

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2013-2014

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

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:

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

² 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: "Biorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos: una visión molecular" y "Optimización de procesos de biorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos y evaluación del grado de restauración de la funcionalidad del suelo alcanzado". Discusión de resultados, redacción de trabajos e informes y divulgación de resultados. Se presenta un resumen de los principales resultados.

1. Biorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos: una visión molecular

El presente proyecto tiene como objetivo general contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos relacionados con la ecología microbiana y la efectividad de estrategias de bioaumentación, aplicadas a la biorremediación de suelos contaminados con PAH; además de contribuir al desarrollo de herramientas metodológicas que permitan caracterizar la dinámica funcional de las comunidades microbianas durante los procesos de biorremediación y permita dilucidar la efectiva contribución de las cepas y/o consorcios inoculados.

Se estudió la efectividad de un consorcio degradador de PAH y los cambios producidos en su estructura y composición cuando este se inocula con una cepa competitiva.

El consorcio (CON) se obtuvo de suelo crónicamente contaminado con PAH y se inoculó con la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA capaz de degradar un amplio rango de PAH, generando un nuevo consorcio.

El estudio de las capacidades degradativas, la composición filogenética mediante pirosecuenciación de fragmentos del gen 16S rRNA, y del metaproteoma de los dos consorcios nos permitió demostrar que la cepa introducida (con capacidades metabólicas ventajosas) es altamente competitiva y se adaptó a las condiciones imperantes dentro del CON durante la degradación de fenantreno, incrementando su potencial degradativo.

En trabajos previos se observó que CON+I degrada una significativamente mayor cantidad de fenantreno que CON.

Se determinó el impacto de distintos inoculantes (consorcio y cepa aislada) sobre la diversidad de la comunidad microbiana de un suelo contaminado con fenantreno, por pirosecuenciación (Roche 454 FLX), amplificando la región V3-V4 del 16S rADN.

Se prepararon 4 sistemas: suelo limpio, contaminado con fenantreno (F) y contaminados e inoculados con un consorcio degradador de fenantreno (F+CON) y con una cepa degradadora (*Sphingobium* sp.) aislada del consorcio (F+AM); que fueron incubados 63 días (24°C y 21% de humedad). La concentración de fenantreno se determinó por HPLC.

La concentración de fenantreno en los sistemas inoculados fue significativamente menor ($P < 0,05$) a la de F. Al día 15, momento de mayor actividad degradadora, se

extrajo el ADN total del suelo. Se obtuvo en promedio 1923 secuencias filtradas por muestra, agrupadas en 1069 OTUs ($\geq 97\%$ similitud). El análisis de rarefacción mostró aceptable cobertura de la diversidad de las muestras. La contaminación causó reducción en los índices de riqueza y de diversidad. En F+AM se observó aumento de la riqueza y disminución de la diversidad, la inoculación con CON causó el efecto contrario.

La contaminación produjo reducción en los órdenes Rhodocyclales, Chthoniobacteriales y Acidobacteriales, acentuada en F+AM. Las poblaciones estimuladas por el fenantreno fueron Actinomycetales, Burkholderiales y Sphingomonadales; la inoculación de AM produjo un aumento adicional de Sphingomonadales y Burkholderiales, en F+CON se observó un aumento relativo de Burkholderiales.

La inoculación con una cepa aislada causó el mayor impacto sobre la comunidad microbiana del suelo.

Parte de estos resultados han sido publicados en un artículo publicado en una revista internacional, un manuscrito enviado, un trabajo extendido en un Congreso Internacional y 3 presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales.

2. Optimización de procesos de biorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos y evaluación del grado de restauración de la funcionalidad del suelo alcanzado

El presente proyecto representa un abordaje integral que pretende aportar conocimientos básicos que permitan el desarrollo de estrategias de biorremediación efectivas, así como también definir parámetros que permitan evaluar el grado de restauración de la funcionalidad y estabilidad de los suelos sometidos a las distintas estrategias de biorremediación.

Se realizó la caracterización físico-química (tradicional y utilizando métodos espectroscópicos) y microbiológica (dependiente e independiente de cultivo, incluyendo técnicas de secuenciación de última generación) de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos de la Provincia de Buenos Aires. Sobre estos mismos suelos se ensayaron distintas estrategias de biorremediación tendientes a: i) incrementar la biodisponibilidad (oxidación; agregado de surfactante), ii) aumentar la diversidad catabólica (inoculación de cultivos puros y consorcios), iii) mejorar las condiciones ambientales que favorezcan la actividad de la comunidad microbiana autóctona (compostaje, enmienda con composta maduro y fertilización con sales minerales).

Los resultados obtenidos nos permitieron establecer correlaciones entre las características físico-químicas de los suelos y la efectividad de las distintas estrategias ensayadas, encontrando que, en los suelos hasta ahora estudiados, la biodisponibilidad del contaminante sería el factor limitante. La incorporación de los métodos espectroscópicos nos permitió evaluar el efecto de los distintos procesos de biorremediación, de un modo integral, incorporando el efecto sobre la matriz del suelo. Así mismo la utilización de métodos de secuenciación de última generación nos permitió evaluar con mayor detalle la dinámica de la comunidad microbiana y su relación con la efectividad del proceso. Estos resultados en su conjunto constituyen un significativo aporte al desarrollo de estrategias de remediación efectivas

Por otro lado se completaron los estudios de resiliencia frente a distintos estreses (acidez, salinidad, contaminación con metales) de uno de los suelos contaminados con hidrocarburos, como punto de partida para luego comparar el grado de restauración alcanzado por las estrategias de biorremediación.

Parte de estos resultados han sido publicados en un artículo publicado en una revista internacional, dos artículos en prensa, un trabajo extendido en un Congreso Internacional y 7 presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales.

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.

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.*

Capítulos de libro

1. 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, 159-179, 2013.

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

Revistas con referato

2. Festa S., Coppotelli B.M. and Morelli I.S. "Bacterial diversity and functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated-soil". *International Biodeterioration & Biodegradation*. 85: 42-51. 2013.

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.

Planificación y dirección de los trabajos experimentales y redacción del manuscrito.

3. Mora V.C., Madueño L, Peluffo M., Rosso J.A., Del Panno M.T. and Morelli I.S. "Remediation of phenanthrene-contaminated soil by simultaneous chemical and biological degradation processes". *Environmental Science and Pollution Research*. 21:7548-7556. 2014.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous compounds with carcinogenic and/or mutagenic potential. To address the limitations of individual remediation techniques and to achieve better PAH removal efficiencies, the combination of chemical and biological treatments can be used. The degradation of phenanthrene (chosen as a model of PAH) by persulfate in freshly contaminated soil microcosms was studied to assess its impact on the biodegradation process and on soil properties. Soil microcosms contaminated with 140 mg/kg DRY SOIL of phenanthrene were treated with different persulfate (PS) concentrations 0.86-41.7 g/kg DRY SOIL and incubated for 28 days. Analyses of phenanthrene and persulfate concentrations and soil pH were performed. Cultivable heterotrophic bacterial count was carried out after 28 days of treatment. Genetic diversity analysis of the soil microcosm bacterial community was performed by PCR amplification of bacterial 16S rDNA fragments followed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The addition of PS in low concentrations could be an interesting biostimulatory strategy that managed to shorten the lag phase of the phenanthrene biological elimination, without negative effects on the physicochemical and biological soil properties, improving the remediation treatment.

Planificación y dirección de los trabajos experimentales y redacción del manuscrito.

Proceedings o Trabajos Extendidos en Actas de Congresos.

4. Festa S., Macchi M., Coppotelli B.M y Morelli I.S. "Bioaugmentation of phenanthrene-contaminated soil: Effects of the inoculation with defined and undefined PAH-degrading consortia on soil microbial community and biodegradation". 12th International UFZ-Deltares Conference on Groundwater-Soil-Systems and Water Resource Management (AquaConSoil 2013). 16-19 de Abril de 2013, Barcelona, España. Expositor: Morelli I.S. Trabajo completo publicado en el libro de Proceedings del Congreso.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are pollutants that persist in the environment due to their low solubility in water and their sequestration by soil and sediments. The exploitation of microbes for cleaning contaminated sites is still one of the big challenges to environmental microbiologists. Although several PAH degrading bacterial species have been isolated, it is not expected that a single isolate would exhibit the ability to degrade completely all PAHs. Bacterial consortia are of special concern since syntrophic interactions are an extremely interesting example of "fitness support", especially in the biodegradation of aromatic compounds where the biochemical steps are shared among community members in order to achieve its complete mineralization.

In the present work the effects of the bioaugmentation with an undefined (natural) and a defined consortium were compared. The natural PAH-degrading consortium (PHE-CON) was previously isolated from a chronically contaminated soil and characterized in terms of structure, diversity and functionality. In liquid phenanthrene-saturated mineral medium (PhMM) the PHE-CON showed the capacity of degrading the 58 % of the supplied phenanthrene, after 7 days of incubation. The composition of the PHE-CON was studied by 16S rDNA clone libraries; and some of the genera found were *Ochrobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Inquilinus* sp., *Achromobacter* sp. and *Sphingomonadaceae* family. There have also been isolated five strains from the PHE-CON, identified as *Sphingobium* sp. (AM), *Enterobacter* sp. (B and B1) and *Pseudomonas* sp. (T and Bc), but only the AM

isolate showed phenanthrene degradation. To study the cooperative metabolic activities of the isolated strains, a defined consortium was formed with isolates AM plus Bc. This defined consortium showed the ability to degrade the 97% of phenanthrene after 7 days of incubation in PhMM, these values was significantly higher than the ones reached by PHE-CON and the AM strain at the same time of incubation.

The bioaugmentation studies were performed in soil microcosms artificially contaminated with 2000 mg of phenanthrene/Kg of dry soil and prepared in triplicate. The microcosms were inoculated with 1.4×10^8 of total cfu/g of dry soil, and incubated at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and 21% humidity for 63 days. One non-inoculated was used as control. At different time during incubation period, the concentration of residual phenanthrene (HPLC), the numbers of cultivable heterotrophic and PAH degrading bacteria, the soil biological activity (dehydrogenase activity) and the genetic diversity of the bacterial soil community (PCR-DGGE and clone libraries) were analyzed .

Both microcosms inoculated with the PHE-CON and the defined consortia (AM+Bc) showed higher values of PAH degrading bacteria and dehydrogenase activity than the control microcosm; in concordance a significant increase in the phenanthrene elimination rate was observed. Both inoculations provoked strong changes on the dynamics and the diversity of the bacterial soil community. In the DNA clone library, it was evidenced that in the PHE-CON microcosms the predominant clones were affiliated with Sphingomonadaceae family as happened in the clone libraries of PHE-CON. Also there were found some of the genera present in the PHE-CON as *Inquilinus* sp., *Alcaligenes* sp. and *Achromobacter* sp. By the other hand, in the microcosm inoculated with the defined consortium, the predominant clones were affiliated with *Sphingobium* sp. (coincident with the strain AM) but the strain Bc was not found neither in the DGGE nor in the cloning assays.

This study proved that defined and undefined consortia are able to compete and settle into the microbial soil community, enhancing the phenanthrene elimination. Since the utilization of defined consortia presents several advantages as operational management in field bioremediation processes, this type of consortia could have a great potential in bioaugmentation procedures.

Planificación y dirección de los trabajos experimentales, redacción del manuscrito y presebtación del trabajo en formato poster.

5. Peluffo M., Villalba Villalba N, Mora V.C., Rosso J.A. y Morelli I.S. "Influence of abiotic parameters on the efficiency of chemical oxidation of PAH-contaminated soil and its impact on physicochemical and biological soil properties". 12th International UFZ-Deltares Conference on Groundwater-Soil-Systems and Water Resource Management (AquaConSoil 2013). 16-19 de Abril de 2013, Barcelona, España. Expositor: Morelli I.S. Trabajo completo publicado en el libro de Proceedings del Congreso.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous compounds of particular concern because of their widespread occurrence in the environment and their carcinogenic potential. Bioremediation is a low-cost and low-disturbance solution for the cleaning of contaminated sites. However, a general problem of bioremediation of PAH-contaminated soil is the slow degradation rate. On the other hand, in situ chemical oxidation has been increasingly regarded as a relevant technology for remediation of soils contaminated by recalcitrant organic contaminants, including PAH. However, the efficiency of chemical oxidation is dependent of PAH properties and soil characteristics and its potential effect on soil physical, chemical and biological properties is relevant. To address the limitations of individual remediation

techniques and to achieve better PAH removal efficiencies, the combination of chemical and biological treatments can be used.

In a previous work we evaluated the feasibility of using a surface application of an oxidative treatment with Persulfate (PS) in soil microcosms contaminated with phenanthrene, looking on soil physicochemical and biological parameters. In these microcosms, residual concentration of PS declined after 7 days of treatment, and at this time the PS concentration of 21.0 g/kgDRY SOIL achieved a 30% of phenanthrene elimination but with an important impact on soil pH, soil electrical conductivity, heterotrophic bacteria counts and bacterial community composition, inhibiting the biodegradation process. The addition of a PS concentration of 8.61 g/kgDRY SOIL reached only a 20% of phenanthrene elimination during the first 7 days of treatment, without negatives effects on the studied physicochemical and biological soil properties.

The aim of this study was optimized the abiotic parameters (salt and applications way, and soil moisture) to enhanced the oxidation process and its impact on soil physicochemical and biological properties. Six different treatments were tested in soil microcosms freshly contaminated with phenanthrene (100 mg/kgDRY SOIL). In two treatments the microcosms were maintained to a 44.5% of soil water-holding capacity (SWHC) and sodium PS was added, in once application, at 8.60 and 43.01 g/kgDRY SOIL, (NaPS1 and NaPS2, respectively). In treatments NaPS3 and NaPS4 the same application of sodium PS was performed, but the microcosms were keeping to a 65% of SWHC. The last two treatments (with 44.5% of SWHC) were prepared with ammonium PS, added in a single addition of 41.7 g/kgDRY SOIL (NH4PS1) and in successive additions of 5 g/kgDRY SOIL reaching a concentration of 20 g/kgDRY SOIL (NH4PS2) at 7 days. Control microcosm contaminated with phenanthrene but without oxidant addition was prepared for each experimental condition. All microcosms were carried out in triplicate trays and incubated in controlled conditions to support a simultaneous biological process (temperature and oxygen availability). Analyses of phenanthrene and PS concentration, soil characteristics (pH, conductivity) and microbial density were performed.

After 7 days of treatment the microcosms NaPS1 and NaPS2 showed 20 and 30% of phenanthrene elimination, respectively, while NaPS3 and NaPS4 were less efficient (only 1 and 10%, respectively), indicating that the increment in percentage of SWHC did not improve the oxidation process. Treatments NaPS2 and NH4PS1 reached the same percentage of degradation (30%), showing that the cation (Na⁺ or NH₄⁺) did not have any influence on the process. The phenanthrene elimination in the microcosm NH4PS2 (successive additions) was coincident with the found in the NaPS2 and NH4PS1 microcosms, although a lower amount of PS was added, and with a lower impact on soil physicochemical and biological properties. This behavior suggests that addition of PS in small doses would be more efficient, improving the oxidation process with a lower impact on soil microbial community.

Planificación y dirección de los trabajos experimentales, colaboración en la redacción del manuscrito y presebtación del trabajo en formato poster.

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.

Revistas con referato

6. Madueño L., Álvarez H.M and Morelli I.S. "Autochthonous Bioaugmentation to Enhance Phenanthrene Degradation in Soil Microcosms under Arid Conditions". International Journal of Environmental Science and Technology. En Prensa. DOI 10.1007/s13762-014-0637-5. 2014.

Abstract

The aim of this work was to investigate the effect of autochthonous bioaugmentation (ABA) in phenanthrene-contaminated Patagonian soil microcosms, maintained under arid conditions, on phenanthrene elimination and soil microbial community. The polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading strain *Sphingobium* sp. 22B previously isolated from the Patagonian soil and selected by its resistance to drying conditions was used as inoculant. The phenanthrene concentration, dehydrogenase activity and denaturing gradient electrophoresis of 16S rRNA gene were monitored during 230 days. The results showed that when the microcosms were maintained at 20 % of soil water-holding capacity (WHC), the phenanthrene biodegradation was drastically inhibited and changes in the genetic diversity of soil microbial community were not detected, and neither the ABA nor the biostimulation managed to overcome the inhibitory effects. When the moisture was slightly increased, reached 25 % WHC, the ABA showed a significant initial stimulatory effect on phenanthrene biodegradation, demonstrating the potential of ABA in PAH bioremediation process in semiarid Patagonia.

Planificación y dirección de los trabajos experimentales y redacción del manuscrito.

7. Pessacq J., Medina R., Terada C., Bianchini F.E, 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". Water, Air & Soil Pollution. Aceptado. 2014.

Abstract

Soils exposed to long-term contamination with hydrocarbons may present extreme challenges to maintain the biological resilience to the stress. To elucidate the relationships between the initial event of contamination and the responsiveness to the stress, we investigated the extent of the microbial resilience of biological functions from two contaminated soils sampled from a petrochemical area (S1, underwent diffuse hydrocarbon contamination, and S2, from a land farming unit where an alkaline petrochemical sludge was treated) after the Cd, saline, and acid stresses. Both contaminated soils were characterized by low organic matter content compared with a pristine soil. Although similar Shannon diversity index and heterotrophic bacterial count were observed, different bacterial community structures (PCR-DGGE) and less enzymatic activities characterized the contaminated soils. Particularly, functional diversity determined by Biolog EcoPlates™ was not detected in S2 soil. Only the S1 soil showed resilience of the enzymatic activities and functional diversity, suggesting the presence of a well-adapted microbial community able to face with the stresses. The S2 was the most disturbed and less responsive soil. However, an increase in the functional diversity

was evidenced after acidification, and it is possible to correlate this responsiveness with the sludge properties treated in the land farming unit. In addition, if the selected stress can reverse the soil condition provoked for the first disturbance, responsiveness could be expected.

Participación en la planificación y dirección de los trabajos experimentales relacionados con el estudio a través de métodos moleculares de comunidades microbianas de suelo.

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.

Festa S., Coppotelli B.M and Morelli I.S. "Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: impact on the microbial community and biodegradation". Enviado a Applied Soil Ecology. 2014.

Abstract

The efficiency of two inoculation strategies, using a consortium (CON) or an isolated strain (AM), on phenanthrene-contaminated soil was determined with special concern on the study of the bacterial community composition by PCR-DGGE and pyrosequencing of 16S rRNA gene fragments.

Both strategies stimulated the phenanthrene degradation, increasing the cultivable heterotrophic bacteria number and biological activity. At the end of the treatments, the microcosms inoculated with AM reached the lowest values of phenanthrene but also the lowest dehydrogenase activity.

In DGGE patterns a reduction in number of bands in the contaminated and inoculated microcosms was observed, being the most significant differences attributed to inoculation with AM.

The pyrosequencing technique yielded results that correlated with the fingerprint, showing that the bacterial community composition based on relative abundance was significantly modified by treatments.

Sphingomonadales and Burkholderiales were highly stimulated by phenanthrene contamination and inoculation. In the Phe microcosm, also an increase in Actinomycetales (mainly Arthrobacter) was observed.

Effectively, the use of the strain AM as inoculant became the best strategy to remediate the soil mainly on the basis of the degradation efficiency, however it caused more drastic changes in microbial community than inoculation with CON, what can be compromising the ulterior functionality of the soil.

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

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

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. Estudio del metaproteoma y las capacidades metabólicas de un consorcio degradador de fenantreno inoculado con una cepa competitiva. Macchi M., Morelli I.S., Coppotelli B.M. XIII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina. Septiembre de 2013. Expositor: Macchi M. Resumen publicado en CD.

2. Estudio metabólico y molecular de cultivos bacterianos degradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos y resistentes a metales pesados. Cecotti M., Morelli I.S., Coppotelli B.M., Monras J.P., Pérez-Donoso J.M. XIII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental.

Buenos Aires, Argentina. Septiembre de 2013. Expositor: Cecotti M. Resumen publicado en CD.

3. Inoculación con consorcios bacterianos naturales, definidos y cepas aisladas: efecto sobre la degradación de fenantreno y sobre la comunidad microbiana del suelo. Coppotelli B.M., Festa S., Morelli I.S. XIII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina. Septiembre de 2013. Expositor: Coppotelli B.M. Resumen publicado en CD.

4. Remediation of phenanthrene-contaminated soil by persulfate and permanganate. Villalba Villalba N, Peluffo M., Martín M.V., Mora V.C., Morelli I.S y Rosso J.A. The 19th International Conference on Advanced Oxidation Technologies for Treatment of Water, Air and Soil. San Diego, California, USA. Noviembre de 2013. Expositor: Rosso J.A. Resumen publicado en libro de resúmenes p.114.

5. Remediación química de suelo contaminado con fenantreno y pireno. Peluffo M., Mora V.C., Morelli I.S y Rosso J.A. 3er Taller Argentino de Ciencias Ambientales (III TACA-2014). Córdoba, Argentina. Mayo de 2014. Resumen publicado en libro de resúmenes p.25

6. Estudio de megaplásmidos en Sphingomonas degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Starevich V.A., Madueño L., Salto I.S., Pistorio M y Morelli I.S. X Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE. Mar del Plata, Argentina. Julio de 2014. Expositor: Starevich V.A. Resumen publicado en libro de resúmenes MS-005.

7. Estudio mediante pirosecuenciación de un consorcio bacteriano degradador de PAH y de los cambios producidos en su composición por la inoculación de una cepa bacteriana competente. Festa S., Macchi M., Morelli I.S. y Coppotelli B.M. X Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE. Mar del Plata, Argentina. Julio de 2014. Expositor: Festa S. Resumen publicado en libro de resúmenes MS-014.

8. Efecto del surfactante no-ionico triton x-100 sobre la biodegradación de PAH y la comunidad microbiana de un suelo crónicamente contaminado. Cecotti M., Mora V.C., Viera M. y Morelli I.S. X Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE. Mar del Plata, Argentina. Julio de 2014. Expositor: Cecotti M. Resumen publicado en libro de resúmenes BB-004.

9. Biorremediación de suelos contaminados con PAH: efecto de diferentes estrategias de bioaumento sobre la diversidad y estructura de la comunidad microbiana. Festa S., Coppotelli B.M. y Morelli I.S. XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología - ALAM 2014 y IV Congreso Colombiano de Microbiología - 4CCM 2014. Cartagena de Indias, Colombia. Noviembre de 2014. Expositor: Morelli I. Resumen publicado en Hechos Microbiológicos 5: pag. 36.

10. Estudio de la diversidad genética y las capacidades metabólicas de un consorcio degradador de fenantreno inoculado con una cepa competitiva. Macchi M., Festa S., Morelli I.S., Coppotelli B. XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología - ALAM 2014 y IV Congreso Colombiano de Microbiología - 4CCM 2014. Cartagena de Indias, Colombia. Noviembre de 2014. Expositor: Coppotelli B. Resumen publicado en Hechos Microbiológicos 5: pag. 173.

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TÉCNICAS. *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.*

Directora del Proyecto BIORREMEDIACION IN SITU EN LOS SEDIMENTOS DEPOSITADOS EN EL CANAL ESTE DE REFINERIA LA PLATA. Convenio firmado entre el CINDEFI (CONICET) e Y-TEC.

El objetivo del presente proyecto es evaluar las capacidades biodegradativas de la comunidad microbológica de los sedimentos depositados en los canales que rodean a la YPF Destilería La Plata, utilizando métodos moleculares de última generación; de modo de determinar la factibilidad de aplicación de las técnicas de Recuperación Natural Monitoreada para el saneamiento del curso de agua.

Este proyecto ha sido aprobado por el Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible (OPDS) a través de una Resolución.

Los resultados del proyecto son de carácter confidencial.

Durante el año 2014 se presentó un informe sobre Análisis de Antecedentes y Ensayos de Prueba.

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.

NUCCETELLI, DANIEL OSVALDO <daniel.nuccetelli@ypf.com>

ONETO, MARIA ELENA <maria.oneto@ypftecnologia.com>

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.*

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.*

Becarios Doctorales

1. 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.
2. 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.
3. Lic. Martina Cecotti. Beca de Postgrado Tipo I CONICET 2013-2016. Director: Irma Morelli. Tema: Efecto del agregado de surfactantes sobre la degradación de PAH y la diversidad de la comunidad microbiana de suelos crónicamente contaminados.
4. Lic. Marianela Macchi. Beca de Postgrado Tipo I CONICET 2013-2016. Director: Irma Morelli. Tema: Desarrollo de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH y estudio de su aplicación a la recuperación de suelos crónicamente contaminados.

Becarios Posdoctorales

1. Dra. Laura Madueño. Beca Interna Postdoctoral CONICET 2013-2015. Director: Dra. Irma Morelli. Codirector: Dr. Héctor Álvarez. Tema: Optimización de estrategias de bioaumentación con microorganismos autóctonos para la recuperación de suelos de la Patagonia semiárida crónicamente contaminados con hidrocarburos.
2. Dra. Rosana Polifroni. Beca Interna Postdoctoral CONICET 2013-2015. Director: Dra. Marina Nievas. Codirector: Irma Morelli. Caracterización de biofilms microbianos sobre soportes sólidos utilizados en la biorremediación de efluentes líquidos con hidrocarburos.

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.*

Dirección de Tesis Doctorales aprobadas

1. Dra. Laura Madueño. 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". Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. Director: Dra. Irma Morelli. Codirector: Dr. Héctor Álvarez. 25 de Marzo de 2013. Calificación: Sobresaliente (10).

Dirección de Tesis Doctorales en curso

1. 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.
2. Lic. Sabrina Festa (2011-continúa). Alumna 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.

3. Lic. Constanza Hozbor (2012-continúa). Alumna 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.
4. Lic. Martina Cecotti (2013- continúa). Alumna de la carrera del doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Director: Dra. Irma Morelli. Tema: Efecto del agregado de surfactantes sobre la degradación de PAH y la diversidad de la comunidad microbiana de suelos crónicamente contaminados.
5. Lic. Marianela Macchi. (2013-continúa). Alumno de la carrera del doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Directores: Dra. Irma Morelli y Dra. Bibiana Coppotelli. Tema: Desarrollo de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH y estudio de su aplicación a la recuperación de suelos crónicamente contaminados.

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 12th International UFZ-Deltares Conference on Groundwater-Soil-Systems and Water Resource Management (AquaConSoil 2013). 16-19 de Abril de 2013, Barcelona, España.

Presentación de los trabajos (Póster):

Bioaugmentation of phenanthrene-contaminated soil: Effects of the inoculation with defined and undefined PAH-degrading consortia on soil microbial community and biodegradation. Festa S., Macchi M., Coppotelli B.M y Morelli I.S. Expositor: Morelli I.S. Trabajo completo publicado en el libro de Proceedings del Congreso.

Influence of abiotic parameters on the efficiency of chemical oxidation of PAH-contaminated soil and its impact on physicochemical and biological soil properties. Peluffo M., Villalba Villalba N, Mora V.C., Rosso J.A. y Morelli I.S. Expositor: Morelli I.S. Trabajo completo publicado en el libro de Proceedings del Congreso.

2. Participación como conferencista en las “Jornadas de Agricultura Sustentable” organizadas por PRONUAR S.R.L. Buenos Aires, Agosto de 2013.

3. Participación como expositor en el stand “Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos” en las Jornadas Eco-Encuentro para el cuidado del planeta. Pabellón de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica. Predio Tecnópolis, Villa Martelli, Buenos Aires. 24 al 26 de Octubre de 2014

4. Participación como expositor en el XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología - ALAM 2014 y IV Congreso Colombiano de Microbiología - 4CCM 2014. Cartagena de Indias, Colombia. 5 al 8 de Noviembre de 2014.

Presentación del trabajo (Presentación oral):

Biorremediación de suelos contaminados con PAH: efecto de diferentes estrategias de bioaumento sobre la diversidad y estructura de la comunidad microbiana. Festa S., Coppotelli B.M. y Morelli I.S. Expositor: Morelli I. Resumen publicado en Hechos Microbiológicos 5: pag. 36.

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. 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 \$7000.
2. 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
3. Proyecto: Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos: una visión molecular. Financiado por la UNLP. Período: 2012-2015. Monto: \$40.00
4. Subsidio Institucional CIC-PBA, 2013. Monto: \$6.500.
5. Subsidio para viajes y estadía de la UNLP, para asistir al. XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología- ALAM 2014. 5 al 8 de noviembre de 2014. Cartagena de Indias, Colombia. Monto \$6.800.
6. Subsidio Institucional CIC-PBA, 2014. Monto: \$8.000.
7. Proyecto: Optimización de procesos de biorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos y evaluación del grado de restauración de la funcionalidad del suelo alcanzado. Proyectos de Investigación Orientados CONICET - YPF. Período: 2014-2016. Monto: \$650.000.
8. Proyecto: Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos: Una visión molecular. PICT 2013 Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica. Período: 2014-2017. Monto: \$480.350

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 periodo y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

Miembro del Consejo Directivo del CINDEFI. UNLP-CONICET. 2013 y 2014.
.Aproximadamente un 2% de mi cargo horaria.

Representante suplente del Departamento de Ciencias Biológicas en la Comisión de Grados Académicos de la Facultad. 2014.

Representante del Departamento de Ciencias Biológicas en la Comité Académico de la carrera del Doctorado de la Facultad. 2014.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. Septiembre de 2013 y 2014. Aproximadamente un 10% de mi carga horaria durante el mes de Septiembre.

Participación en el dictado del Curso CABBIO Aplicación de Técnicas Moleculares a Muestras Ambientales y Biorreactores. Curso teórico-práctico. Duración: 80hs. Universidad del Valle, Cali, Colombia. 16 al 27 de Septiembre de 2013. Aproximadamente 50% de mi carga horaria durante el mes de Septiembre de 2013.

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. Magalí S. Marcos, “Estudio de la capacidad de biodegradación de hidrocarburos en los sedimentos marinos de la costa Patagónica”. Dirigido por la Dra. Hebe M. Dionisi. Departamento Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. 25 de febrero de 2013.
- Jurado Titular del Trabajo de Tesis Doctoral del Lic. David Romanín, “Modulación de la respuesta Inmune Innata epitelial por microorganismos potencialmente probióticos aislados de kefir”. Dirigido por el Dr. Martín Rumbo y Codirigida por la Dra. Graciela Garrote. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 17 de Mayo de 2013.
- Jurado Titular del Trabajo de Tesis Doctoral de la Mg, Ángela León Pelaez, “Estudio de los mecanismos y de la actividad antifúngica y descontaminante de micotoxinas mediante bacterias lácticas aisladas de fermentaciones naturales”. Dirigido por la Dra. Graciela De Antoni y Codirigida por la Dra. Leda Giannuzzi. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 14 de Junio de 2013.
- Jurado Titular del Trabajo de Tesis Doctoral de la Bioq. María Sofía Urbietta, “Diversidad Microbiana en Ambientes Volcánicos”. Dirigido por el Dr. Edgardo Donati y Codirigida por la Dra. Elena Gonzez Toril. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 4 de Noviembre de 2013.
- Revisor de dos manuscritos para “International Biodeterioration & Biodegradation”
- Evaluador de un proyecto de la convocatoria a Proyectos de Investigación PIUNT 2013. Universidad Nacional de Tucumán. 2013.
- Evaluador de Proyectos (PICT 2013) para la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.
- Evaluador de proyectos de la convocatoria a Proyectos de Investigación y Desarrollo 2013. Universidad Tecnológica Nacional.
- Participación de la Comisión Evaluadora de Proyectos de Investigación del Area Biología (Ecología) presentados en la Convocatoria 2015 de la Universidad Nacional de la Patagonia Austral. 2014.
- Evaluador de Proyectos (PICT 2014) para la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

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

Objetivo General

Contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos relacionados con la ecología microbiana y la efectividad de estrategias de bioaumentación, aplicadas a la biorremediación de suelos contaminados con PAH; además de contribuir al desarrollo de herramientas metodológicas que permitan caracterizar la dinámica funcional de las comunidades microbianas durante los procesos de biorremediación y permita dilucidar la efectiva contribución de las cepas y/o consorcios inoculados. I Aplicar estrategias “ómicas” al estudio de la dinámica funcional de consorcios bacterianos degradadores durante la degradación de PAH en medio líquido

I Aplicar estrategias “ómicas” al estudio de la dinámica funcional de consorcios bacterianos degradadores durante la degradación de PAH en medio líquido

II Estudiar la dinámica estructural y funcional de consorcios bacterianos degradadores inoculado en sistemas de suelo estéril contaminado con PAH

El objetivo I ya ha sido parcialmente realizado. Para completar la caracterización funcional del consorcio se seguirán dos estrategias:

Se construirá una librería genómica de fragmentos de entre 35–45 kb obtenidos a partir del DNA total utilizando el Kit pWEB-TNC™ Cosmid Cloning (Epicentre®). Los clones obtenidos serán replicados en microplacas conteniendo LB suplementado con 20% de glicerol y conservados a -80°C. Sobre estos clones se realizará una selección preliminar utilizando la metodología descrita por Wrenn y Venosa (1996), para determinación de bacterias degradadoras de PAH. Con el fin de identificar los genes presentes en los clones positivos se secuenciarán utilizando la plataforma Illumina (Illumina, Rosario).

Se estudiará la expresión diferencial de proteínas totales durante la degradación de fenantreno: se realizará la separación por 2D de los extractos de proteínas antes obtenidos. Los perfiles proteicos encontrados a los distintos tiempos serán comparados entre ellos utilizando para la comparación el programa Proteomweaver Versión 4.0. (Bio-Rad). De la comparación de los proteomas se seleccionarán los spots que se encuentren significativamente sobre expresados en alguna condición, los cuáles serán cortados (Ehlers and Cloete, 1999), digeridos y analizados (MALDI-TOF-TOF). Los espectros de masa serán contrastados, utilizando MASCOT (Matrix Science, Boston, MA) algoritmo y NCBI nr. Alternativamente también se determinará el proteoma del consorcio (considerado como una unidad funcional) creciendo en una fuente de carbono fácilmente asimilable, para identificar proteínas que estén exclusivamente expresada en presencia de fenantreno.

II Estudiar la dinámica estructural y funcional de consorcios bacterianos degradadores inoculado en sistemas de suelo estéril contaminado con PAH.

Con el fin de poner a punto las metodologías para el estudio de la dinámica funcional de una comunidad microbiana, en una matriz tan compleja como es el suelo, se prepararán sistemas de suelos estéril (esterilizados en autoclave, 121°C 1 hora durante 3 días consecutivos) contaminados con fenantreno. Estos sistemas serán inoculados y serán mantenidos en condiciones adecuadas para el proceso de biorremediación, bajo temperatura y humedad controlada. Sobre estos microcosmos periódicamente se monitoreará:

i) La actividad deshidrogenasa total del suelo (como medida de las capacidades oxidativas del sistema), la concentración de los PAH remanente (HPLC-UV) y la aparición de productos de degradación de los PAH (GC-MS y HPLC-MS).

ii) 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 dioxigenasa. En

este último caso los primers serán seleccionados o diseñado de acuerdo a los resultados encontrados en los estudios de metagenómica funcional.

iii) De una fase activa de degradación, se tomaran muestras a las cuáles se les realizarán distintos protocolos para la obtención de proteínas: i) lisis indirecta (previa separación de los microorganismos del suelo; ii) lisis directa (sobre la muestra): lisis secuencial con buffers citratos y SDS, seguida de extracción de proteínas con fenol y posterior purificación y el método de lisis con un simple tratamiento con los dos buffers desarrollado recientemente por Wang y col. (2011). 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.

Se compararán los geles 2D obtenidos en estos sistemas con los obtenidos a partir de un sistema control (suelos estéril contaminado sin inocular) y del consorcio creciendo en MML con fenantreno.

Alternativamente también se estudiará en estos sistemas la expresión de enzimas dioxigenasa a través de la separación de proteínas en geles nativos.

Bibliografía

- 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.
- Kanerva S., Smolander A., Kitunen V., Ketola R.A., Kotiaho T. (2013) Comparison of extractants and applicability of MALDI-TOF-MS in the analysis of soil proteinaceous material from different types of soil, *Organic Geochemistry*, 56: 1-9.
- Keiblinger K.M, Wilhartitz I.C, Schneider T., Roschitzki B., Schmid E., Eberl L., Riedel K., Zechmeister-Boltenstern S. (2012) Soil metaproteomics .Comparative evaluation of protein extraction protocols. *Soil Biology and Biochemistry* 54:14-24.
- Liang Y., Gardner D.R., Millar C.D., Chen D., Anderson A.J., Weimer B.C. and Sims R.C. (2006). Study of biochemical pathways and enzymes involved in pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KMS. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7821-7828.
- 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.
- 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.

OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CRÓNICAMENTE CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS Y EVALUACIÓN DEL GRADO DE RESTAURACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL SUELO ALCANZADO.

Objetivo general

El suelo es un recurso natural no renovable sobre el cual aplicamos más y más presiones y demandas, provocando la alteración de sus capacidades, limitando de este modo la realización de los servicios ambientales esenciales. La contaminación del suelo con hidrocarburos es un problema relevante a escala nacional; que si bien tiene su principal foco en las zonas industriales, no son menores los casos de contaminación en áreas urbanas y rurales, a través de las variadas actividades en que se ve involucrada la utilización de estos compuestos.

La biorremediación tiene hoy en día gran aceptación como tratamiento para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, 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.

El presente proyecto representa un abordaje integral que pretende aportar conocimientos básicos que permitan el desarrollo de estrategias de biorremediación efectivas, así como también definir parámetros que permitan evaluar el grado de restauración de la funcionalidad y estabilidad de los suelos sometidos a las distintas estrategias de biorremediación.

Objetivos específicos:

I. Aplicar distintas estrategias de biorremediación a suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos: bioestimulación, bioaumento, procesos de oxidación química acoplados a biorremediación, compostaje, agregado de surfactante. Evaluar el efecto sobre la eliminación del contaminante.

II. Establecer relaciones entre la efectividad de los distintos tratamientos, las características fisico-químicas de los suelos contaminados y la dinámica estructural y funcional de la comunidad microbiana de los mismos.

III. Determinar la estabilidad (resistencia y resiliencia) de los suelos tratados, ante disturbios naturales (acidez, salinidad, inundación/sequía, temperatura). De ser posible, construir una escala de riesgo basado en la estabilidad de los suelos, como herramienta indicativa del grado de restauración de los mismos.

I El objetivo I ya ha sido realizado

II. Optimización de los procesos de biorremediación de suelos crónicamente contaminados.

A partir del análisis de los resultados obtenidos en y las condiciones climáticas del sitio contaminado a tratar, se determinará en cada caso cuáles serán las variables independientes (humedad, temperatura, aplicación de surfactante, agregado de nutrientes inorgánicos, aplicación de enmienda orgánica, inoculación y aplicación de un oxidante químico) que serán estudiadas en forma conjunta en cada suelo. Para el diseño del experimento se utilizará un análisis de Metodología de Respuesta de Superficie (RSM) bajo un Diseño Central Compuesto (CCD), esta metodología es un estrategia conveniente para buscar las condiciones óptimas de eficacia en sistemas multivariable y ha sido ampliamente utilizada para optimizar procesos biológicos. Cada

variable independiente será estudiada a tres niveles. De acuerdo con el diseño CCD el número total de experimentos combinados será $2k + 2k + n_0$, donde k es el número de variables independientes y n_0 es el número de repeticiones en el punto central. La variable dependiente a determinar será el porcentaje de eliminación de hidrocarburos (CG-FID) luego de 30 días de incubación.

Además de obtener el diseño de un proceso de biorremediación eficiente para una situación determinada, se realizará una observación integral de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores y se plantearán las posibles correlaciones entre características físico, químicas y biológicas del suelo, tipo e historia de la contaminación, la dinámica de la comunidad microbiana del suelo y el proceso de biorremediación que haya resultado óptimo. Para el análisis integral de las variables determinadas se aplicará el paquete estadístico Primer 6: análisis de componentes principales (PCA) para resumir los patrones en la composición de parámetros biológicos y variables ambientales; permutación basada en pruebas de hipótesis (ANOSIM), un análogo de ANOVA univariante que pone a prueba las diferencias entre los grupos de muestras; identificación de los parámetros que proporcionan la discriminación entre dos grupos de muestras observadas (SIMPER); vinculación de los patrones bióticos multivariados al conjunto de variables ambientales u otras matrices bióticas (Best y LINKTREE); estimación de Índices de diversidad, uniformidad y riqueza).

III. Determinar la estabilidad (resistencia y resiliencia) de los suelos tratados, ante disturbios naturales (acidez, salinidad, inundación/sequía, temperatura). De ser posible, construir una escala de riesgo basado en la estabilidad de los suelos, como herramienta indicativa del grado de restauración de los mismos.

Determinar la resistencia y resiliencia de los suelos sometidos a procesos de biorremediación, ante disturbios que pueden considerarse naturales (acidez, salinidad, inundación/sequía, temperatura).

Se trabajará sobre muestras de suelos ya remediados y caracterizados físico-química y biológicamente, las que se llevarán al 60% de su capacidad de retención de agua y se dejarán reposar 3 horas antes de ser sometidos a la perturbación.

Sobre estas muestras se aplicarán cada uno de los siguientes disturbios ambientales.

- Acidez

Se ajustará el pH a un valor de 1 y 3 unidades por debajo del pH inicial de cada suelo, con HCl diluido (1mM). Para determinar la cantidad de ácido necesaria para obtener dichos valores de pH, se realizarán las curvas buffer del suelo.

- Salinidad

Se incrementará la conductividad eléctrica (CE) del suelo a valores 1 y 2 unidades por encima del valor inicial determinado para cada suelo. Para obtener estos valores de CE se agregarán volúmenes crecientes de una solución de NaCl 0.9 M, previamente determinados mediante una curva construida con ese propósito.

- Temperatura

Se someterá la muestra a un calentamiento de 40°C, durante 18 horas, en un recipiente cerrado para no modificar el contenido de agua.

- Deseccación

Se someterá a la muestra a ciclos de inundación/desecado. Cada ciclo consistirá en el pasaje de aire seco a 20/25°C por 24 hs, seguido de una rehidratación rápida hasta alcanzar el 60% de la capacidad máxima de retención de agua y luego un período de incubación de 48 hs en oscuridad a 25°C. Este régimen permite a los microorganismos la recolonización del suelo luego de cada proceso de secado. Las muestras se someterán a 1 y 2 ciclos de inundación/desecado .

Se prepararán microcosmos de 400 g de tierra seca, en recipientes de vidrio con tapa no hermética. Se aplicará un único disturbio en cada microcosmo, siempre trabajando con triplicados. A través del análisis de datos obtenidos de la caracterización de las muestras se seleccionaran aquellas variables relacionadas con la funcionalidad del suelo: actividad enzimática de deshidrogenasas, proteasas y lipasas, y respiración (producción de CO₂) para estimar la resistencia y resiliencia de los suelos remediados.

Luego de aplicada la perturbación, los microcosmos se incubarán a 25°C conservando la humedad constante y serán monitoreados periódicamente en función de las siguientes variables:

- Capacidad funcional de la comunidad microbiana: medida de actividades enzimáticas a: 1, 7, 14, 21 y 28 días.
- Medida de la respiración inducida por determinados sustratos (SIR): 7, 21 y 28 días.
- Determinación de poblaciones microbianas por métodos de cultivo: 1, 7, 14, 21 y 28 días.
- Estructura genética (PCR-DGGE) y estructura mediante perfil lipídico: 1, 7, 14, 21, 28 días.
- Diversidad microbiana (Pirosecuenciación): en el tiempo correspondiente al valor más bajo determinado en la capacidad funcional (Resistencia) y al finalizar el experimento (Resiliencia).
- Análisis de Matrices de excitación – emisión de fluorescencia del extracto acuoso: a en el tiempo correspondiente al valor mas bajo alcanzado en el SIR (Resistencia) y al finalizar el experimento (Resiliencia).
- Medida de pH, conductividad eléctrica (CE) y potencial redox: 2, 4, 7, 14, 21 y 28 días.

Estos estudios permitirán estimar la calidad de los suelos remediados, y a través de la aplicación de análisis multivariante, aspiramos detectar indicadores biológicos del grado de restauración biológica alcanzado por el tratamiento de remediación aplicado.

Bibliografía

- Bogardt, A.H., and Hemmingsen, B.B. 1992. Enumeration of Phenanthrene-Degrading Bacteria by an Overlayer Technique and Its Use in Evaluation of Petroleum-Contaminated Sites. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2579-2582.
- David Gara Pedro M., Janina A. Rosso, Marcela V. Martin, Gabriela N. Bosio, Mónica C. Gonzalez, and Daniel Mártire. 2011. Characterization of humic substances and their role in photochemical processes of environmental Interest. *Trends in Photochemistry & Photobiology*, 13: 51-70.
- Del Panno MT, Morelli I, Engelen B and Luise Berthe-Corti L. (2005). Effect of Petrochemical Sludge Concentrations on Microbial Communities During a Soil Bioremediation Process. *FEMS Microbiology Ecology*. 53: 305-316.
- Griffiths B. S., P. D. Hallett, H. L. Kuan, A. S. Gregory, C. W. Watts, A. P. Whitmore. 2008. Functional resilience of soil microbial communities depends on both soil structure and microbial community composition . *Biol Fertil Soils*, 44: 745–754.
- Huesemann, M.H., Hausmann, T.S., Fortman, T.J., 2004. Does bioavailability limit biodegradation? A comparison of hydrocarbon biodegradation and desorption rates in aged soils. *Biodegradation* 15: 261-274.
- Liu Z., DeSantis T.Z., Anderson G.L. and Kinght R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.* 36:120.

- Mohana S., Shrivastava S., Divecha J. and Madamwar D. 2008. Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. *Bioresour. Technol.* 99:562-569.
- Morelli, I. S.; Del Panno, M. T.; De Antoni, G. L.; Panceira, M. T. Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad* 2005, 55, 271–278.
- Reasoner, D. J., Geldreich E. E. 1985. A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. En: "Applied Environmental Microbiology", num. 1, vol. 49, pp: 1–7.
- Saisubramanian, N., Krithika, L., Dileena, K.P., Sivasubramanian, S., Puvanakrishnan, R., 2004. Lipase assay in soils by copper soap colorimetry. *Anal. Biochem.* 330, 70-73.
- Schnürer, J., Rosswall, T., 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology* 6, 1256–1261
- Sinsabaugh, R.L., Reynolds, H., Long, T.M., 2000. Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2095–2097.
- Sparling, G.P., Speir, T.W., Whale, K.N., 1986. Changes in microbial biomass C, ATP content, soil phosphomonoesterase and phospho-diesterase activity following air-drying of soils. *Soil Biol. Biochem.* 18, 363–370
- Speir, T.W., Ross, D.J., 2002. Hydrolytic enzyme activities to assess soil degradation and recovery. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 407–431.
- Zornoza Raul, Loretta Landi, Paolo Nannipieri, Giancarlo Renella. A protocol for the assay of arylesterase activity in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 41 (2009) 659–662.

BIORREMEDIACION IN SITU EN LOS SEDIMENTOS DEPOSITADOS EN EL CANAL ESTE DE REFINERIA LA PLATA. Convenio firmado entre el CINDEFI (CONICET) e Y-TEC.

El objetivo del presente proyecto es evaluar las capacidades biodegradativas de la comunidad microbiana de los sedimentos depositados en los canales que rodean a la YPF Destilería La Plata, utilizando métodos moleculares de última generación; de modo de determinar la factibilidad de aplicación de las técnicas de Recuperación Natural Monitoreada para el saneamiento del curso de agua.

Durante el mes de Junio de 2015 se comenzará con los primeros muestreos y análisis.
Proyecto Confidencial

La región bonaerense es asentamiento de numerosos e importantes polos petroleros y petroquímicos, esto ha generado diversos problemas ambientales, muchos de ellos de difícil solución. La presente propuesta está diseñada para constituirse en un aporte al desarrollo de opciones científicas y tecnológicas que permitan, a través de la integración de los conocimientos, impulsar soluciones tendientes a la recuperación de la calidad ambiental.

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 (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.