

**CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y  
TECNOLÓGICO**  
**Informe Científico**<sup>1</sup>

**PERIODO** <sup>2</sup>: 2011-2012

Legajo N°:

**1. DATOS PERSONALES**

*APELLIDO: Morelli*

*NOMBRES: Irma Susana*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:*

*Dirección electrónica (donde desea recibir información): guri@biol.unlp.edu.ar*

**2. TEMA DE INVESTIGACION**

*Biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos*

**3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA**

*INGRESO: Categoría: Independiente Fecha: 01/01/2011*

*ACTUAL: Categoría: Independiente desde fecha: 01/01/2011*

**4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA**

*Universidad y/o Centro: Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI)*

*Facultad: Facultad de Ciencias Exactas-UNLP.*

*Departamento:*

*Cátedra:*

*Otros:*

*Dirección: Calle: 50 N°: 227*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 0221-4833794*

*Cargo que ocupa: Investigador*

**5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)**

*Apellido y Nombres:*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: CP: Tel:*

*Dirección electrónica:*

<sup>1</sup> Art. 11; Inc. "e" ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

<sup>2</sup> El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

.....  
Firma del Director (si corresponde)

.....  
Firma del Investigador

**6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.**

*Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Responsable de la coordinación, planificación y dirección de las actividades de investigación relacionadas con los proyectos: “Estudio de la estructura, diversidad y funcionalidad de consorcios bacterianos degradadores de PAH. Aplicación de estrategias “ómicas”, “Biorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos” y “Remediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) por combinación de procesos de biorremediación y oxidación química”. Discusión de resultados, redacción de trabajos e informes y divulgación de resultados. Se presenta un resumen de los principales resultados.

- Estudio de la influencia de la presencia de metales pesados sobre la biorremediación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Se estudió el efecto de la co-contaminación con CrVI y telurito sobre la degradación de fenantreno y sobre la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. Se encontró que a las concentraciones estudiadas, mientras que el CrVI mostraba un efecto negativo sobre la degradación de fenantreno, la presencia de telurito no inhibió la degradación del mismo, por el contrario se observó un aumento estimulador de la actividad microbiana, posiblemente debido a la aparición de compuestos de oxidación parcial del fenantreno y/o la materia orgánica del suelo. A través de la construcción de una librería de genes 16S rDNA se determinó que, en ambos casos, la presencia del metal modula la respuesta de la comunidad microbiana frente al fenantreno. Se determinó que la inoculación de una cepa degradadora de fenantreno y resistente a CrVI podía superar en parte el efecto inhibitorio de la presencia del metal sobre la degradación del fenantreno. Se incursionó en técnicas de metagenómica funcional, se realizó la amplificación del DNA total del suelo utilizando distintos primers dirigidos al gen de la enzima naftaleno dioxigenasa. Se comenzó con la puesta a punto de la cuantificación de la concentración de DNA bacteriano y de genes funcionales por PCR real time.

Estos resultados permitieron la publicación de un artículo en una revista internacional y la presentación de un trabajo en un congreso nacional.

- Remediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) por combinación de procesos de biorremediación y oxidación química. La combinación de tratamientos químicos y biológicos podría superar las limitaciones individuales de cada técnica de remediación y lograr una mayor eficiencia en la remoción de los PAH. La aplicación de oxidantes fuertes a suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos es considerada una estrategia efectiva para superar las limitaciones de la biorremediación. El persulfato (PS) presenta ciertas ventajas sobre los oxidantes tradicionales, no existiendo información respecto a su impacto sobre la comunidad microbiana del suelo. Se estudió el efecto de distintas concentraciones de PS sobre la eliminación de fenantreno y sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Concentraciones de PS  $\leq 8,33$  g/kg produjeron una rápida disminución en la concentración de fenantreno, con bajo impacto sobre el pH, el recuento de bacterias cultivables y la diversidad genética de la comunidad microbiana del suelo (DGGE). Se comenzó a estudiar la influencia de distintos

parámetros (contenido de agua, aplicaciones sucesivas, agregado de catalizadores, etc.) sobre la eficiencia de los procesos de oxidación y el impacto sobre la comunidad microbiana del suelo.

Estos resultados fueron presentados en 3 congresos nacionales y un congreso internacional, además se ha enviado un trabajo a una revista internacional y otro se encuentra en preparación.

- Obtención de consorcios bacterianos degradadores de PAH a partir de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos

A partir de suelos crónicamente contaminados, perteneciente al polo petroquímico de Ensenada, se obtuvieron distintos consorcios bacterianos degradadores de PAH. Se estudio la composición de estos consorcios tanto a nivel de cultivables como a nivel de no cultivables (PCR-DGGE y librerías de genes 16sRNA). Con el objetivo de dilucidar algunas de las relaciones sintróficas que tienen lugar en los consorcios durante la degradación del contaminante, se estudiaron algunas propiedades fisiológicas de las cepas aisladas, relacionadas con la degradación de fenantreno. Con el fin de determinar la dinámica funcional de los consorcios se realizó una aproximación metaproteómica. Se logró poner a punto la técnica de separación de proteínas en geles 2D. Esta metodología nos permitió observar claras diferencias en los metaproteomas del consorcio obtenidos a distintos tiempos durante la degradación de fenantreno en medio líquido.

Estos resultados fueron presentados en un congreso nacional y otro internacional, además se envió un manuscrito a una revista internacional, el cual se encuentra en proceso de revisión.

Los proyectos antes descriptos tuvieron como objetivo general contribuir al desarrollo de herramientas biocorrectivas alternativas de bajo costo y ambientalmente aceptables, que permitan recuperar los suelos de la Provincia de Buenos Aires, que han sufrido contaminación debido al establecimiento de varios polos petroquímicos en su territorio; constituyendo un desafío para garantizar la preservación del ambiente, la protección de los recursos naturales, la calidad de vida de la población, la conservación de la biodiversidad y el equilibrio de los ecosistemas.

- Obtención de inoculantes bacterianos y evaluación de su aplicación en procesos de biorremediación de suelos de la Patagonia semiárida contaminados con PAH. Este proyecto se realizó en colaboración con el Dr. Héctor Álvarez (Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico, CRIDECIT, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco)

A partir de suelos de la Patagonia semiárida, crónicamente contaminados con hidrocarburos, se obtuvieron cepas degradadoras de PAH, las cuáles fueron caracterizadas y seleccionadas por que sus propiedades filológicas sugirieron la presencia de mecanismos de adaptación a las condiciones ambientales típicas del lugar. Se incursionó en el estudio de las respuestas fisiológicas y moleculares frente a diferentes estreses ambientales presentes en la cepa *Sphingobium* sp. 22B, que resultó ser la más resistente a las condiciones de desecación y déficit de nutrientes. Los ensayos de biodegradación realizados permitieron demostrar que las condiciones áridas de los suelos patagónicos es el principal factor que limita la biodegradación de fenantreno. Se realizaron ensayos de inoculación con la cepa *Sphingobium* sp. 22B, en microcosmos de suelo Patagónico bajo distintas condiciones ambientales. Se determinó que la inoculación con la cepa en estudio sólo resultó efectiva cuando se corrigió parcialmente el stress hídrico. Por otro lado pudimos demostrar que el estudio de comunidades microbianas a través de los perfiles de DGGE resulta una herramienta válida para evaluar el efecto del inoculante sobre la dinámica bacteriana del suelo. Este

método nos ha permitido mostrar claras diferencias entre los perfiles de las comunidades bacterianas del suelo donde el inoculante se ha establecido bajo condiciones no competitivas, y aquellos en que la inoculación ha producido cambios selectivos en la estructura de la comunidad microbiana del suelo.

Estos resultados permitieron la publicación de un trabajo en una revista internacional y dos presentaciones a congresos internacionales.

## **7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.**

**7.1 PUBLICACIONES.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1. Madueño L., Coppotelli B.M., Alvarez H.M. and Morelli I.S. "Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina". *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65:345-351. 2011.

Abstract

The aim of this work was to isolate PAH degrading-bacteria from contaminated Patagonia soil with the ability to tolerate the usual environmental stresses (oligotrophic and dryness conditions). Two approaches were utilized to obtain PAH-degrading bacteria from the Patagonian soil. With a traditional enrichment approach only the PAH- degrading strain 36 was isolated. Using a direct isolation approach three PAH-degrading strains (1A, 22A and 22B) were isolated. The phylogenetic analysis revealed that all isolates belonged to *Sphingomonas* genus. The PAH degrading activity and the resistance to stress conditions of the strains were determined and compared with those of the exogenous PAH-degrading *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA. The strains 1A, 22A and 36 were phylogenetically closely related between them and with the strain 20006FA. The strain 22B, that showed a different phylogenetic position, was more resistant to C-starvation and drying conditions than other Patagonian strains. The effect of the inoculation of these strains on phenanthrene-induced mineralization and elimination was studied in Patagonian soil artificially contaminated, at different environmental conditions. The results suggest that strain 22B is the most suitable strain for bioaugmentation in PAH-contaminated soils of Central Patagonia, due to its adaptation to the usual environmental conditions. Our results show the importance of a detailed physiological characterization of isolates for autochthonous bioaugmentation strategies success.

Planificación y dirección de los trabajos experimentales y redacción del manuscrito. Cabe aclarar que al momento de mi ingreso como investigador de la CIC este manuscrito se encontraba en prensa, por lo que la mención de mi calidad de investigador de la CIC solo pudo ser incorporada en Agradecimientos.

2. Ibarrolaza A., Coppotelli B.M., Del Panno M.T., Donati E.R. and Morelli I.S. "Application of the Knowledge-Based Approach to Strain Selection for a Bioaugmentation Process of Phenanthrene and Cr(VI)-contaminated Soil". Journal of Applied Microbiology. 111:26-35. 2011.

Abstract

Aims: The objective of this study was to apply the knowledge-based approach to the selection of an inoculum to be used in bioaugmentation processes to facilitate phenanthrene degradation in phenanthrene- and Cr(VI)-co-contaminated soils.

Methods and Results: The bacterial community composition of phenanthrene and phenanthrene- and Cr(VI)-co-contaminated microcosms, determined by denaturing gradient gel electrophoresis analysis, showed that members of the Sphingomonadaceae family were the predominant micro-organisms. However, the Cr(VI) contamination produced a selective change of predominant Sphingomonas species, and in co-contaminated soil microcosms, a population closely related to Sphingomonas paucimobilis was naturally selected. The bioaugmentation process was carried out using the phenanthrene-degrading strain S. paucimobilis 20006FA, isolated and characterized in our laboratory. Although the strain showed a low Cr(VI) resistance ( $0.250 \text{ mmol l}^{-1}$ ); in liquid culture, it was capable of reducing chromate and degrading phenanthrene simultaneously.

Conclusion: The inoculation of this strain managed to moderate the effect of the presence of Cr(VI), increasing the biological activity and phenanthrene degradation rate in co-contaminated microcosm.

Significance and Impact of the Study: In this study, we have applied a novel approach to the selection of the adequate inoculum to enhance the phenanthrene degradation in phenanthrene- and Cr(VI)-co-contaminated soils.

Planificación y dirección de los trabajos experimentales y redacción del manuscrito. Cabe aclarar que al momento de mi ingreso como investigador de la CIC este manuscrito se encontraba en prensa, por lo que la mención de mi calidad de investigador de la CIC solo pudo ser incorporada en Agradecimientos.

**7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

3. Morelli I.S., Saparrat M.C.N., Del Panno M.T., Coppotelli B.M. and Arrambari A. "Bioremediation of PAHs contaminated soil by fungi" En: Fungi as Bioremediators. Ebrahim Mohammadi Goltapeh, Younes Rezaee Danesh & Ajit Varma (Editors). Series: Soil Biology. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, En Prensa. 2012.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a class of hazardous organic chemicals consisting of three or more fused benzene rings in linear, angular, and cluster arrangements (Cerniglia 1992). PAHs are unique contaminants in the environment because they are generated continuously by the inadvertently



incomplete combustion of organic matter, for instance, in forest fires, home heating, traffic, and waste incineration (Johnsen et al. 2005). It is estimated that more than 90 % of the total burden of PAHs resides in the surface soils, where most of these compounds accumulate (Wild and Jones 1995). These ubiquitous organic pollutants exhibit strong carcinogenic and toxic properties (Berthe-Corti et al. 2007). In soil, PAHs may undergo adsorption, volatilization, photolysis, and chemical oxidation, although microbial transformation is the major degradation process. The bioremediation of soil contaminated with PAHs should be a more efficient, financially affordable, and adaptable choice than physicochemical treatment because it presents potential advantages such as the complete degradation of the pollutants, lower treatment cost, greater safety, and less soil disturbance (Habe and Omori 2003). Several microorganisms, such as bacteria, yeasts, and filamentous fungi, are capable of using and mineralizing different types of PAHs. Low-molecular-weight (LMW) PAHs, such as naphthalene, phenanthrene, and anthracene, are usually readily degraded by bacteria and fungi in soil and under laboratory conditions (Peng et al. 2008). However, high-molecular-weight (HMW) PAHs (four and more rings) are more persistent, in part because of their low bioavailability, due to their strong adsorption onto the soil organic matter. Of the microorganisms identified to have the capability to degrade PAHs in the environment, fungi have been shown to be relatively more successful than bacteria in breaking down HMW PAHs (Potin et al. 2004). Furthermore, filamentous fungi have an advantage over unicellular forms since the fungal mycelium could grow into the soil and distribute itself through the solid matrix to degrade PAHs (Cerniglia 1997). This chapter summarizes the recent information on the metabolic pathway of the fungal transformation of PAHs and provides a critical review of previous work about fungal bioremediation of PAH-contaminated soil. This chapter discusses some of the most recently used fungal technology to enhance PAHs bioremediation process.

Diagramación y organización del capítulo de libro. Búsqueda bibliográfica y redacción de los puntos 1. Introducción, 2. PAHs as soil contaminants y 4. Fungal remediation of PAH-contaminated soil

### **7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.**

*Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

4. Festa S., Coppotelli B.M. and Morelli I.S. "Bacterial diversity and interactions between degradative bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated-soil". International Biodeterioration & Biodegradation. En revision. 2012.

Abstract

A phenanthrene-degrading consortium (CON-Phe) was obtained from a chronically contaminated soil. The consortium degraded 58% of the phenanthrene supplied during the first 7 days of incubation with the concomitant accumulation of 1-hydroxy-2-naphthoic acid (HNA). The composition of CON-Phe and its dynamic during phenanthrene degradation were determined using culture-dependent and independent approaches (polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries). Among the detected bacteria by both methods, Sphingomonadaceae family frequently occurred, but some genera were only observed through culture-dependent methods (*Enterobacter* sp. and *Pseudomonas* sp.) and others only through culture-independent methods (*Ochrobacterium* sp., *Alcaligenes* sp.). Five different strains were isolated and identified; between them only the strain AM (*Sphingobium* sp.) showed phenanthrene degradation. And only in strains AM and B (*Enterobacter* sp) evidence of the presence of PAH-ring

hydroxylating dioxygenases genes was found. In order to determine the role of the isolated strains in the CON-Phe and the interaction between them, the phenanthrene degradation by defined mixed cultures was studied. All the defined consortia, formed by strain AM together with another of the isolated strains, showed percentages of phenanthrene biodegradation significantly higher than the strain AM alone and the natural consortia. In addition, no accumulation of HNA was observed in these defined consortia. These results might suggest that in the soil consortia the competition between the species and the community dynamics could cause a negative effect in the phenanthrene degradation. On the other hand, a synergistic effect between the phenanthrene-degrading strain AM and the other isolated strains was observed.

5. Mora V.C., Madueño L, Peluffo M., Rosso J.A., Del Panno M.T. y Morelli I.S. "Remediation of phenanthrene-contaminated soil by simultaneous chemical and biological degradation processes". Enviado a Chemosphere. 2012.

#### Abstract

The degradation of phenanthrene by persulfate (PS) in freshly contaminated soil microcosms (unsaturated condition) was studied to assess its impact on the biodegradation process and on soil properties. Soil microcosms contaminated with 140 mg/kgDRY SOIL of phenanthrene were treated with different PS concentrations 0.86–41.7 gPS/kgDRY SOIL and incubated for 28 days. In these microcosms, residual concentration of PS declined after 7 days of treatment, and at this time the highest PS concentration tested achieved a 30% of phenanthrene elimination. However, PS concentrations higher than 21.0 g/kgDRY SOIL resulted in an important impact on soil pH, heterotrophic bacteria counts and bacterial community composition, determined by denaturing gradient electrophoresis, inhibiting the biodegradation process. The increase of soil electrical conductivity determined in the microcosms with 8.61gPS/kgDRY SOIL, suggested that the rise in the salinity of microcosms by the incorporation of higher PS concentration or additional ions (activation with Fe(II)/citrate) affected the soil bacterial community composition. The addition of PS concentrations of 4.34 and 8.61 gPS/kgDRY SOIL caused an initial biostimulatory effect on the phenanthrene elimination, possibly due to the generation of low molecular weight compounds from the soil organic matter, without negative changes on the studied physicochemical and biological soil properties.

#### **7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.**

*Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

Pessacq J., Bianchini F.E., Medina R., Terada C., Morelli I.S. and Del Panno M.T. "Assessment of the responsiveness to different stresses of the microbial community from long-term hydrocarbons contaminated soils".

Two hydrocarbon contaminated sites (S1 and S2), with different hydrocarbon-pollution history from La Plata-Ensenada petrochemical polo, were investigated with regard to their soil microbial resilience to different stresses. The S1 soil was underwent for more than 40 years to a diffuse hydrocarbon contamination while the S2 soil samples were taken from a landfarming unit, just bioremediated. We included a third site, a pristine soil (P) as control site. A chemical and microbiological evaluation of soils was done using measurements of chemical properties, bacterial counts, community level physiological profiles (CLPPs) by Biolog EcoPlate™ and several enzyme activities. The aliphatic hydrocarbon concentrations was similar in S1 and S2 soil samples, but highest PAH concentration was detected in S2 site (230.15 mg kg<sup>-1</sup>), being associated to their pollution history. Genetic diversity of the soil samples was measured as bands on denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of amplified 16S rDNA sequences from the soil community DNAs. The

integrated multivariate analysis from the all determinate soil properties, showed that P soil was characterized by an active soil microbial community related with the biogeochemical cycle of organic matter, with highest organics carbon content. The S1 and S2 soils were principally characterized by low OM content and CEC value, diminished urease, lipase and phosphatase activities. The stress treatments were conducted in microcosms and consisted of either declines in pH, increase in electrical conductivity or increases in soil Cd concentration, in two levels of each stress treatment. After fifteen days, the bacterial heterotrophic counts, enzymatic activities and CLPP patterns were performed. Resilience was detected in P soil microcosms after all stress treatments, and only after saline stress resilience in S1 soil microcosms was observed. Our result suggests that the different responses could be related with the previous history of contamination. In addition, the microbial catabolic diversity may provide additional sensitivity in detecting effects of the previous history of soil contamination on the properties of soil microbial communities.

**7.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

1. Utilización de persulfato para la remediación de suelos contaminados con fenantreno. Mora V.C., Rosso J.A., Del Panno M.T. y Morelli I.S. Expositor: Rosso J. XVII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica, Córdoba, Argentina. Mayo de 2011. Publicado en libro de resúmenes del congreso CP-127.
2. Incursion in the study of functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium. Festa S., Coppotelli B.M. y Morelli I.S. VII Congreso Argentino de Microbiología General Samige del Bicentenario. San Miguel de Tucumán, Argentina. Mayo de 2011. Expositor: Festa S. Publicado en libro de resúmenes del congreso.
3. Effect of the hydrocarbons contamination on the microbiological resilience of soils. Pessacq J., Bianchini F., Terada C., Morelli I.S. and Del Panno M.T. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2011). Torremolinos, España. Septiembre 2011. Expositor: Morelli I.S. Publicado en libro de resúmenes del congreso p 121.
4. Bioremediation of PAH-contaminated soil in semi-arid conditions: effect of autochthonous bioaugmentation strategies. Madueño L., Alvarez H.M. and Morelli I.S. Expositor: Morelli I.S. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2011). Torremolinos, España. Septiembre 2011. Publicado en libro de resúmenes del congreso p 547.
5. Impacto de la oxidación con persulfato sobre la comunidad bacteriana de un suelo contaminado con fenantreno. Mora V.C., Madueño L, Del Panno M.T., Rosso J. A. y Morelli I.S. XIX Congreso Latinoamericano y XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. "Latinoamérica unida protegiendo sus suelos". Mar del Plata, Argentina. Abril de 2012. Expositor: Rosso J. Publicado en libro de resúmenes del congreso.
6. Remediación de suelos contaminados con fenantreno por oxidación química: efecto de la concentración de oxidante. Mora V.C., Peluffo M., Rosso J.A., Del Panno M.T. y Morelli I.S. VII Congreso de Medio Ambiente de la AUGM. La Plata, Argentina. Mayo de 2012. Expositor: Peluffo M. Trabajo Completo Publicado en Actas del Congreso.
7. Evaluación del uso potencial de recortes de perforación de pozos de gas y petróleo en la rehabilitación de áreas degradadas. Paladino G. L., Satti P. S., Laos F., Morelli I. y Azcona C. 1er Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. 1er Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y



Tecnología Ambiental. Argentina y Ambiente 2012. Mayo de 2012. Expositor: Paladino G. Publicado en libro de resúmenes del congreso p.476.

8. Study of bioremediation processes in soils contaminated with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Barrios M., Festa S., Perez-Donoso J.M., Morelli I.S. and Coppotelli B.M. VIII Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE. Mar del Plata, Argentina. Julio de 2012. Expositor: Coppotelli B. Publicado en libro de resúmenes del congreso.

9. Study of the competence of a PAH-degrading strain to establish and promote the phenanthrene degradation by a native Phenanthrene-degrading consortium. M. Macchi, S. Festa, I.S. Morelli, B.M. Coppotelli. 14th International Symposium on Microbial Ecology- ISME-14. Copenhagen, Dinamarca. Agosto 2012. Expositor: Coppotelli B. Resumen publicado en CD.

10. Physiological and Molecular responses to water stress of a PAH-degrading bacterium isolated from Patagonian soil. L. Madueño, B.M. Coppotelli, I.S. Morelli, H.M. Alvarez. 14th International Symposium on Microbial Ecology- ISME-14. Copenhagen, Dinamarca. Expositor: Coppotelli B. Resumen publicado en CD.

**7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.** *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

## **8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.**

**8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

**8.2 PATENTES O EQUIVALENTES.** *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

**8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.** *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

Desarrollo y optimización de técnicas biológicas de remediación para la recuperación de grandes volúmenes de suelos impactados con hidrocarburos.

Proyecto de desarrollo tecnológico en el que participa el grupo de Medio Ambiente de la Centro Tecnológico de Argentina YPF S.A. y 5 grupos de investigación de distintas universidades del país. El objetivo del mismo es el desarrollo de un tren de tratamientos (físicoquímicos y biológicos) para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, que permitan reducir los tiempos de tratamiento y mejorar el nivel de limpieza alcanzado.

Director de una de las líneas: Morelli Irma Susana.

Período: 2010- 2012.

Actividades: Participación en reuniones de discusión e intercambio de ideas entre los distintos participantes, elaboración del proyecto.

**8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES** *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

**8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.**

**9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.** Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.

Derrame de petróleo crudo en arenas de costa del Río de La Plata: estudio del impacto sobre las comunidades microbianas. Diciembre de 2009 a Marzo de 2011.

A pedido de la UIDD Gestión Ambiental; Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de la Plata, en el marco de un convenio con el Centro Tecnológico de Argentina YPF S.A.

Monto Facturado por la Fundación Ciencias Exactas: \$50.000

A cargo de la dirección del servicio y redacción de informe final (Marzo de 2011). Aproximadamente 15% de mi carga horaria durante los meses de Enero a Marzo de 2011.

**10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

**10.1 DOCENCIA**

**10.2 DIVULGACIÓN**

**11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.** Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

Dirección de Becarios

Doctorales

1. Lic. Laura Madueño. Beca de Postgrado Cofinanciada con Empresas. CONICET- OIL M&S S.A. 2007-2011. Beca de Posgrado Tipo II CONICET 2011-2013. Director: Dra. Irma Morelli. Codirector: Dr. Héctor Álvarez. Tema: Obtención de inoculantes bacterianos y evaluación de su aplicación en procesos de biorremediación de suelos de la Patagonia semiárida contaminados con PAH.

2. Lic. Sabrina Festa. Beca de Postgrado Tipo I CONICET 2011-2014. Director: Irma Morelli. Tema: Estudio de la estructura y función de las comunidades microbianas de suelos contaminados con PAH: un abordaje molecular.

3. Lic. Marina Peluffo. Beca de Postgrado Tipo I CONICET 2012-2015. Director: Janina Rosso. Codirector: Dra. Irma S. Morelli. Tema: Remediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) utilizando procesos de oxidación química en reactores batch.

Postdoctorales

1. Dra. Bibiana Coppotelli. Beca Interna Postdoctoral CONICET 2008-2011. Director: Irma Morelli. Codirector: María Eugenia Rodríguez. Tema: Estudio de consorcios bacterianas degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

2. Dra. Verónica Mora. Beca Interna Postdoctoral CONICET 2010-2011. Director: Irma Morelli. Codirector: Janina Rosso. Tema: Remediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) por combinación de procesos de oxidación química y biorremediación.

Dirección de Investigadores

1. Dra. Verónica Mora. Investigador Asistente CONICET. Resolución 1008/11. Director: Irma Morelli. Tema: Remediación de suelos crónicamente contaminados con

hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) por combinación de procesos de oxidación química y biorremediación.

2. Dra. Bibiana Coppotelli. Investigador Asistente CONICET. Resolución 3446/11. Director: Irma Morelli. Tema: Estudio de consorcios bacterianas degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

**12. DIRECCION DE TESIS.** *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

1. Lic. Laura Madueño (2007-continúa). Alumno de la carrera del doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Director: Dra. Irma Morelli. Codirector: Dr. Héctor Álvarez. Tema: Obtención de inoculantes bacterianos y evaluación de su aplicación en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) de la Patagonia semiárida.

2. Lic. Gabriela Lucía Paladino (2010- continúa). Alumna de la Carrera del Doctorado en Biología de la Universidad Nacional del Comahue (Centro Regional Universitario Bariloche). Director: Dra. Patricia S. Satti Codirector: Dra. Irma Morelli. Tema: Factibilidad de biotratamiento de recortes de perforación de pozos de gas y petróleo.

3. Lic. Sabrina Festa (2011-continúa). Alumno de la carrera del doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Director: Dra. Irma Morelli Codirector: Dra. Bibiana M. Coppotelli. Tema: Estudio de la estructura y función de las comunidades microbianas de suelos contaminados con PAH: un abordaje molecular.

4. Lic. Constanza Hozbor (2012-continúa). Alumno de la carrera del doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Director: Dra. Irma Morelli Codirector: Dra. Silvia Peressutti. Tema: Estructura del bacterioplancton en el estuario del Río de la Plata y el sector costero bonaerense.

**13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

1. Participación en el IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2011). Torremolinos, España. Septiembre 2011. Presentación de los trabajos (Poster):

Effect of the hydrocarbons contamination on the microbiological resilience of soils. Pessacq J., Bianchini F., Terada C., Morelli I.S. and Del Panno M.T.

Bioremediation of PAH-contaminated soil in semi-arid conditions: effect of autochthonous bioaugmentation strategies. Madueño L., Alvarez H.M. and Morelli I.S.

2. Participación como expositora en el 2do Encuentro Tecnológico PETROBRAS-CONICET. Buenos Aires, diciembre 2011.

Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Del Panno M.T. y Morelli I.S.

3. Participación como expositora en la primera Jornada organizada por la Red de Estudios Ambientales La Plata (REALP) "Cuidando el Medio Ambiente desde diferentes enfoques". La Plata, junio de 2012.

Biodiversidad en acción: ecología microbiana de los procesos de biorremediación de suelos contaminados con PAH. Morelli I.S.

**14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

**15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

1. Proyecto: Estudio de la estructura, diversidad y funcionalidad de consorcios bacterianos degradadores de PAH. Aplicación de estrategias “ómicas”. Acreditado por la UNLP. Subsidio automático 2011. Monto: \$9.033
2. Proyecto: Remediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) por combinación de procesos de biorremediación y oxidación química. Integrante del grupo responsable. PICT Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica. Período: 2011-2014. Monto: \$280.000.
3. Subsidio para Asistencia a Reuniones Científicas y Tecnológicas, CIC-PBA, para asistir a IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2011), 14 al 18 de septiembre de 2011. Monto: \$7.500
4. Subsidio Pequeños Equipamientos 2011. UNLP. Monto \$8.000.
5. Subsidio Institucional CIC-PBA, 2012. Monto: \$5.600.
7. Proyecto: Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos: una visión molecular. Acreditado por la UNLP. Subsidio automático 2012. Monto: \$6.267.
7. Subsidio para viajes y estadía de la UNLP, para asistir al 12th International UFZ-Deltares Conference on Groundwater-Soil-Systems and Water Resource Management (AquaConSoil 2013). 14 al 19 de abril de 2013. Barcelona, España. Monto \$7.000.
8. Subsidio para Asistencia a Reuniones Científicas y Tecnológicas, CIC-PBA, para asistir al 12th International UFZ-Deltares Conference on Groundwater-Soil-Systems and Water Resource Management (AquaConSoil 2013). 14 al 19 de abril de 2013. Barcelona, España. Monto: \$5.000

**16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

**17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

**18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

Profesor integrante de la Comisión de Seguridad e Higiene de la Facultad de Ciencias Exactas. 2005-2012. Aproximadamente un 2% de mi cargo horaria.

Miembro del Consejo Directivo del CINDEFI. UNLP-CONICET. 2011. .Aproximadamente un 2% de mi cargo horaria.

**19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Profesor Adjunto a cargo de una comisión de la Asignatura Microbiología General (1er semestre) y a cargo de la Asignatura Ecología Microbiana (segundo semestre). Dictado de clases teóricas, toma y corrección de exámenes parciales, toma de exámenes finales. Aproximadamente un 25% de mi cargo horaria.

Profesor invitado a dictar el Seminario “Recuperación de Sitios Contaminados” (24hs) de la Maestría en Ingeniería Ambiental y/ o Especialización en Ingeniería Ambiental, Facultad Regional La Plata, UTN. Octubre de 2011 y 2012. Aproximadamente un 10% de mi carga horaria durante el mes de Octubre.



**20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

- Jurado Titular del Trabajo de Tesis Doctoral de la Lic. Patricia Bolla: “Desarrollo de un alimento funcional deshidratado constituido por microorganismos aislados de kefir”. Dirigido por la Dra. Graciela De Antoni y por el Dr. Patricio de Urza. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 22 de Marzo de 2011.
- Jurado Titular del Trabajo de Tesis Doctoral del Bioq. Alejandro Miñán “Empleo de espectroscopía infrarroja y espectrometría MALDI-ToF para la identificación de organismos pertenecientes al complejo Burkholderia cepacia aislados de pecientes fibroquísticos. Estudios comparativos de susceptibilidad a agentes antimicrobianos entre poblaciones planctónicas y sésiles”. Dirigido por el Dr. Osvaldo M. Yantorno. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 28 de Junio de 2011.
- Jurado Titular del Trabajo de Tesis Doctoral de la Mgt. María Cecilia Medaura “Micorremediación. Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Reactores de Fase Sólida. Dirigido por el Dr. Xabier Moreno-Ventas. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo. 24 de Octubre de 2011.
- Jurado Titular del Trabajo de Tesis Doctoral del Bioq. Matías Fingermann “Caracterización Molecular y Funcional de la Respuesta a la Acidez en Bordetella bronchiseptica. Posible rol en la Infección Persistente. Dirigido por la Dra. Daniela Hozbor. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 30 de Noviembre de 2011.
  - Jurado Titular del Trabajo de Tesis de Tesis Doctoral de la Lic. María Fernanda Hamet, “Polisacáridos de bacterias lácteas de fermentos artesanales para el desarrollo de alimentos funcionales. Estudio del efecto prebiótico”. Dirigido por la Dra. Analía Abraham. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 13 de Abril de 2012.

Evaluación de Actividades Científicas y Tecnológicas

- Evaluador de Proyectos UBA 2011.
- Revisor de un manuscrito “Journal of Hazardous Materials”. 2012.
- Revisor de un manuscrito “Letters of Applied Microbiology”. 2012.
- Revisor de un manuscrito “Journal of Applied Microbiology”. 2012.
- Participación en la evaluación y acreditación de proyectos e informes de investigación de la Universidad Nacional de General Sarmiento. 2012.

**21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

**BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS: UNA VISIÓN MOLECULAR**

Objetivos Generales

La biorremediación tiene hoy en día gran aceptación como tratamiento para la recuperación de suelos contaminados con PAH, debido a que ha demostrado ser una tecnología efectiva, costo-competitiva y ambientalmente amigable. Sin embargo, la optimización de las distintas estrategias de biorremediación requiere de un profundo conocimiento de los factores que gobiernan la diversidad, dinámica y versatilidad catabólica de la comunidad microbiana del sitio contaminado.

Los avances en las técnicas cultivo independientes (“ómicas”) junto con las herramientas bioinformáticas actuales nos han proporcionado la posibilidad de realizar una mirada aguda sobre las comunidades microbianas. Esto ha conducido a los microbiólogos ambientales a reconocer al estudio de las comunidades microbiana de ambientes contaminados como un parámetro ecológico imperativo para dilucidar los mecanismos

que determinan el éxito de la biorremediación y definir entonces condiciones operativas óptimas.

En este marco el presente proyecto tiene como objetivo general contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos relacionados con la ecología microbiana de los procesos de biorremediación de suelos contaminados con PAH; además de contribuir al desarrollo de la metaproteómica y la metagenómica funcional como herramientas metodológicas que permitan caracterizar la diversidad funcional de la comunidad microbiana del suelo.

#### Objetivos específicos

- I Evaluar distintos protocolos de extracción de proteínas totales en muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos y establecer la metodología de extracción que permita obtener un mayor rendimiento y una buena resolución en la separación de proteínas en geles de 2D.  
A partir de un suelo prístino, sin historia de contaminación previa, se prepararán dos microcosmos de 250g de suelo aproximadamente, uno control y otro contaminado con una mezcla de PAH de 2, 3 y 4 ciclos bencénicos en un rango de 1000-2000mg/Kg de concentración total. Los microcosmos serán mantenidos en condiciones adecuadas para el desarrollo microbiano, bajo temperatura y humedad controlada y aireando mediante mezclado periódico. Semanalmente se monitoreará la actividad deshidrogenasa total del suelo (como medida de las capacidades oxidativas de la comunidad microbiana) y la concentración de los PAH remanente (HPLC-UV).  
Cuando alguno de los dos parámetros indique el comienzo de una fase activa de degradación en el microcosmo contaminado, se tomarán una muestra de cada microcosmos a las que se les aplicarán diferentes protocolos para la obtención de proteínas. Se comparará la eficiencia de los distintos protocolos de extracción en cuanto a: concentración de proteínas (Qubit® 2.0 Fluorometer, Invitrogen) y obtención de una buena separación en 2D-PAGE (Wilmes y Bond, 2004).
- II Aplicar herramientas metagenómicas y metaproteómicas al estudio de los cambios en la estructura y función de la comunidad microbiana del suelo por efecto de la contaminación con PAH y durante el proceso de biorremediación.  
Se preparará un microcosmos (por triplicado) contaminado con una mezcla de PAH de 2, 3 y 4 ciclos bencénicos en un rango de 1000-2000mg/Kg de concentración total. Adicionalmente se preparará un microcosmo control. Los microcosmos serán mantenidos en condiciones adecuadas para el desarrollo microbiano, bajo temperatura y humedad controlada y aireando mediante mezclado periódico. Semanalmente se monitoreará la actividad deshidrogenasa total del suelo (como medida de las capacidades oxidativas de la comunidad microbiana) y la concentración de los PAH remanente (HPLC-UV).  
A tres tiempos diferentes: inicial, período de mayor actividad biológica (medida a través de la actividad deshidrogenasa) y cuando la concentración de PAH haya alcanzado el "plateau" se determinará:
  - a) Diversidad de la comunidad bacteriana del suelo: Se evaluará a través de la construcción de una librería de genes 16S rRNA de seis muestras de suelo correspondientes a los tres tiempos del sistema contaminado y sus respectivos controles. A partir de las secuencias obtenidas para cada muestra se construirá la curva de rarefacción y se calculará el índice de diversidad de especies de Shannon. Las secuencias obtenidas serán comparadas con la base de datos de GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) usando el programa BLAST, para la identificación filogenética.

El DNA total de una muestra de suelo obtenida en el momento de mayor actividad biológica en el microcosmo contaminado, y el de su respectivo control, serán enviados a INDEAR para la evaluación de la biodiversidad por pirosecuenciación utilizando la plataforma GS-FLX de 454 Life Sciences, levantando la región V4 del 16S rRNA (240 pb) y su posterior análisis bioinformático. Este análisis nos permitirá determinar la representatividad de los resultados obtenidos a través de la librería genómica, así como también establecer la diversidad de Arqueobacterias eventualmente presentes en el momento de mayor actividad degradativa, y probablemente involucradas en el proceso de biorremediación.

- b) **Metagenómica funcional:** Se construirá una librería genómica de fragmentos de entre 35–45 kb obtenidos a partir del DNA total de las tres muestras (inicial, mayor actividad biológica y plateau) correspondientes al microcosmo contaminado; utilizando el Kit pWEB-TNC™ Cosmid Cloning (Epicentre®). Sobre los clones obtenidos se realizará una selección preliminar utilizando la metodología descrita por Wrenn y Venosa (1996), para determinación de bacterias degradadoras de PAH. Aquellos clones que hayan evidenciado degradación se los crecerá en medio con PAH, con el fin de determinar metabolitos intermedios (HPLC-UV) que nos permitan dilucidar el grado de extensión de la degradación para luego poder vincularla con los genes presentes en cada clon. Con el fin de identificar los genes presentes en los clones positivos se utilizará el kit pWEB::TNC Deletion Cosmid Transposition (Epicentre®), los sub-clones con el menor inserto que mantengan la expresión de la degradación serán secuenciados y comparados con el GenBank.
- c) **Dinámica funcional:** a partir del DNA total de seis muestras de suelo correspondientes a los tres tiempos del sistema contaminado y sus respectivos controles, se cuantificará a través de PCR en tiempo real la concentración de bacterias totales (primers dirigido al gen 16S rRNA) y la concentración de genes de funcionales. En principio para la cuantificaciones de genes degradadores se estudiarán los genes de las enzimas PAH-dioxigenasa descritas hasta el momento (primers dirigidos a la subunidad  $\alpha$  (PAH-RHD $\alpha$ ) de la PAH-dioxigenasas descritas en bacterias Gram Positivas y Gram Negativas).
- d) **Metaproteómica:** a partir de los resultados obtenidos en el objetivo I, se realizará la extracción de proteínas totales de seis muestras de suelo correspondientes a los tres tiempos del sistema contaminado y sus respectivos controles. Se realizará la separación por 2D- PAGE de los extractivos.

Los perfiles proteicos encontrados a los distintos tiempos de tratamiento en el microcosmos contaminado serán comparados entre ellos y con los obtenidos en el sistema control, utilizando para la comparación el programa Proteomweaver Versión 4.0. (Bio-Rad).

De la comparación de los proteomas se seleccionarán, en primera instancia, los spots que se encuentren significativamente sobre expresados en los microcosmos contaminados, los cuáles serán cortados, digeridos y analizados (MALDI-TOF-TOF). Los espectros de masa serán contrastados, utilizando MASCOT (Matrix Science, Boston, MA) algoritmo y NCBIInr.

## BIBLIOGRAFÍA

- Cébron A., Norini M-P., Beguiristain T. and Leyval C. (2008). Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methods* 73:148–159.
- Chauhan A. and Jain R.K. (2010). Biodegradation: gaining insight through proteomics. *Biodegradation* 21:861-879.

- Chen S., Rillig M. and Wang W. (2009). Improving soil protein extraction for metaproteome analysis and glomalin-related soil protein detection. *Proteomics* 9:4970–4973.
- Colwell R.K. and Coddington J.A. (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B*, 345: 101-118.
- Del Panno M.T., Morelli I., Engelen B. and Luise Berthe-Corti. (2005). Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during a soil bioremediation process. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 305-316.
- Desai C., Pathak H. and Madamwar D. (2010). Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 101: 1558–1569.
- Ehlers M. and Cloete T.D. (1999). Comparing the protein profiles of 21 different activated sludge systems after SDS-PAGE. *Wat. Res.* 33:1181-1186.
- Harayama S., Kasai Y. and Hara A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:205-214.
- Liu Z., DeSantis T.Z., Anderson G.L. and Knight R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.* 36:e120.
- Morelli IS, Del Panno MT, De Antoni GL and Paineira MT. (2005). Laboratory Study on the Bioremediation of Petrochemical Sludge-Contaminated Soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55:271-278.
- Peng J-J., Cai C., Qiao M., Li H and Zhu J-G. (2010). Dynamic changes in functional gene copy numbers and microbial communities during degradation of pyrene in soils. *Environ. Pollut.* 158: 2872-2879.
- Schneider T. and Riedel K. (2010). Environmental proteomics: analysis of structure and function of microbial communities. *Proteomics* 10:785–798.
- Taylor E. and Williams M. (2010). Microbial protein in soil: Influence of extraction method and C amendment on extraction and recovery. *Microb. Ecol.* 59:390–399.
- Vasconcellos S.P., Figueiredo Angolini C.F., Sierra García I.N., Martins Dellagnezze B., Canedo da Silva C., Marsaioli A.J., Vaz dos Santos Neto E. and Maia de Oliveira M. (2010). Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Organic Geochem.* 41:675–681.
- Wang H-B., Zhang Z-X., Li H., He H-B., Fang C-X., Zhang A-J., Li O-S., Chen R-S., Guo X-K., Lin H-F., Wu L-K., Lin S., Chen T., Lin R-Y., Peng X-X. and Lin W-X. (2011). Characterization of metaproteomics in crop rhizospheric soil. *J. Proteome Res.* 10:932–940.
- Williams M.A., Taylor E.B. and Mula H.P. (2010). Metaproteomic characterization of a soil microbial community following carbon amendment. *Soil Biol. Biochem.* 42:1148–1156.
- Wilmes P. and Bond P.L. (2004). The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environ. Microbiol.* 6:911–920.
- Wrenn B.A. and Venosa, A (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon-degrading bacteria by a most probable number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42:252–258.

## REMEDIACIÓN DE SUELOS CRÓNICAMENTE CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (PAH) POR COMBINACIÓN DE PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN Y OXIDACIÓN QUÍMICA.

### Objetivos Generales



El presente proyecto propone estudiar el efecto de diferentes estrategias de remediación basadas en la combinación de técnicas de oxidación químicas y procesos biológicos, en la recuperación de suelos crónicamente contaminados con PAH. Se evaluará la potencialidad de los métodos químicos de aumentar la biodisponibilidad de PAH en diferentes tipos de suelo, combinado con estrategias de bioestimulación y compostaje, con el fin de recuperar y/o incrementar la capacidad catabólica de la comunidad microbiana del suelo responsable de la degradación del contaminante, teniendo como meta la restauración de la función ecológica del suelo.

#### Objetivo específico

I Evaluar la eficiencia de las técnicas de oxidación química con  $S_2O_8^{2-}$  o  $H_2O_2$  sobre la eliminación de PAH (total y fracción biodisponible) y calidad del suelo, en microcosmos de suelo crónicamente contaminado con PAH.

a. Aplicación de diferentes procesos de oxidación química directa

Sobre diferentes sets de microcosmos de suelo crónicamente contaminado, se aplicarán diferentes técnicas oxidativas y evaluará su impacto sobre:

- i) la concentración de hidrocarburos totales del petróleo HTP por GC-FID
- ii) la fracción PAH por extracción exhaustiva con n-hexano por GC-FID
- iii) la concentración de intermediarios de la degradación de PAH por HPLC, GC-masa.
- iv) la fracción PAH-biodisponible mediante extracción acuosa con XAD-2.

Un set de tres microcosmos será reservado como Control, sobre el que no se aplicará ningún tratamiento químico.

La eficiencia de las diferentes técnicas oxidativas sobre la eliminación del contaminante (en las diferentes fracciones analizadas) será evaluada estadísticamente aplicando ANAVA, a través del análisis comparativo entre los sets de microcosmos sometidos a diferentes tratamientos químicos, y el set Control sin tratamiento.

b. Evaluación del impacto de las técnicas de oxidación química con  $S_2O_8^{2-}$  o  $H_2O_2$  sobre la calidad del suelo, en microcosmos de suelo crónicamente contaminado con PAH.

El material de los diferentes microcosmos sometidos a oxidación química será caracterizado físico-química y biológicamente, según:

- pH, textura, capacidad de intercambio catiónico, contenido de materia orgánica y relación C:N:P.
- Recuentos de poblaciones microbianas, actividades enzimáticas (deshidrogenasa, lipasas, proteasas, ureasas, fosfatasas).
- Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana (cultivables y no-cultivables) utilizando métodos de fingerprint a partir del DNA total extraído de la muestra de suelo, y PCR-DGGE con iniciadores dirigidos a la fracción 16S rDNA de eubacteriales.
- Determinación del perfil catabólico de comunidad mediante la capacidad de asimilar diversos sustratos, en policubetas de EcoPlate de Biolog®.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Ahlf W., Frühling W. and Neumann-Hensel H. (2001) Advances in Biological Assessment of Chemical-Impacted Soils. In: R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmano, G. Matz (Eds.), Treatment of Contaminated Soil – Fundamentals, Analysis, Applications, Springer, Berlin, 161-177.
- Brown G.S., Barton L.L. and Thomson B.M. (2003). Permanganate oxidation of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons. Waste Manage 23: 737–740.
- Barton L.L. and Thomson B.M. (2003). Permanganate oxidation of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons. Waste Manage 23: 737–740.

- Fukushima M., Ichikawa H., Kawasaki M., Sawada A., Morimoto K., and Tatsumi K. (2003). Effects of humic substances on the pattern of oxidation products of pentachlorophenol induced by a biomimetic catalytic system using tetra(p-sulfophenyl)porphineiron(III) and KHSO<sub>5</sub>. *Environ Sci Technol* 37:386–394.
- Fukushima M., and Tatsumi K. (2001). Degradation pathways of pentachlorophenol by photo-Fenton systems in the presence of iron(III), humic acid and hydrogen peroxide. *Environ Sci Technol* 35:1771–1778.
- Huang K.C., Couttenye R.A. and Hoag G.E. (2002). Kinetics of heat-assisted persulfate oxidation of methyl tert-butyl ether (MTBE). *Chemosphere* 49:413-420.
- Huesemann M., Hausmann T. and Fortman T. (2004). Does Bioavailability Limit Biodegradation? A Comparison of Hydrocarbon Biodegradation and Desorption Rates in Aged Soils. *Biodegradation*, 15, 261-274.
- Huling S.G. and Pivetz B.E. (2006). In-situ Chemical Oxidation. USEPA/600/R-06/ 072, 28 July.
- Karlen D.L., Mausbach M.J., Doran J.W., Cline R.G., Harris R.F., and Schumann G.F. (1997). Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Science Society of America Journal* 61: 4-10.
- Kulik N., Goi A., Trapido M. and Tuhkanen T. (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *J Environ Manage* 78: 382-391.
- Laurent, F., Cébron, A., Schwartz, C., Leyval, C. (2012). Oxidation of a PAH polluted soil using modified Fenton reaction in unsaturated condition affects biological and physico-chemical properties. *Chemosphere* 86, 659-664.
- Lee B.-D. and Hosomi M. (2001). A hybrid Fenton oxidation-microbial treatment for soil highly contaminated with benz(a)anthracene. *Chemosphere* 43: 1127–1132.
- Millioli V.S., Freire D.D.C. and Cammarota M.C. (2003). Petroleum oxidation using Fenton's reagent over beach sand following a spill. *J Hazard Mater* 103: 79–91.
- Mora V.C., Rosso J.A., Carrillo Le Roux G., Mártire D.O. and Gonzalez M.C. (2009). Thermally activated peroxydisulfate in the presence of additives: A clean method for the degradation of pollutants. *Chemosphere* 75: 1405–1409.
- Morelli I., Vecchioli G., Del Panno M. and Paineira M. T. (2001). Effect of petrochemical sludge concentrations on changes in mutagenic activity during soil bioremediation process. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 2179-2183.
- Nam K., Rodriguez W. and Kukor J. (2001). Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction. *Chemosphere* 45: 11-20.
- Palmroth M.R.T., Langwaldt J.H., Aunola T.A., Goi A., Puhakka J.A. and Tuhkanen T.A. (2006). Treatment of PAH-contaminated soil by combination of Fenton's reaction and biodegradation. *J Chem Technol Biotechnol* 81: 598–607.
- Pandey J., Chauhan A. and Jain R.K. (2009). Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. *FEMS Microbiol Rev* 33: 324–375.
- Parales R.E. and Haddock J.D. (2004) Biocatalytic degradation of pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 15: 374–379.
- Rosso J.A., Allegretti P., Mártire D.O. and Gonzalez M.C. (1999). Reaction of sulphate and phosphate radicals with  $\alpha\alpha$ -trifluorotoluene. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*: 205-210.
- Sirguy C., de Souza e Silva P.T., Schwartz C. and Simonnot M.-O. (2008). Impact of chemical oxidation on soil quality. *Chemosphere* 72: 282-289.
- Sutton, N.B., Grotenhuis, J.T.C., Langenhoff, A.A.M., Rijnaarts, H.H.M., (2011). Efforts to improve coupled in situ chemical oxidation with bioremediation: a review of optimization strategies. *J. Soils Sediments* 11, 129-140.
- Tsitonaki, A., Petri, B., Crimi, M., Mosbk, H., Siegrist, R., Bjerg, P.L. (2010). In situ chemical oxidation of contaminated soil and groundwater using persulfate: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 40, 55-91.

- 
- Valderrama C., Alessandri R., Aunola T., Cortina, J.L., Gamisans X., and Tuhkanen T. (2009). Oxidation by Fenton's reagent combined with biological treatment applied to a creosote-contaminated soil. J Hazard Mater 166: 594-602.
- 

**Condiciones de la presentación:**

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
  - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período .....".
  - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: [infinvest@cic.gba.gov.ar](mailto:infinvest@cic.gba.gov.ar) (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
  - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

---

**Nota:** El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.