*, 12(2), 113-126.

Ishiwatari, R. (1985). Geochemistry of humic substances in lake sediments. En *Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization.* Eds: Aiken, G.R., Mcknight, M.D., Wershaw, R.L. y MacCarthy, P. John Wiley & Sons, pp 147-180.

Jackson, T.A. y Bistricki, T., 1995. Selective scavenging of copper, zinc, lead, and arsenic by iron and manganese oxyhydroxide coatings on plankton in lakes polluted with mine and smelter wastes: results of energy dispersive X-ray micro-analysis. *Journal of Geochemical Exploration*, 52(1), 97-125.

Ji, Z.G., 2008. *Hydrodynamics and water quality: modeling rivers, lakes, and estuaries*. John Wiley & Sons.

Jin, X., Wang, S., Zhao, H., Zhou, X., Wu, F. 2008. Effect of organic matter on DOM sorption on lake sediments. *Environmental geology.* 56(2), 391–398.

Johnson, D.B., 2008. Biodiversity and interactions of acidophiles: Key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 18: 1367-1373.

Juárez, Á.B., Vélez, C.G., Iñiguez, A.R., Martínez, D.E., Rodríguez, M.C., Vigna, M.S., y Ríos de Molina, M.D.C., 2011. A Parachlorella kessleri (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. *Phycologia*, 50(4), 413-421.

Juo, A.S. y Barber, S.A., 1969. Reaction of strontium with humic acid. *Soil Science*, *108(*2), 89-94.

Kalin, M. y Geller, W., 1998. Limnological fundamentals of acid mining lakes. In *Acidic Mining Lakes*, Springer Berlin Heidelberg. pp. 423-425.

Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D. y Albersheim, P., 1973. The structure of plant cell walls III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant physiology*, 51(1), 188-197.

Keller, A.A., Garner, K., Miller, R.J., y Lenihan, H.S., 2012. Toxicity of nano-zero valent iron to freshwater and marine organisms. *PloS One*, 7(8), e43983.

Kelley, B. y Tuovinhen, O., 1988. Microbiological oxidations of minerals in mine tailings. In *Chemistry and Biology of Solid Waste*, ed. W. Salomons & U. Forstner. *Springer Verlag*, New York, pp. 3244.

Khangarot, B.S. y Rathore, R.S., 2003. Effects of copper on respiration, reproduction, and some biochemical parameters of water flea Daphnia magna Straus. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 70(1), 0112-0117.

Kim, J.Y., Park, H.J., Lee, C., Nelson, K.L., Sedlak, D.L. y Yoon, J., 2010. Inactivation of Escherichia coli by nanoparticulate zerovalent iron and ferrous ion. *Applied and environmental microbiology*, 76(22), 7668-7670.

Kinniburgh, D.G., Milne, C.J., Benedetti, M.F., Pinheiro, J.P., Filius, J., Koopal, L.K. y Van Riemsdijk, W. H.,1996. Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan model. *Environmental Science & Technology*, 30(5), 1687-1698.

Kinniburgh, D.G., van Riemsdijk, W.H., Koopal, L.K., Borkovec, M., Benedetti, M.F. y Avena, M.J., 1999. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 151(1), 147-166.

Kirschbaum, A., Murray, J., Arnosio, M., Tonda, R. y Cacciabue, L., 2012. Pasivos ambientales mineros en el noroeste de Argentina: aspectos mineralógicos, geoquímicos y consecuencias ambientales. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 29(1), 248-264.

Kloster, N., Brigante, M., Zanini, G. y Avena, M., 2013. Aggregation kinetics of humic acids in the presence of calcium ions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 427, 76-82.

Knauer, K. y Buffle, J., 2001. Adsorption of fulvic acid on algal surfaces and its effect on carbon uptake. *Journal of Phycology*, 37(1), 47-51.

Kohnen, M.E.L., Sinninghe–Damsté, J.S., Kock Van–Dalen, A.C., Ten Haven, H.L., Rullkoetter, J., De leeuw, J.W., 1990. Origin and diagenic transformation of CzS and CzO highly branched isoprenoid sulphur compounds: further evidence for the formation of organically bound sulphur during early diagenesis. Geochim. Cosmochim. Acta, 54, 3053–3063.

Kononova M. M. 1966. Soil organic matter. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility. 544 páginas. Pergamonn Press, Oxford, UK.

Konradi, E. A., Frentiu, T., Ponta, M. y Cordos, E., 2005. Use of sequential Extraction to assess metal fractionation in soils from Bozanta Mare, Romania. *Acta Universitatis Cibiniensis Seria F Chemia*, 8(2), 5-12.

Koretsky, C. M., Cuellar, A., Haveman, M., Beuving, L., Shattuck, T., Wagner, M., 2008. Influence of Spartina and Juncus on saltmarsh sediments. II. Trace element geochemistry. *Chemical Geology.* 255(1), 100–113.

Koschorreck, M., Wendt–Potthoff, K., y Geller, W., 2003. Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina. *Environmental science and technology*, 37(6), 1159–1162.

Koschorreck, M., Wendt–Potthoff, K., Scharf, B. y Richnow, H. H., 2008. Methanogenesis in the sediment of the acidic Lake Caviahue in Argentina. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178(2), 197–204.

Kostić, I. S., Anđelković, T. D., Nikolić, R. S., Cvetković, T. P., Pavlović, D. D. y Bojić, A. L., 2013. Comparative study of binding strengths of heavy metals with humic acid. *Hemijska industrija*, 67(5), 773-779.

Koukal, B., Gueguen, C., Pardos, M. y Dominik, J., 2003. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga Pseudokirchneriella subcapitata. *Chemosphere*, 53(8), 953-961.

Krienitz, L., Takeda, H. y Hepperle, D., 1999. Ultrastructure, cell wall composition, and phylogenetic position of Pseudodictyosphaerium jurisii (Chlorococcales, Chlorophyta) including a comparison with other picoplanktonic green algae. *Phycologia*, 38(2), 100-107.

Krom, M. D. y Sholkovitz, E. R., 1978. On the association of iron and manganese with organic matter in anoxic marine pore waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(6), 607–611.

Kukkonen J., 1991. Effects of pH and natural humic substances on the accumulation of organic pollutants in two freshwater invertebrates. En: Lecture Notes in *Earth Sciences*. Eds: B. Allard, H. Borén y Grimvall, A. Springer-Verlag, Berlin, Alemania. pp. 413-22.

Kumada, K., 1955. *Absorption spectra of humic acids.* Soil Science Plant Nutrition. 1, 29-30.

Kwong, Y. T. J., Lawrence, J. R., 1998. Acid generation and metal immobilization in the vicinity of a naturally acidic lake in central Yukon Territory, Canada. En Acidic mining lakes: acid mine drainage. limnology and reclamation. *Springer,* Berlin. pp. 65–86.

Lahaye M, Jegou D, Buléon A., 1994. Chemical characteristics of insoluble glucans from the cell wall of the marine green alga Ulva lactuca (L.) Thuret. Carbohydr. Res. 262:115–25

Lahaye, M. y Robic, A., 2007. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* , 8, 1766–1774.

Lakowicz, J. R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed.; Springer: New York.

Last, W., 2001. Mineralogical Analysis of Lake Sediment. Tracking Environemental Change Using Lake Sediments. Vol. 2, Physical and Geochemical Methods. Eds: Last y Smol. Capítulo 6, 143-187.

Lee, Y.S. y Bartlett, R.J., 1976. Stimulation of plant growth by humic substances. *Soil Science Society of America Journal*, 40(6), 876-879.

Lesmes, L.E.,1996. Estudio de un factor de movilidad en geoquímica ambiental. *Environmental Geochemistry in Tropical Countries*, 2nd International Symposium. Cartagena, Colombia.

Lessmann, D., Fyson, A. y Nixdorf, B., 2000. Phytoplankton of the extremely acidic mining lakes of Lusatia (Germany) with pH≤ 3. *Hydrobiologia*, 433(1-3), 123-128.

Levery, S. B., Toledo, M. S., Straus, A. H. y Takahashi, H. K., 1998. Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen Paracoccidioides brasiliensis: an immunodominant β-galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. *Biochemistry*, 37(24), 8764-8775.

Li, X., Coles, B.J., Ramsey, M.H. y Thornton, I., 1994. Sequential extraction of soils for multielement analysis by ICP-AES. *Chemical Geology*, 124(1), 109-123.

Lindsey, M. E. y Tarr, M. A., 2000. Quantitation of hydroxyl radical during Fenton oxidation following a single addition of iron and peroxide. *Chemosphere*, 41(3), 409−417.

Linton, T. K., Pacheco, M. A., McIntyre, D. O., Clement, W. H. y Goodrich-Mahoney, J., 2007. Development of bioassessment-based benchmarks for iron. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(6), 1291-1298.

Loeffelman PH, Van Hassel JH, Arnold TE y Hendricks JC., 1986. A new approach for regulating iron in water quality standards. In Bahner RC, ed, Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, Eighth Symposium. STP 891-EB. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp 137–152.

Löhr, A.J., Sluik, R., Olaveson, M.M., Ivorra, N., Van Gestel, C.A. y Van Straalen, N.M., 2006. Macroinvertebrate and algal communities in an extremely acidic river and the Kawah Ijen crater lake (pH< 0.3), Indonesia. *Archiv für Hydrobiologie*, 165(1), 1-21.

Loos, E. y Meindl, D., 1982. Composition of the cell wall of Chlorella fusca. *Planta*, 156(3), 270-273.

López-Archilla, A. I., Marin, I. y Amils, R., 1995. Microbial ecology of an acidic river: biotechnological applications. *University of Chile, Santiago*, 63-73.

Lopez-Archilla, A. I., Moreira, D., López-García, P. y Guerrero, C., 2004. Phytoplankton diversity and cyanobacterial dominance in a hypereutrophic shallow lake with biologically produced alkaline pH. *Extremophiles*, 8(2), 109-115.

Loring, D.H., 1976. The distribution and partition of zinc, copper, and lead in the sediments of the Saguenay Fjord. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 13(7), 960-971.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. H.; Farr, A. L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275.

Lu, X. y Jaffe, R., 2001. Interaction between Hg (II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study. *Water Research*, 35(7), 1793-1803.

Luster, J.; Lloyd, T.; y Sposito, G., 1996. Multi-wavelength molecular fluorescence spectrometery for quantitative characterization of copper(II) and aluminum(III) complexation by dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 30, 1565–1574.

Luther G.W., Church, T.M., Scudlark, J.R. y Cosman, M., 1986. Inorganic and inorganic sulfur cycling in slt–marsh pore–water. Science, 232, 746–748.

Luther, G. W., Shellenbarger, P. A. y Brendel, P. J., 1996. Dissolved organic Fe (III) and Fe (II) complexes in salt marsh porewaters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(6), 951-960.

Luther Iii, G. W., Glazer, B., Ma, S., Trouwborst, R., Shultz, B. R., Druschel, G. y Kraiya, C., 2003. Iron and sulfur chemistry in a stratified lake: Evidence for iron-rich sulfide complexes. *Aquatic Geochemistry*, 9(2), 87-110.

Ma, L., Lowenstein, T. K., Russell, J. M., 2011. A brine evolution model and mineralogy of chemical sediments in a volcanic crater, Lake Kitagata, Uganda. *Aquatic geochemistry.* 17(2), 129–140.

Ma, M., Zhu, W., Wang, Z. y Witkamp, G.J., 2003. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (Scenedesmus subspicatus 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology*, *63*(3), 221-228.

MacCarthy, P. y O'Cinneide, S., 1974. Fulvic acid 1: Partial fractionation. *Journal of Soil Science*, 25(4), 420-428.

MacCarthy, P. y Rice, J.A., 1988. In *Proceedings of Chapman Conference on the Gaia Hypothesis*, San Diego, CA, March 7-11, Eds: Schneider, S H., Boston, P.J. MIT Press: Cambridge, 1990; pp 339-345.

Maes, A., Tits, J., Mermans, G. y Dierckx, A., 1992. Measurement of the potentially available charge and the dissociation behaviour of humic acid from cobaltihexammine adsorption. *Journal of soil science*, *43*(4), 669-677.

Magdaleno, A., Puig, A., De Cabo, L., Salinas, C., Arreghini, S., Korol, S. y Moretton, J., 2001. Water pollution in an urban Argentine river. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 67(3), 0408-0415.

Malcom, 1985. Geochemistry of Stream Fulvic and Humic Substances, en *Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization.* Eds: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L. y MacCarthy, P. John Wiley & Sons, pp 181-210

Malo, B.A., 1977. Partial extraction of metals from aquatic sediments. *Environmental Science & Technology*, 11(3), 277-282.

Mantoura, R.F.C. y Riley, J.P., 1975. The use of gel filtration in the study of metal binding by humic acids and related compounds. *Analytica Chimica Acta*, 78, 193-200.

Margalef, M., 1983. Limnología. Ediciones Omega, Barcelona.

Martınez, M.E., Sánchez, S., Jimenez, J.M., El Yousfi, F. y Munoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga Scenedesmus obliquus. *Bioresource technology*, 73(3), 263-272.

Mayer, 1985. Geochemistry of Humic Substances in Estuarine Environments, en *Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization.* Eds: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L. y MacCarthy, P. John Wiley & Sons, pp 211-232.

MacCarthy, P. y Rice, J. A., 1985. Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. En *Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization.* Eds: Aiken, G.R., Mcknight, M.D., Wershaw, R.L. y MacCarthy, P. John Wiley & Sons, pp 529-560.

McCarthy, J.F. y Zachara, J.M., 1989. Subsurface transport of contaminants. *Environmental Science & Technology*, 23(5), 496-502.

McDonald, S., Bishop, A.G., Prenzler, P.D. y Robards, K., 2004. Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 527(2), 105-124.

McIntyre, A. M., & Guéguen, C., 2013. Binding interactions of algal-derived dissolved organic matter with metal ions. *Chemosphere*, 90(2), 620-626.

Meyer, J. L. y Tate, C. M., 1983. The effects of watershed disturbance on dissolved organic carbon dynamics of a stream. Ecology 64, 33-44.

Meyers, P. A. e Ishiwatari, R., 1993. Lacustrine organic geochemistry—an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic geochemistry*, 20(7), 867-900.

Meyers, P. A. y Ishiwatari, R., 1995. Organic matter accumulation records in lake sediments. In *Physics and chemistry of lakes*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 279-328.

Miano, T.M., Martin, J.P. y Sposito, G., 1988. Flourescence Spectroscopy of Humic Substances. *Soil Science Society of America Journal*, 52(4), 1016-1019.

Miller M.P., McKnight D.M., Cory R.M., Williams M.W. y Runkel R.L., 2006. Hyporheic exchange and fulvic acid redox reactions in an alpine stream. *Environmental Science and Technology*, 40: 5943–5949.

Miller, C.J., Rose, A. L. y Waite, T.D., 2013. Hydroxyl radical production by H2O2-mediated oxidation of Fe (II) complexed by Suwannee River fulvic acid under circumneutral freshwater conditions. *Environmental science & technology*, 47(2), 829-835.

Morse, J. W., Millero, F. J., Cornwell, J. C. y Rickard, D., 1987. The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural waters. *Earth-Science Reviews*, 24(1), 1-42.

Morse, J.W., & Luther, G.W., 1999. Chemical influences on trace metal-sulfide interactions in anoxic sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19), 3373-3378.

Morris, O.P. y Russell, G., 1973. Effect of chelation on toxicity of copper. *Marine Pollution Bulletin*, 4(10), 159-160.

Morrison, I. M., 1988. Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. *Phytochemistry*, *27*(4), 1097–1100.

Moulin, V., Robouch, P. y Vitorge, P., 1987. Spectrophotometric study of the interaction between americium(III) and humic materials. *Inorganica Chimica Acta*, 140, 303-306.

Mounier, S., Zhao, H., Garnier, C. y Redon, R., 2011. Copper complexing properties of dissolved organic matter: PARAFAC treatment of fluorescence quenching. *Biogeochemistry*, 106(1), 107-116.

Murhpy, J. y Riley, J.P., 1962. A Modified Single Solution Method for Determination of Phosphate in Natural Waters.

Analytica Chimica Acta, 27, 31-36.

Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F., y Nardi, S., 1999. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on Daucus carota cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(9), 1303-1311.

Nalewajko, C., Colman, B. y Olaveson, M., 1997. Effects of pH on growth, photosynthesis, respiration, and copper tolerance of three Scenedesmus strains. *Environmental and experimental botany*, *37*(2), 153-160.

Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., y Vianello, A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1527-1536.

Nava-López, C. y Huerta-Díaz, M. Á., 2001. Grado de piritización de metales traza en sedimentos de la costa del Pacífico de Baja California, México. *Ciencias Marinas*, *27*(2), 289-309.

Nemcova, Y., 2003. Detection of cell wall structural polysaccharides by cellulase-gold and chitinase-gold complexes. *Czech Phycology, Olomouc, 3, 31-36*

Nielsen, T. y Ekelund, N. G., 1993. Effect of UV-B radiation and humic substances on growth and motility of Gyrodinium aureolum. *Limnology and oceanography*, 38(7), 1570-1575.

Nifant'Eva, T. I., Burba, P., Fedorova, O., Shkinev, V. M., & Spivakov, B. Y. (2001). Ultrafiltration and determination of Zn–and Cu–humic substances complexes stability constants. *Talanta*, *53*(6), 1127-1131.

Nishikawa, K. y Tominaga, N., 2001. Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga, Chlamydomonas acidophila (Chlorophyta). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(12), 2650-2656.

Nissenbaum, A. y Kaplan, I.R., 1972. Chemical and isotopic evidence for the in situ origin of marine humic substances. *Limnology and Oceanography*, 17(4), 570-582.

Nissenbaum, A., Swaine, D. J., 1976. Organic matter–metal interactions in recent sediments: the role of humic substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 40(7), 809–816.

Nordstrom, D.K. y May, H.M., 1996. Aqueous equilibrium data for mononuclear aluminum species. *The environmental chemistry of aluminum*, 2, 39-80.

Novotny, V., 1995. Diffuse sources of pollution by toxic metals and impact on receiving waters. In *Heavy Metals, Problems and Solutions*, Eds: Salomons W., Förstner, U. y Mader, P. Springer Berlin Heidelberg, pp. 33-52.

O'Connor, D.J., 1988. Models of sorptive toxic substances in freshwater systems. I: Basic equations. *Journal of environmental engineering.* 114(3), 507–532.

O'Reillly, J.E. y Dow, D.D, 2015. Phytoplankton and primary production, background/data sources. En Northeast Fisheries Science Center Reference Document 06-15, pp 8-14.

O'Rourke, C., Gregson, T., Murray, L., Sadler, I.H. y Fry, S.C., 2015. Sugar composition of the pectic polysaccharides of charophytes, the closest algal relatives of land-plants: presence of 3-O-methyl-d-galactose residues. *Annals of botany*, mcv089.

Ogawa, K., Yamaura, M., Maruyama, I., 1994. Isolation and identification of 3-O-methyl-d-galactose as a constituent of neutral polysaccharide of Chlorella vulgaris. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 58, 942–944.

Ohle, W., 1935. Organische Kolloide in ihrer Wirkung auf den Stoffhaushalt der Gewässer. *Naturwissenschaften*, 23(26), 480-484.

Ohno, T., Amirbahman, A. y Bro, R. (2008). Parallel factor analysis of excitation–emission matrix fluorescence spectra of water soluble soil organic matter as basis for the determination of conditional metal binding parameters. *Environmental science & technology*, 42(1), 186-192.

Olaveson, M.M. y Stokes, P.M., 1989. Responses of the acidophilic alga euglena mutabilis (euglenophyceae) to carbon enrichment at pH 3. *Journal of Phycology*, 25(3), 529-539.

Olsen, E.D., 1975. Modern Optical Methods of Analysis. McGraw-Hill, New York, 629 pp.

Omarsdottir, S., Freysdottir, J. y Olafsdottir, E. S., 2007. Immunomodulating polysaccharides from the lichen Thamnolia vermicularis var. subuliformis. *Phytomedicine*, 14(2), 179-184.

Orlov, D. S., 1990. Soil Humic Acids of soils and General Theory of Humification. AA Bakema, pp 323.

Orsetti, S., Marco-Brown, J. L., Andrade, E. M. y Molina, F. V., 2013. Pb (II) binding to humic substances: an equilibrium and spectroscopic study. *Environmental science & technology*, 47(15), 8325-8333.

Paciolla, M. D., Davies, G. y Jansen, S. A., 1999. Generation of hydroxyl radicals from metal-loaded humic acids. *Environmental science & technology*, 33(11), 1814-1818.

Paciolla, M. D., Kolla, S. y Jansen, S. A., 2002. The reduction of dissolved iron species by humic acid and subsequent production of reactive oxygen species. *Advances in environmental research*, *7(*1), 169-178.

Page, S. E., Sander, M., Arnold, W. A., & McNeill, K. (2012). Hydroxyl radical formation upon oxidation of reduced humic acids by oxygen in the dark. *Environmental science & technology*, *46*(3), 1590-1597.

Painter TJ. 1983. Algal polysaccharides. In The Polysaccharides, ed. Aspinall, GO, 2, 195–285. New York: Academic.

Pakrashi, S., Dalai, S., Prathna, T. C., Trivedi, S., Myneni, R., Raichur, A. M. y Mukherjee, A., 2013. Cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles towards fresh water algal isolate at low exposure concentrations. *Aquatic Toxicology*, 132, 34-45.

Paludan, C. y Jensen, H. S., 1995. Sequential extraction of phosphorus in freshwater wetland and lake sediment: significance of humic acids. *Wetlands*, 15(4), 365-373.

Pandey, A. K., Pandey, S. D. y Misra, V., 2000. Stability constants of metal–humic acid complexes and its role in environmental detoxification. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(2), 195-200.

Parent, L., Twiss, M. R. y Campbell, P. G., 1996. Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga Chlorella: a test of the free-ion model of trace metal toxicity. *Environmental science & technology*, 30(5), 1713-1720.

Parent, L. y Campbell, P. G., 1994. Aluminum bioavailability to the green alga Chlorella pyrenoidosa in acidified synthetic soft water. *Environmental toxicology and chemistry*, 13(4), 587-598.

Parker, S.R., Gammons, C.H., Pedrozo, F.L. y Wood, S.A., 2008. Diel changes in metal concentrations in a geogenically acidic river: Rio Agrio, Argentina. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178(2), 213-223.

Paulsen, B.S., Vieira, A.A.H., Klaveness, D., 1992. Structure of extracellular polysaccharides produced by a soil Cryptomonas sp. (Cryptophyceae). *Journal of Phycology* 28, 61–63.

Paulsen, B.S., Aslaksen , T., Freire-Nordi, C.S. y Vieira, A.A.H., 1998. Extracellular polysaccharides from ankistrodesmus densus (chlorophyceae). *Journal of. Phycology* 34, 638–641.

Pedrozo, F., Chillrud, S., Temporetti, P., Diaz, M., 1993. Chemical composition and nutrient limitation in rivers and lakes of northern Patagonian Andes (39.5°–42° S – 71°W) (Rep. Argentina). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*. 25, 207–214.

Pedrozo, F.; Geller, W.; Beamud, G.; Woelfl, S.; Diaz, M.; Whitton, B.; Wenzel, M.; Kringel, R.; Schimmele, M.; Baffico, G.; Temporetti, P. y Mages, M. 2002. The acidic waters of the Copahue crater - Agrio River - Lake Caviahue system (Patagonia, Argentina). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, *28*: 112-113.

Pedrozo F., Kelly L., Diaz M., Temporetti P., Baffico G., Kringel R., Friese K., Mages M., Geller W. y Woelfl S., 2001. First results on the water chemistry. algae and trophic status of andean acidic lake system of volcanic origin in Patagonia (Lake Caviahue). *Hydrobiologia*. 452, 129–137.

Pedrozo F., Temporetti P., Beamud G., y Diaz M. 2008, Volcanic nutrient inputs and trophic state of Lake Caviahue, Patagonia, Argentina. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, Vol. 178, pp. 205–212.

Peng, Z. E., Wu, F. y Deng, N., 2006. Photodegradation of bisphenol A in simulated lake water containing algae, humic acid and ferric ions. *Environmental Pollution*, *144*(3), 840-846.

Peña, M. J., Darvill, A. G., Eberhard, S., York, W. S. y O'Neill, M. A., 2008. Moss and liverwort xyloglucans contain galacturonic acid and are structurally distinct from the xyloglucans synthesized by hornworts and vascular plants. *Glycobiology*, 18(11), 891-904.

Percival, E., 1979. The polysaccharides of green, red, and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal*, 14, 103–117.

Percival, E., Foyle, R.A.J., 1979. The extracellular polysaccharides of Porphyridium cruentum and Porphyridium aerugineum. *Carbohydrate Research* 72, 165–176.

Perdue, E.M. y Lytle, C.R., 1983. A distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances. *Environmental science & technology*, 17(11), 654-660.

Ritchie, J.D. y Perdue, E.M., 2002. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *67*(1), 85-96.

Perminova, I. V., Frimmel, F. H., Kudryavtsev, A. V., Kulikova, N. A., Abbt-Braun, G., Hesse, S. y Petrosyan, V. S., 2003. Molecular weight characteristics of humic substances from different environments as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation. *Environmental science and technology*, 37(11), 2477-2485.

Perreault, F., Dewez, D., Fortin, C., Juneau, P., Diallo, A. y Popovic, R., 2010. Effect of aluminum on cellular division and photosynthetic electron transport in Euglena gracilis and Chlamydomonas acidophila. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4), 887-892.

Pesce A. H. 1989, Evolución volcano–tectónica del complejo volcánico Copahue–Caviahue y modelo geotérmico preliminar. *Asoc. Geol. Arg*. XLIV Vol. 1–4, pp. 307–327.

Pflugmacher, S., Pietsch, C., Rieger, W. y Steinberg, C. E. W., 2006. Influence of structural moieties of dissolved organic matter on the photosynthetic oxygen production of aquatic plants. *Science of the Total Environment*, 357, 169-175.

Piccolo, A., 1988. Characteristics of soil humic extracts obtained by some organic and inorganic solvents and purified by hcl-hf treatment. *Soil Science*, 146(6), 418-426.

Piccolo, A., 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil science*, 166(11), 810-832.

Pick U (1999) Dunaliella acidophila – a most extreme acidophilic alga. En *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*. Ed; Seckbach J, Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, pp. 465-478.

Pinto, E., Sigaud-kutner, T., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D. y Colepicolo, P., 2003. Heavy metal–induced oxidative stress in algae1. *Journal of Phycology*, 39(6), 1008-1018.

Plaza, C.; Brunetti, G.; Senesi, N.; Polo, A., 2005. Proton binding to humic acids from organic amendments and amended soils by the NICA-Donnan model. *Environmental science and technology*, 39, 6692- 6697.

Plaza, C.; Brunetti, G.; Senesi, N.; Polo, A., 2006. Molecular and quantitative analysis of metal ion binding to humic acids from sewage sludge and sludge-amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environmental science and technology*, 40, 917–923.

Popper, Z. A., Sadler, I. H. y Fry, S. C., 2001. 3-O-Methyl-D-galactose residues in lycophyte primary cell walls. *Phytochemistry*, 57(5), 711-719.

Popper, Z. A. y Fry, S. C., 2005. Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Annals of Botany*, 96(1), 91-99.

Popper, Z. A. y Tuohy, M. G., 2010. Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls. *Plant physiology*, 153(2), 373-383.

Popper, ZA., Sadler IH. y Fry S., 2011. 3-O-Methyl-d-galactose residues in lycophyte primary cell walls . *Phytochemistry*, 57, 711–719.

Prakash, A., Rashid, M.A., Jensen, A. y Subba Rao, D.V., 1993. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: Diatoms. *Limnology and Oceanogrphy*, 18(4), 516-524.

Quirós, R. 1988 Relationships between air temperature, depth, nutrients and chlorophyll in 103 Argentinian lakes. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 23: 647- 658.

Rabassa, J., Bertani, L. y Pascuarelli, C., 1989 Geología de superficie y geomorfología del sector a desarrollarse con fines turísticos de la localidad Caviahue. Reporte Final. Neuquén.

Rai, L. C., Husaini, Y. y Mallick, N., 1998. pH-altered interaction of aluminium and fluoride on nutrient uptake, photosynthesis and other variables of Chlorella vulgaris. *Aquatic toxicology*, *42*(1), 67-84.

Rai, L.C. y Raizada, M., 1985. Effect of nickel and silver ions on survival, growth, carbon fixation and nitrogenase activity in Nostoc muscorum: Regulation of toxicity by EDTA and calcium. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 31(4), 329-337.

Rai, U. N. y Chandra, P., 1992. Accumulation of copper, lead, manganese and iron by field populations of Hydrodictyon reticulatum (Linn.) Lagerheim. *Science of the total environment*, 116(3), 203-211.

Rai, U. N., Tripathi, R. D., Vajpayee, P., Jha, V. y Ali, M. B., 2002. Bioaccumulation of toxic metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by seeds of Euryale ferox Salisb.(Makhana). *Chemosphere*, 46(2), 267-272.

Rainville, D.P. y Weber, J.H., 1982. Complexing capacity of soil fulvic-acid for Cu^{+2}, Cd^{+2}, Mn^{+2} and Zn^{+2} measured by dialysis titration — a model based on soil fulvic-acid aggregation. *Canadia Journal of Chemistry*, 60, 1-5.

Raiswell, R. y Berner, R. A., 1985. Pyrite formation in euxinic and semi-euxinic sediments. *American Journal of Science*, 285(8), 710-724.

Raiswell, R., Canfield, D. E., Berner, R. A., 1994. A comparison of iron extraction methods for the determination of degree of pyritisation and the recognition of iron–limited pyrite formation. *Chemical Geology.* 111(1), 101–110.

Ram, N. y Raman, K. V., 1984. Stability constants of complexes of metals with humic and fulvic acids under non-acid-conditions. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Brelaodenkunde*, *147*(2), 171-176.

Rapacioli R. A. 1985, Lago Caviahue y su Cuenca. *Reporte Técnico*,. EPAS, Neuquén province, p. 45.

Rendina, A., Bargiela, M., de Cabo, L., Arreghini, S. y de Iorio, A.F., 2001. Formas geoquímicas de metales pesados en sedimentos del Río Matanza y principales afluentes. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales, 3(1), 33-39.

Rendina, A., de Cabo, L., Arreghini, S., Bargiela, M. y de Iorio, A. F., 2001. Geochemical distribution and mobility factors of Zn and Cu in sediments of the Reconquista River, Argentina. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 17(4), 187-192.

Reyes–Solís, I.E., Solís, C., Isaac–Olive, K., García, N.E., Andrade. E., 2009. Fractionation analysis of trace metals of humic substances in soils irrigated with wastewater in Central Mexico by particle induced X–ray emission. *Microchemical Journal.* 91, 129–132.

Rickard, D., 1995. Kinetics of FeS precipitation: Part 1. Competing reaction mechanisms. *Geochimica et cosmochimica*

acta, 59(21), 4367-4379.

Ringuelet, R.A., 1962. Ecología Acuática Continental. EUDEBA, Buenos Aires.

Riseng, C.M., Gensemer, R.W. Y Kilham, S.S., 1991. The effect of pH, aluminum, and chelator manipulations on the growth of acidic and circumneutral species of Asterionella. *Water, Air, and Soil Pollution*, 60(3-4), 249-261.

Robinson, 1998. Immobilized Algal Technology for Wastewater Treatment Purposes, en *Wastewater treatment with algae*. Eds.Wong, Y.S. y Tam, N.F.Y. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp 1-12.

Rodrigues, M. A. y da Silva Bon, E. P., 2011. Evaluation of Chlorella (Chlorophyta) as source of fermentable sugars via cell wall enzymatic hydrolysis. *Enzyme research*, doi:4061/2011/405603.

Rodríguez, M.C. y Cerezo, A.S., 1996. The resistant 'biopolymer'in cell walls of Coelastrum sphaericum. *Phytochemistry*, 43(4), 731-734.

Rodríguez, M.C., Noseda, M.D. y Cerezo, A.S., 1999. The fibrillar polysaccharides and their linkage to algaenan in the trilaminar layer of the cell wall of Coelastrum sphaericum (Chlorophyceae). *Journal of phycology*, 35(5), 1025-1031.

Rodríguez, L., Ruiz, E., Alonso–Azcárate, J., Rincón, J., 2009. Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in Spain. *Journal of Environmental Management*. 90(2), 1106–1116.

Rothschild, L. J. y Mancinelli, R. L., 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101.

Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J. P. y Van Broock, M., 2006. Levaduras del Río Agrio y El Lago Caviahue, un ambiente acuático ácido de origen volcánico (Neuquén, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 41(3-4), 167-176.

Ryan, D. K. y Weber, J. H., 1982. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Analytical Chemistry*, 54(6), 986–990.

Ryan, D.K. y Weber, J.H., 1982. Copper(II) complexing capacities of natural waters by fluorescence quenching. *Environmental Science and. Technology*, 16, 866-872.

Saar, R.A. y Weber, J.H., 1980. Comparison of spectrofluorometry and ion-selective electrode potentiometry for determination of complexes between fulvic acid and heavy-metal ions. *Analytical Chemistry*, 52, 2095-2100.

Sabatini S.E., Juárez A.B., Eppis M.R., Bianchi L., Luquet C.M. y Ríos de Molina M.C. 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1200–1206.

Saçan, M. T. y Balcıoğlu, I. A., 2006. A case study on algal response to raw and treated effluents from an aluminum plating plant and a pharmaceutical plant. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(2), 234-243.

Sadiq, I. M., Pakrashi, S., Chandrasekaran, N. y Mukherjee, A., 2011. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al2O3) nanoparticles to microalgae species: Scenedesmus sp. and Chlorella sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3287-3299.

Sassaki, G. L., Ferreira, J. C., Glienke-Blanco, C., Torri, G., De Toni, F., Gorin, P. A. y Iacomini, M., 2002. Pustulan and branched β-galactofuranan from the phytopathogenic fungus Guignardia citricarpa, excreted from media containing glucose and sucrose. *Carbohydrate polymers*, 48(4), 385-389.

Satake, K., Oyagi, A. y Iwao, Y., 1995. Natural acidification of lakes and rivers in Japan: The ecosystem of Lake Usoriko (ph 3.4–3.8). *Water, Air and Soil Polluttion*, 85(2): 511-516.

Schecher, W.D. y McAvoy, D.C., 1992. MINEQL+: a software environment for chemical equilibrium modeling. *Computers, Environment and Urban Systems*, 16(1), 65-76.

Schiariti, A., Juárez, Á. B. y Rodríguez, M. C. (2004). Effects of sublethal concentrations of copper on three strains of green microalgae under autotrophic and mixotrophic culture conditions. *Algological Studies*, *114*(1), 143–157.

Schlautman M.A. y Morgan, J.J., 1993. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology*, 27: 961 – 969.

Schnitzer, M. y Skinner, S. I. M., 1963. Organo-metallic interactions in soils: 1. reactions between a number of metal ions and the organic matter of a podzol bh horizon. *Soil Science*, 96(2), 86-93.

Schnitzer, M. y Khan, S.U., 1972. *Humic Substances in the Environment*. Marcel Dekker, New York, 327 pp.

Schnitzer, M.; Hansen, E. H., 1970. Organo-metallic interactions in soils: An evaluation of methods for the determination of stability constants of metal-fulvic acid complexes. *Soil Sci.* 109, 333-340.

Senesi, N., 1990. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals: Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta*, 232, 77-106.

Senesi, N., Miano, T. M., Provenzano, M. R. y Brunetti, G., 1991. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, 152(4), 259-271.

Senesi, N. y Brunetti, G., 1996) Chemical and physico-chemical parameters for quality evaluation of humic substances produced during composting. En *The science of composting*, Ed: Epstein, E. Springer Netherlands, pp. 195-212.

Senesi, N., D'orazio, V. y Ricca, G., 2003. Humic acids in the first generation of EUROSOILS. *Geoderma*, 116(3), 325-344.

Shahid, M., Dumat, C., Silvestre, J., & Pinelli, E. (2012). Effect of fulvic acids on lead-induced oxidative stress to metal sensitive Vicia faba L. plant. *Biology and Fertility of Soils*, *48*(6), 689-697.

Shea, E.M. y Carpita, N.C., 1988. Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns. *Journal of Chromatography A*, 445, 424-428.

Shi, Y., Sheng, J., Yang, F. y Hu, Q., 2007. Purification and identification of polysaccharide derived from Chlorella pyrenoidosa. *Food chemistry*, 103(1), 101-105.

Shotyk, W.; Sposito, G., 1988. Fluorescence quenching and aluminum complexation by a chestnut leaf litter extract. *Soil Sci. Soc. Am. J.* , 52, 1293–1297.

Schultink, A., Liu, L., Zhu, L. y Pauly, M., 2014. Structural diversity and function of xyloglucan sidechain substituents. *Plants*, *3(*4), 526-542.

Sinninghe-Damsté, J., Ten Haven, H. L., De Leeuw, J. W. y Schenck, P. A., 1986. Organic geochemical studies of a Messinian evaporitic basin, northern Apennines (Italy)—II Isoprenoid and n–alkyl thiophenes and thiolanes. *Organic geochemistry*, 10(4), 791–805.

Sinha, S., Mallick, S., Misra, R.K., Singh, S., Basant, A. y Gupta, A.K., 2007. Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge- amended and contaminated soils: effect on lipid peroxidation, morphoanatomical changes and antioxidants. *Chemosphere*, 67, 176–187.

Sinha, S., Basant, A., Malik, A. y Singh, K. P., 2009. Iron-induced oxidative stress in a macrophyte: a chemometric approach. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(2), 585-595.

Slaveykova, V.I. y Wilkinson, K.J.,2002. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by Chlorella vulgaris. *Environmental science & technology*, 36(5), 969-975.

Slaveykova, V. I., Wilkinson, K. J., Ceresa, A. y Pretsch, E., 2003. Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by Chlorella kesslerii. *Environmental science & technology*, 37(6), 1114-1121.

Slaveykova, V.I. y Wilkinson, K.J., 2005. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environmental Chemistry*, 2(1), 9-24.

Slaveykova, V.I., 2007. Predicting Pb bioavailability to freshwater microalgae in the presence of fulvic acid: algal cell density as a variable. *Chemosphere*, 69(9), 1438-1445.

Southworth, B.A. y Voelker, B.M., 2003. Hydroxyl radical production via the photo-Fenton reaction in the presence of fulvic acid. *Environmental science & technology*, 37(6), 1130-1136.

Spencer, D.F. y Nichols, L.H., 1983. Free nickel ion inhibits growth of two species of green algae. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 31(2), 97-104.

Spijkerman, E., Barua, D., Gerloff-Elias, A., Kern, J., Gaedke, U. y Heckathorn, S.A., 2007. Stress responses and metal tolerance of Chlamydomonas acidophila in metal-enriched lake water and artificial medium. *Extremophiles*, 11(4), 551-562.

Springer, G.F., Takahashi, T., Desai, P.R., Kolecki, B.J., 1965. Cross reactive human blood-group H(O) specific polysaccharide from Sassafras albidum and characterization of its hapten. *Biochemistry* 4, 2099–2012.

Stedmon CA, Markager S y Bro R. 2003 Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*, 82: 239–254.

Steelink, C., 1985. Implications of elemental characteristics of humic substances. En *Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization.* Eds: Aiken, G.R., Mcknight, M.D., Wershaw, R.L. y MacCarthy, P. John Wiley & Sons, pp 457-476.

Steinberg, C., y Muenster, U., 1985. Geochemistry and ecological role of humic substances in lakewater. En *Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization.* Eds: Aiken, G.R., Mcknight, M.D., Wershaw, R.L. y MacCarthy, P. John Wiley & Sons, pp 105-146.

Steinberg, C. E. W. y Bach, S., 1996. Growth promotion by a groundwater fulvic acid in a bacteria/algae system. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 24(2), 98-100.

Steinberg, C.E., 2003. *Ecology of Humic Substances in Freshwaters*. Springer Berlin Heidelberg, pp 441.

Stevens, A.E., McCarthy, B.C. y Vis, M.L., 2001. Metal content of Klebsormidium-dominated (Chlorophyta) algal mats from acid mine drainage waters in southeastern Ohio. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 128(3), 226-233.

Stevenson, F.J. y Goh, K.M., 1971. Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 35(5), 471-483.

Stevenson, F.J. y Schnitzer, M., 1982. Transmission electron microscopy of extracted fulvic and humic acids. *Soil Science*, 133, 179–185

Stevenson, F.J., 1982. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. Wiley Interscience, New York, 443 pp.

Stevenson, F.J., 1985. Geochemistry of soil humic substances. En *Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization.* Eds: Aiken, G.R., Mcknight, M.D., Wershaw, R.L. y MacCarthy, P. John Wiley & Sons, pp 13-52.

Stevenson, F.J., 1994. Biochemistry of the formation of humic substances. *Humus Chemistry: genesis, composition, reactions*, 2, 188-211.

Stokes, P.M. 1986. Ecological effects of acidification on primary producers in aquatic systems. In *Acidic Precipitation*. Springer Netherlands, pp. 421-438.

Stuermer, D.H., Peters, K.E. y Kaplan, I.R., 1978. Source indicators of humic substances and proto-kerogen. Stable isotope ratios, elemental compositions and electron spin resonance spectra. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(7), 989-997.

Stumm, W., Morgan, S., 1996. Aquatic chemistry, Chemical equilibria and rates in natural waters. 2nd ed. *John Wiley & Sons, Inc*. New York, NY. 1022 pp.

Stylianou, M. A., Kollia, D., Haralambous, K. J., Inglezakis, V. J., Moustakas, K. G. y Loizidou, M. D., 2007. Effect of acid treatment on the removal of heavy metals from sewage sludge. *Desalination*, 215(1), 73-81.

Sunda, W., 1975. *The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton* (Doctoral dissertation, Massachusetts Institute of Technology and Woods Hole Oceanographic Institution).

Sunda, W.G. y Lewis, J.A.M., 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, Monochrysis lutheri. *Limnology and Oceanography*, 23(5), 870-876.

Sunda, W.G., 1989. Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biological Oceanography*, *6*(5-6), 411-442.

Suzuki, E., Tanaka, A. K., Toledo, M. S., Levery, S. B., Straus, A. H. y Takahashi, H. K., 2008. Trypanosomatid and fungal glycolipids and sphingolipids as infectivity factors and potential targets for development of new therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 178(3), 362-369.

Suzuki, E., Toledo, M. S., Takahashi, H. K. y Straus, A. H., 1997. A monoclonal antibody directed to terminal residue of β-galactofuranose of a glycolipid antigen isolated from Paracoccidioides brasiliensis: cross-reactivity with Leishmania major and Trypanosoma cruzi. *Glycobiology*, 7(4), 463-468.

Swartz, R.C., 1999. Consensus sediment quality guidelines for PAH mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18:780-787.

Swift, R. S., 1996. Organic matter characterization. In Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Sumner, M. E., (Eds). *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods.* Soil Science Society of America. Book Series: 5. Madison, USA. pp. 1018–1020.

Tack, F.M., Callewaert, O. W.J.J. y Verloo, M.G., 1996. Metal solubility as a function of pH in a contaminated, dredged sediment affected by oxidation. *Environmental pollution*, 91(2), 199-208.

Takeda, H., 1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of Chlorella (Chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 27(2), 224-232.

Tatone, L., Bilos, C., Skorupka, C. y Colombo, J.C. 2014. Perfiles verticales de metales en sedimentos del Río Uruguay, Argentina . En *Procesos Geoquímicos de la Superficie en América Latina* , Eds: Marcovecchio, J.E., Botté, S.E. y Freije, R.H. pp. 147-155.

Temporetti, P., Snodgrass, K., Pedrozo, F., 2013. Dynamics of phosphorus in sediments of a naturally acidic lake. *International Journal of Sediment Research*, *28*(1), 90–102.

Tessier, A., Campbell, P. G., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical chemistry.* 51(7), 844–851.

Thanabalasingam, P y Pickering, W.F., 1986. Arsenic Sorption by Humic Acids . *Environmental Pollution, B,* 12, 233-246 .

Thurman, E. M., 1985. Organic Geochemistry of Natural Waters. Springer science and bussines media.

Timofeyev, M. A., Shatilina, Z. M., Kolesnichenko, A. V., Bedulina, D. S., Kolesnichenko, V. V., Pflugmacher, S. y Steinberg, C. E., 2006. Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods Gammarus lacustris Sars and Gammarus tigrinus (Sexton). *Science of the total environment*, 366(2), 673-681.

Tipping, E., 1993. Modelling ion binding by humic acids. *Colloidal Surface A,* 73, 117-131.

Tipping, E., 1994. WHAM — A chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Comp. Geosci*., 20, 973-1023.

Tipping, E., 1998. Humic Ion-Binding Model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. *Aquatic Geochemistry*, 4, 3-48.

Tipping, E., 2002. *Cation binding by humic substances* (Vol. 12). Cambridge University Press, pp 434.

Tipping, E., Rey–Castro, C., Bryan, S. E., Hamilton–Taylor, J., 2002. Al (III) and Fe (III) binding by humic substances in freshwaters, and implications for trace metal speciation. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 66(18), 3211–3224.

Tittel, J., Bissinger, V., Zippel, B., Gaedke, U., Bell, E., Lorke, A. y Kamjunke, N., 2003. Mixotrophs combine resource use to outcompete specialists: implications for aquatic food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12776-12781.

Törnqvist, L. y Claesson, A., 1987. The influence of aluminum on the cell-size distribution of two green algae. *Environmental and experimental botany*, 27(4), 481-488.

Torres, E. y Auleda, M., 2013. A sequential extraction procedure for sediments affected by acid mine drainage. *Journal of Geochemical Exploration.* 128, 35–41.

Truitt, R.E. y Weber, J.H., 1981. Determination of complexing capacity of fulvic acid for copper(II) and cadmium(II) by dialysis titration. *Analytical Chemistry*, 53, 337-342.

Tsekos I., 1999. The sites of cellulose synthesis in algae: diversity and evolution of cellulose-synthesising enzyme complexes. *Journal of Phycology*, 35:635–55.

Tsutsuki K. y Kuwatsuka, S., 1984. Molecular size Distribution of humic acids as affected by the ionic strength and the degree of humification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 30: 151–162.

Tulonen, T., Salonen, K. y Arvola, L., 1992. Effects of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae and protozoa from a highly humic lake. *Hydrobiologia*, 229(1), 239-252.

Turner, S. H. y Cherniak, R., 1981. Total characterization of polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 95(1), 137-144.

Ulrich B., 1981. Die Rolle der Walder fur die Wassergute unter dem EinfluB des sauren Niederschlags. *Agrarspektrum.* 1, 212–231.

Ure, A. M., Quevauviller, P., Muntau, H. y Griepink, B., 1993. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *International journal of environmental analytical chemistry*, 51(1-4), 135-151.

Urrutia, M., Graña, J., García–Rodeja, R., & Macias, F. 1987. Procesos de oxidación de pirita en medios superficiales: potencial acidificante e interés para la recuperación de suelos de mina. *Cuad. Lab. Xeol. Laxe*, *11*, 131–145.

Utermöhl, H., 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitteilung Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Amgewandte Limnologie.*, *9*, 1-38.

Vairavamurthy, M. A., Maletic, D., Wang, S., Manowitz, B., Eglinton, T. y Lyons, T., 1997. Characterization of sulfur–containing functional groups in sedimentary humic substances by X–ray absorption near–edge structure spectroscopy. *Energy & Fuels*, 11(3), 546–553.

Varekamp, J.C., 2003. Lake contamination models for evolution towards steady state. *Journal of Limnology.* 62(1s), 67–72.

Varekamp, J.C., 2008. The volcanic acidification of glacial Lake Caviahue, Province of Neuquen, Argentina. *Journal of Volcanology and Geothermal Research.* 178(2), 184–196.

Varekamp, J.C., Ouimette, A.P. y Kreulen, R., 2014. The magmato-hydrothermal system at Copahue volcano, Argentina. *Water–Rock Interaction*, *11*, 215-218.

Vierhuis, E., Schols, H.A., Beldman, G. y Voragen, A.G.J., 2000. Isolation and characterisation of cell wall material from olive fruit (Olea europaea cv koroneiki) at different ripening stages. *Carbohydrate Polymers*, 43(1), 11-21.

Vigneault, B., Percot, A., Lafleur, M. y Campbell, P.G., 2000. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environmental science & technology*, 34(18), 3907-3913.

Vigneault, B. y Campbell, P.G., 2005. Uptake of cadmium by freshwater green algae: effects of ph and aquatic humic substances. *Journal of phycology*, 41(1), 55-61.

Wagner, G.H. y Stevenson, F.J., 1965. Structural arrangement of functional groups in soil humic acid as revealed by infrared analyses. *Soil Science Society of America Journal*, 29(1), 43-48.

Waksman, S. A. e Iyer, R.N., 1932. Contribution to our knowledge of the chemical nature and origin of humus: i. on the synthesis of the" humus nucleus". *Soil Science*, 34(1), 43-70.

Warwick P., Hall, A., Pashley, V. y Bryan, N., 2001. Investigation of the permeability of humic molecules using zeta

potential measurements. *Chemosphere*, 45: 303-307.

Wehry, R.K. y Rogers, L.B., 1966. *Fluorescence and phosphorescence in organic molecules*. In Fluorescence and Phosphorescence Analysis. Ed: Hercules, D.M. Wiley, New York, pp. 81-150.

Weishaar, J. L., Aiken, G. R., Bergamaschi, B. A., Fram, M. S., Fujii, R. y Mopper, K., 2003. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environmental Science and Technology*, 37(20), 4702–4708.

Wendt–Potthoff, K. y Koschorreck, M., 2002. Functional groups and activities of bacteria in a highly acidic volcanic mountain stream and lake in Patagonia, Argentina. *Microbial ecology*, 43(1), 92–106.

Wershaw R. L., 1986. A new model for humic materials and their interactions with hydrophopic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. Journal of Contaminant. *Hydrology*, 1: 29-45.

Westerhoff, P.; Aiken, G.; Amy, G. y Debroux, J., 1999. Relationships between the structure of natural organic matter and its reactivity towards molecular ozone and hydroxyl radicals. *Water Research*, 33 (10), 2265−2276.

Wetzel, G. R., Likens, G. E., 1990. *Limnological analyses* 2nd ed. Springer-Verlag, pp 139-166.

Wetzel R., 2001. *Limnology*. Philadelphia, Saunders, pp. 743.

Whitton, B.A., 1970. Toxicity of zinc, copper and lead to Chlorophyta from flowing waters. *Archiv für Mikrobiologie*, 72(4), 353-360.

Whitton B.A. y Diaz B.M., 1981. Influence of environmental factors on photosynthetic species composition in highly acidic waters. Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie, 21: 1459-1465.

Whelan, J.K., Hunt, J.M. y Berman, J., 1980. Volatile Ct–C, organic compounds in surface sediments from Walvis Bay. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44, 1767–1785.

Wieneke, R., Klein, S., Geyer, A. y Loos, E., 2007. Structural and functional characterization of galactooligosaccharides in Nostoc commune: β-d-galactofuranosyl-(1→ 6)-[β-d-galactofuranosyl-(1→6)] 2-β-d-1, 4-anhydrogalactitol and β-(1→ 6)-galactofuranosylated homologues. *Carbohydrate research*, *342*(18), 2757-2765.

Wollmann, K,, Deneke, R., Nixdorf, B. y Packroff, G., 2000. Dynamics of planktonic food webs in three mining lakes across a pH gradient (pH 2-4). *Hydrobiologia*, 433: 3-14.

Xu, H., Chen, R., Sun, Q., Lai, W., Su, Q., Huang, W. y Liu, X., 2014. Recent progress in metal–organic complexes for optoelectronic applications. *Chemical Society Reviews*, 43(10), 3259-3302.

Yan, M., Benedetti, M. F., Korshin, G. V., 2013. Study of iron and aluminum binding to Suwannee River fulvic acid using absorbance and fluorescence spectroscopy: Comparison of data interpretation based on NICA–Donnan and Stockholm humic models. *Water research.* 47(14), 5439–5446.

Yao, B., Xi, B., Hu, C., Huo, S., Su, J. y Liu, H., 2011. A model and experimental study of phosphate uptake kinetics in algae: Considering surface adsorption and P-stress. *Journal of Environmental Sciences*, 23(2), 189-198.

Yoshimura, E., Nagasaka, S., Sato, Y., Satake, K. y Mori, S., 1999. Extraordinary high aluminium tolerance of the acidophilic thermophilic alga, Cyanidium caldarium. *Soil science and plant nutrition*, 45(3), 721-724.

Young, L.B., Harvey, H.H., 1992. Geochemistry of Mn and Fe in lake sediments in relation to lake acidity. *Limnology and oceanography.* 37(3), 603–613.

Zhabina, N.N. y Volkov, I.I. , 1978. A method of determination of various sulfur compounds in sea sediments and rocks. In *Environmental biogeochemistry and geomicrobiology. Vol. 3: Methods, metals and assessment*. Ann arbor science publications, pp. 735-746.

Zhao, J.; Nelson, D. J., 2005. Fluorescence study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with metal ions and Al 3+ -metal ion competition. *J. Inorg. Biochem*, 99, 383–396.

Zhao, N., Lü, Y.Z., y Li, G.J., 2013. Characterization and three-dimensional structural modeling of humic acid via molecular mechanics and molecular dynamic simulation. *Chemical Research in Chinese Universities*, *29*(6), 1180-1184.

7 Anexo

Tabla 32 Contenido de AVS, Fe, Mn, Pb, Cr, Zn y Cd sedimentarios en el extracto lixiviado con HCl 1M. [SEM]: suma del contenido de metales traza (excepto Fe); [SEM]/AVS: relación entre ambas variables; N/D: no determinado; >DL: debajo del límite de detección.

Sitio	Variable	0-2	2-4	4-8	8-12	12-16
BN	AVS	358 ± 5	209 ± 11	143 ± 9	109 ± 1	N/D
	Fe	276 ± 4	382 ± 20	291 ± 30	106 ± 6	ND
	Pb	9,7 ± 0,3	5,7 ± 0,1	6,2 ± 0,1	4,6 ± 0,3	ND
	Cr	2,5 ± 0,5	0,4 ± 0,1	>DL	>DL	ND
	Zn	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,3	ND
	Cd	0,96 ± 0,16	0,71 ± 0,13	0,72 ± 0,33	0,47 ± 0,13	N/D
	[SEM]	14,0	8,6	7,9	5,4	
	[SEM]/AVS	0,04	0,04	0,06	0,05	N/D
Centro	AVS	241 ± 20	248 ± 13	788 ± 10	348 ± 25	610 ± 55
	Fe	534 ± 4	75 ± 6	372 ± 74	214 ± 16	347 ± 47
	Pb	13,6 ± 0,9	5,9 ± 0,7	2,9 ± 0,9	2,7 ± 0,3	4,4 ± 0,1
	Cr	>DL	>DL	>DL	3,18 ± 1,43	3,89 ± 0,01
	Zn	1,4 ± 0,1	3,4 ± 0,3	7,5 ± 1,4	2,7 ± 0,4	7,3 ± 0,6
	Cd	1,32 ± 0,20	0,81 ± 0,14	1,14 ± 0,23	0,82 ± 0,01	1,19 ± 0,22
	[SEM]	22,2	10,1	11,6	9,4	16,7
	[SEM]/AVS	0,09	0,04	0,01	0,03	0,03
BS	AVS	517 ± 88	484 ± 13	587 ± 27	502 ± 16	128 ± 9
	Fe	314,36 ± 0,98	156 ± 27	408 ± 3	350 ± 4	272 ± 12
	Cr	3,3 ± 0,6	4,7 ± 0,2	1,2 ± 0,1	2,5 ± 0,9	1,0 ± 0,2
	Pb	13,5 ± 0,4	5,8 ± 0,2	9,1 ± 0,0	14,2 ± 0,3	11,0 ± 0,2
	Zn	1,9 ± 0,4	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,5	0,5 ± 0,3	0,3 ± 0,0
	Cd	1,38 ± 0,04	0,47 ± 0,02	0,69 ± 0,20	1,66 ± 0,05	0,47 ± 0,01
	[SEM]	20,2	9,7	13,7	18,8	12,5
	[SEM]/AVS	0,04	0,02	0,02	0,04	0,10

Tabla 33 Contenido de Fe, Mn, Pb y Cr en las fracciones lábil/carbontos (L/C), reducible (Red), oxidable (Ox), residual (Red) y metal total (MT) de la extracción secuencial en BN, C y BS. (<DL: por debajo del límite de detección; N/D: no determinado).

Fe		**0-2**	**2-4**	**4-8**	**8-12**	**12-16**	**Mn**		**0-2**	**2-4**	**4-8**	**8-12**	**12-16**
BN	**L/C**	188 ± 10	523 ± 59	505 ± 29	215 ± 40	N/D	**BN**	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	N/D
	Red	145 ± 9	413 ± 64	307 ± 56	336 ± 75	N/D		**Red**	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2, ± 0,1	2,0 ± 0,1	N/D ± N/D
	Ox	1483 ± 58	2011 ± 73ed	2493 ± 318	5190 ± 551	N/D		**Ox**	2,1 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,9 ± 0,3	2,7 ± 0,1	N/D ± N/D
	Res	4883 ± 167	4109 ± 599	1138 ± 632	0	N/D		**Res**	40,0 ± 9,9	43,0 ± 9,1	62,1 ± 19,0	82,2 ± 6,5	
	MT	6699 ± 90	7056 ± 403	4443 ± 230	5719 ± 126	N/D		**MT**	43,5 ± 9,9	46,8 ± 8,4	67,0 ± 18,5	87,2 ± 5,9	N/D
Centro	**L/C**	119 ± 21	55 ± 3	276 ± 20	417 ± 59	427 ± 51	**Centro**	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
	Red	164 ± 28	113 ± 12	114 ± 10	121 ± 14	98 ± 14		**Red**	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
	Ox	1155 ± 92	4331 ± 209	392 ± 29	389 ± 72	287 ± 39		**Ox**	1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
	Res	2399 ± 239	900 ± 399	2701 ± 359	2791 ± 371	2345 ± 277		**Res**	21,2 ± 3,1	26,3 ± 10,0	35,5 ± 2,8	38,5 ± 1,4	37,4 ± 5,1
	MT	3836 ± 98	5399 ± 176	3484 ± 300	3718 ± 226	3157 ± 172		**MT**	24,0 ± 2,9	28,8 ± 9,7	38,0 ± 2,8	40,3 ± 0,6	39,3 ± 4,6
BS	**L/C**	9 ± 2	29 ± 1	437 ± 99	232 ± 25	302 ± 46	**BS**	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
	Red	236 ± 56	257 ± 63	233 ± 21	185 ± 23	452 ± 4		**Red**	2,2 ± 0,9	1,7 ± 0,3	3,95 ± 0,14	4,8 ± 0,8	9,4 ± 0,1
	Ox	1996 ± 19	3384 ± 83	897 ± 7	1598 ± 171	2837 ± 21		**Ox**	2,5 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,80 ± 0,16	0,5 ± 0,1	3,4 ± 0,2
	Res	3349 ± 446	2082 ± 297	3621 ± 135	4714 ± 457	2368 ± 176		**Res**	36,0 ± 6,9	31,0 ± 4,0	22 ± 2	19,8 ± 1,0	62,6 ± 2,9
	MT	5590 ± 369	5752 ± 151	5187 ± 8	6729 ± 238	5960 ± 104		**MT**	40,4 ± 5,5	34,1 ± 3,2	27,42 ± 1,90	25,1 ± 0,1	74,9 ± 2,2
Pb		**0-2**	**2-4**	**4-8**	**8-12**	**12-16**	**Cr**		**0-2**	**2-4**	**4-8**	**8-12**	**12-16**
BN	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	N/D	**BN**	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	N/D
	Red	<DL	<DL	<DL	<DL			**Red**	<DL	<DL	<DL	<DL	N/D
	Ox	12,4 ± 1,0	10,3 ± 0,8	9,1 ± 1,6	5,8 ± 0,6			**Ox**	6,9 ± 0,5	7,2 ± 0,6	3,1 ± 0,3	<DL	N/D
	Res	114,5 ± 1,9	116,1 ± 5,6	134,4 ± 11,8	155,0 ± 5,7			**Res**	45,5 ± 10,7	29,8 ± 9,8	49,2 ± 11,4	86,4 ± 10,5	
	MT	127,6 ± 0,9	126,9 ± 4,8	144,4 ± 9,8	162,1 ± 4,7			**MT**	52,4 ± 10,2	37,1 ± 9,1	52,2 ± 11,1	86,4 ± 10,5	N/D
Centro	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	**Centro**	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
	Red	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL		**Red**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
	Ox	6,8 ± 1,5	3,4 ± 0,4	14,4 ± 0,4	15,9 ± 0,8	16,8 ± 1,0		**Ox**	<DL	<DL	4,1 ± 0,6	6,8 ± 1,3	7,3 ± 0,4
	Res	88,4 ± 3,1	89,9 ± 2,5	96,8 ± 12,6	93,0 ± 11,3	75,4 ± 2,4		**Res**	49,4 ± 5,9	29,8 ± 0,5	36,9 ± 6,2	34,7 ± 6,0	33,3 ± 5,1
	MT	96,9 ± 1,0	95,1 ± 1,7	112,8 ±12,1	110.9 ± 9,8	94,2 ± 1,1		**MT**	49,4 ± 5,9	29,8 ± 0,5	41,1 ± 5,6	41,5 ± 4,8	40,6 ± 4,7
BS	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	**BS**	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
	Red	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL		**Red**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
	Ox	10,6 ± 0,6	8,6 ± 1,2	24,9 ± 1,3	15,9 ± 1,8	9,6 ± 1,1		**Ox**	8,1 ± 0,7	N/D	6,3 ± 0,8	4,9 ± 0,6	9,5 ± 1,0
	Res	101,06 ± 14,0	116,0 ± 4,0	93,2 ± 12,0	96,7 ± 15,0	118,1 ± 1,8		**Res**	63,8 ± 5,5	N/D	35,2 ± 5,1	24,7 ± 0,8	103,6 ± 11,0
	MT	112,7 ± 12,7	126,0 ± 2,6	118,8 ± 10,7	113,7 ± 12,8	128,4 ± 0,7		**MT**	71,9 ± 4,7	40,7 ± 6,1	41,5 ± 4,3	29,7 ± 0,2	113,1 ± 10,0

Tabla 34 Contenido de Cu y Zn en las fracciones lábil/carbontos (L/C), reducible (Red), oxidable (Ox), residual (Red) y metal total (MT) de la extracción secuencial en BN, C y BS. (<DL: por debajo del límite de detección; N/D: no determinado).

Cu		0-2	2-4	4-8	8-12	12-16	Zn		0-2	2-4	4-8	8-12	12-16
BN	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	N/D	**BN**	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	N/D
	Red	<DL	<DL	<DL	<DL	N/D		**Red**	<DL	2,1 ± 0,4	<DL	1,6 ± 0,5	N/D
	Ox	17,3 ± 0,1	16,8 ± 0,3	20,2 ± 1,4	18,3 ± 0,7	N/D		**Ox**	2,4 ± 1,0	3,4 ± 0,1	3,2 ± 0,4	4,5 ± 0,2	N/D
	Res	15,3 ± 0,4	10,3 ± 1,4	9,6 ± 5,5	37,0 ± 2,2	N/D		**Res**	16,3 ± 1,7	3,5 ± 1,0	7,4 ± 1,3	9,6 ± 4,2	N/D
	MT	32,7 ± 0,2	27,1 ± 1,0	29,8 ± 4,1	55,3 ± 1,6	N/D		**MT**	18,8 ± 0,7	9,0 ± 0,5	11,5 ± 0,7	15,7 ± 3,5	N/D
Centro	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	**Centro**	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
	Red	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL		**Red**	<DL	<DL	<DL	<DL	1,6 ± 0,7
	Ox	15,6 ± 1,3	17,2 ± 0,1	10,2 ± 0,2	13,4 ± 0,8	13,0 ± 0,3		**Ox**	2,1 ± 0,4	2,7 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1
	Res	6,5 ± 1,6	0,00	6,1 ± 0,3	3,0 ± 1,0	5,7 ± 3,9		**Res**	5,9 ± 1,2	4,5 ± 0,2	8,0 ± 2,4	5,9 ± 1,2	5,1 ± 1,7
	MT	22,1 ± 0,2	17,2 ± 0,1	16,3 ± 0,1	16,5 ± 0,2	18,7 ± 3,6		**MT**	8,0 ± 0,8	7,2 ± 0,1	10,9 ± 1,8	9,2 ± 0,7	10,1 ± 1
BS	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	**BS**	**L/C**	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
	Red	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL		**Red**	5,3 ± 0,6	2,6± 0,1	2,2 ± 0,3	3,7 ± 0,7	2,5 ± 0,1
	Ox	18,5 ± 1,5	18,7 ± 0,1	24,0 ± 0,8	30,9 ± 0,5	33,4 ± 1,6		**Ox**	7,1 ± 1,2	5,8 ± 0,1	6,1 ± 0,6	6,9 ± 0,5	6,2 ± 0,3
	Res	3,5 ± 1,7	0,00	0,00	0,00	0,00		**Res**	1,1 ± 3,4	3,0 ± 1,3	3,9 ± 2,3	<DL	4,1 ± 1,3
	MT	22,0 ± 0,2	18,7 ± 0,1	16,4 ± 0,4	10,7 ± 0,1	24,6 ± 3,7		**MT**	13,5 ± 1,6	11,4 ± 1,1	12,2 ± 1,4	8,4 ± 1,7	12,8 ± 0,9

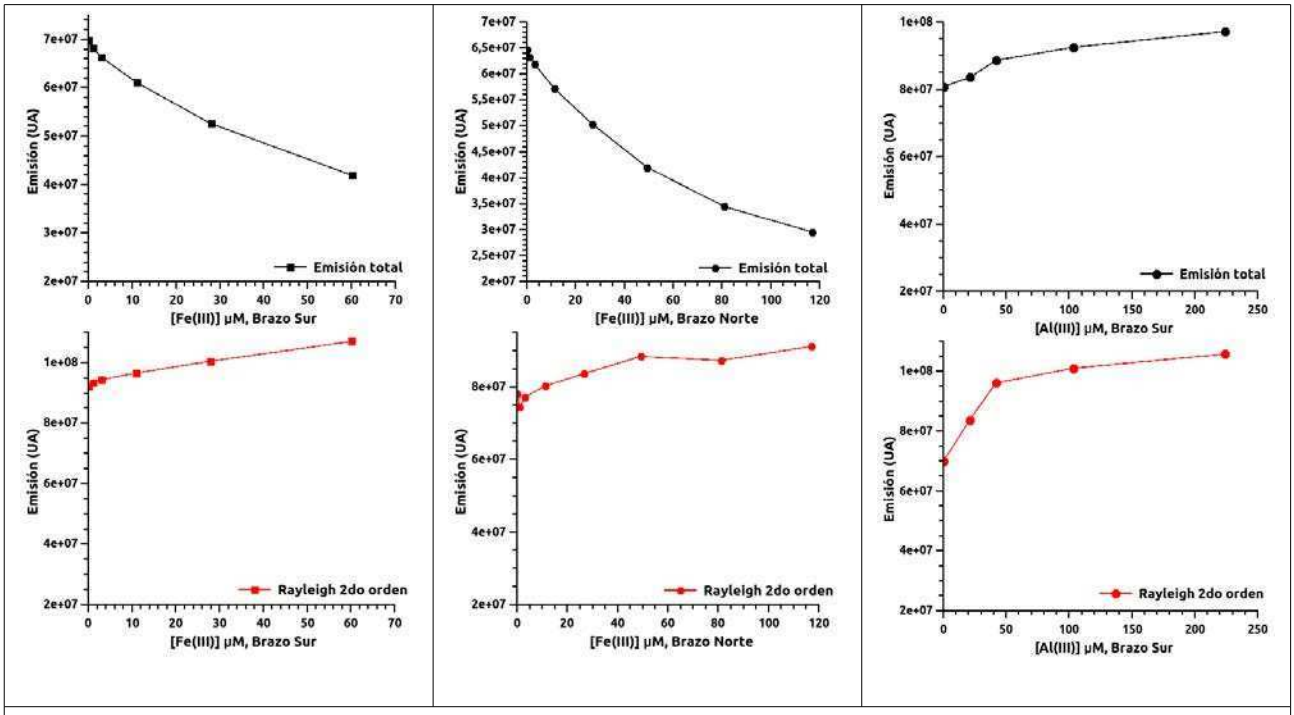


Figura 37 **Variación en la emisión total (sin Rayleigh) y del Rayleigh de segundo orden en función de la concentración de metal. De izquierda a derecha: Fe(III) BS, Fe(III) BN, Al BS.**

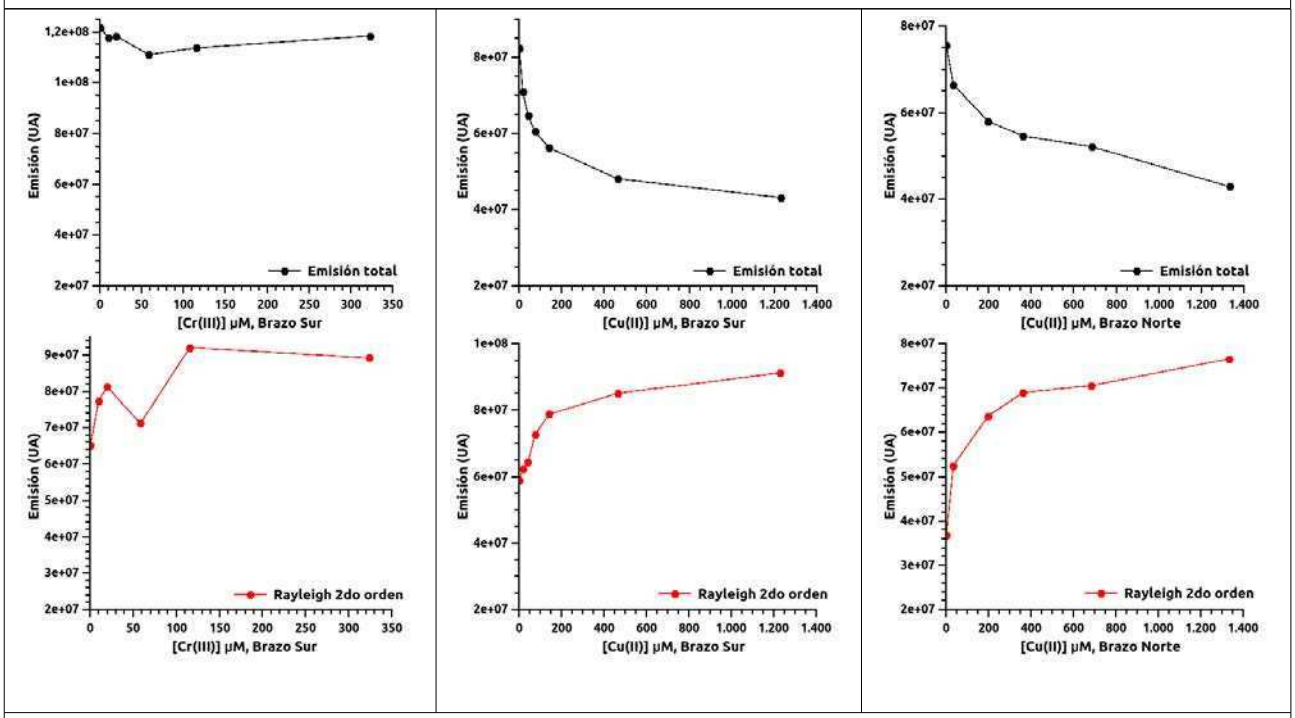


Figura 38 **Variación en la emisión total (sin Rayleigh) y del Rayleigh de segundo orden en función de la concentración de metal. De izquierda a derecha: Cr BS, Cu BS, Cu BN.**

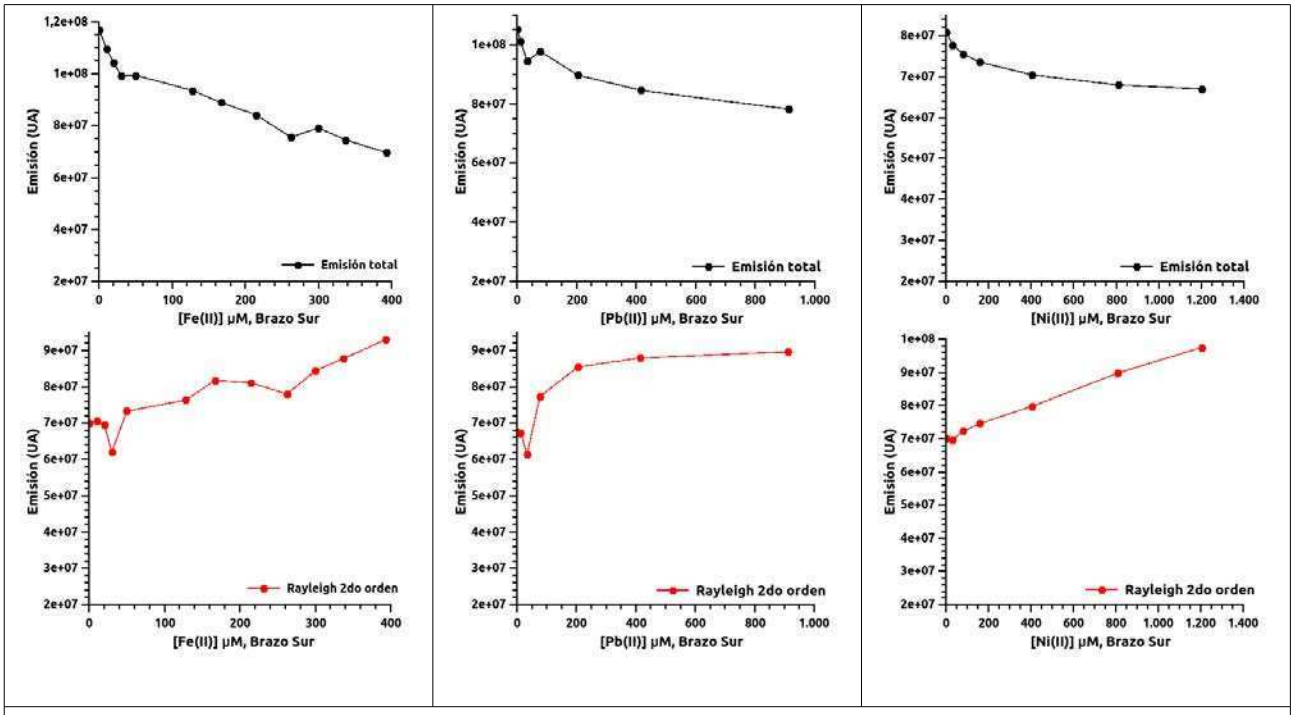


Figura 39 **Variación en la emisión total (sin Rayleigh) y del Rayleigh de segundo orden en función de la concentración de metal. De izquierda a derecha: Fe(II) BS, Pb BS, Ni BS.**

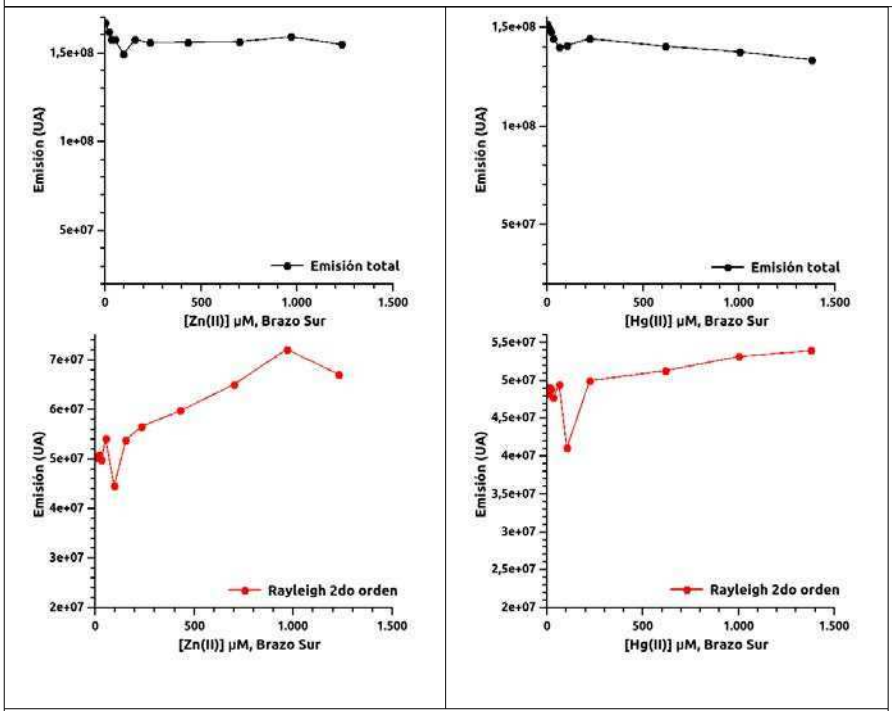


Figura 40 **Variación en la emisión total (sin Rayleigh) y del Rayleigh de segundo orden en función de la concentración de metal. De izquierda a derecha: Zn BS, Hg BS.**