

# Optimización de medios de cultivo para crecimiento de *Nocardia corallina* sobre hidrocarburos

Aráoz B.\* , Cerrutti P.\*\* , Cortón E.\* , Huergo M.\*\* , Viale A.\*

La base de las tecnologías de eliminación de contaminantes reside en que un amplio rango de los mismos puede ser degradado por microorganismos naturales dotados de las capacidades metabólicas adecuadas. La concentración de estos microorganismos se incrementa considerablemente en áreas contaminadas.

Existen diversos métodos, tanto biológicos como no biológicos, para la recuperación de zonas contaminadas. Cada uno presenta ventajas y desventajas, y, en ocasiones, lo más rápido y rentable es una combinación de sistemas. Para detoxificar compuestos tóxicos puede emplearse la capacidad de microorganismos para transformarlos o mineralizarlos. Se han desarrollado numerosos procedimientos para aumentar el contacto entre los microorganismos y los contaminantes, con el fin de maximizar el rendimiento del proceso y minimizar los posibles riesgos.

Entre los microorganismos aislados en zonas contaminadas, con posibles aplicacio-

nes biotecnológicas, pueden mencionarse diversas especies de actinomicetes aisladas en terrenos crónicamente contaminados con petróleo en la meseta santacruceña. Muchos de ellos crecen activamente con hidrocarburos como única fuente de carbono. Algunas cepas toleran hasta un 10% de contenido de solventes orgánicos. Entre las aisladas en la meseta santacruceña deben mencionarse una cepa de *Nocardia globerula* que es capaz de degradar un hidrocarburo altamente ramificado como el pristano [1], y otra de *Rhodococcus opacus* que degrada fenilalcanos mediante una oxidación monoterminal seguida de una  $\beta$ -oxidación de la cadena lateral hasta obtener ácido fenilacético [2]. Otro ejemplo de las posibilidades de estos microorganismos lo brinda el hecho de que cepas psicotróficas pueden degradar hidrocarburos alifáticos [22].

Las técnicas de Ingeniería combinadas con procesos de Biotecnología pueden proveer tecnologías eficientes para solucionar variados problemas de contaminación ambiental. En este sentido es importante considerar el uso de biorreactores. En el tratamiento de residuos peligrosos, urbanos o industriales, los biorreactores se emplean principalmente para reducir la concentración de los contaminantes presentes en las aguas

residuales afluentes, hasta conseguir niveles aceptables. El tratamiento biológico es la elección más versátil y rentable cuando la concentración de contaminantes en las aguas residuales es relativamente baja y los volúmenes a tratar son grandes, circunstancias que hacen poco atractivas otras alternativas de tratamiento, como por ejemplo, la incineración. Pero lo que hace más atractivas las posibilidades de los biorreactores es el disponer de cepas microbianas capaces de tolerar y degradar altas concentraciones de contaminantes.

Para estudiar la posible mejora de los medios de cultivo empleados en el crecimiento de microorganismos que degradan contaminantes, son útiles las técnicas de Diseño Experimental, en las que se especifica una combinación de valores a ensayar de las variables seleccionadas, para luego analizar en forma matemática los datos experimentales obtenidos [8, 18]. Estas técnicas permitieron optimizar el crecimiento del hongo ligninolítico *Trametes trogii* para la eliminación de colorantes textiles [20].

Los objetivos propuestos en la investigación fueron: 1) determinar mediante un diseño experimental central compuesto (DCC) la composición óptima de un medio de cultivo mineral para obtener biomasa de una cepa

\* Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

\*\* Laboratorio de Microbiología Industrial, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería. Universidad de Buenos Aires.  
E-mail: alberto\_viale@yahoo.com.ar



de *Nocardia corallina* usando hidrocarburos alifáticos como única fuente de carbono; 2) relacionar la velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> con la biomasa obtenida en medios con diferentes relaciones de factores, a fin de establecer la posibilidad de medir biomasa de microorganismos filamentosos en medios con sustratos opacos o coloreados

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Todas las drogas y reactivos usadas fueron de grado analítico. Se utilizó hexadecano Merck.

### Microorganismo y condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de *Nocardia corallina* aislada en zonas contaminadas crónicamente con petróleo en la meseta de Santa Cruz, gentilmente cedida por el Dr. Héctor M. Alvarez, de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. La misma se cultivó en medio mineral de Schlegel (Schlegel *et al.* 1961) utilizando hexadecano como fuente de carbono. Los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyer con tapón esmerilado de 250 ml, con 25 ml de medio de cultivo. Estos se iniciaban con inóculos de 2% y crecían a 30°C durante 15 horas, tiempo en el que entraban en fase estacionaria. La biomasa se estimó midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV - 160 A.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Para optimizar el rendimiento celular se utilizó un diseño central compuesto (DCC) de Box-Wilson [4] para cinco factores (fosfatos, amonio, magnesio, calcio y hierro). La concentración del resto de los componentes del medio se mantuvo constante a lo largo de toda la investigación. Los experimentos realizados con diferentes combinaciones de las cinco variables indepen-

dientes tenían  $n_c = 15$ : ( $\pm 1, \pm 1, \pm 1, \pm 1, \pm 1$ ),  $n_a = (\pm \alpha, 0, 0)$ ,  $n_o = 2$  (0.0, 0.0) donde el valor de  $\alpha = n_c^{1/4} = 2$  hace al diseño rotatable. Los niveles de las variables  $X_i$  fueron codificados como  $x_i$  de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \text{ con } i = 1, 2, 3, \dots k$$

donde  $x_i$  es el valor sin dimensiones de una variable independiente,  $X_i$  el valor real de una variable independiente,  $X_0$  es el valor real en el *center point* (punto central), y  $\Delta X_i$  el cambio en cada paso. En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de cada factor a los diferentes niveles usados.

TABLA 1. Concentraciones de los factores usados en el DCC

Nivel	Factor				
	Fosfatos (mM)	Cloruro de amonio (g l <sup>-1</sup> )	Sulfato de magnesio (g l <sup>-1</sup> )	Cloruro de calcio (g l <sup>-1</sup> )	Citrato férrico (g l <sup>-1</sup> )
-2.000	20.000	0.250	0.010	0.005	0.0005
-1.000	40.000	1.188	0.133	0.029	0.0016
0	60.000	2.125	0.255	0.053	0.0028
1.000	80.000	3.063	0.378	0.076	0.0039
2.000	100.000	4.000	0.500	0.100	0.0050

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para analizar el diseño experimental, intentando ajustar la variable respuesta a un modelo cuadrático, con el objeto de correlacionarla con las variables independientes. La forma general de una ecuación polinómica de segundo orden es  $Y_i = \beta_0 + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$  (donde  $Y_i$  es la respuesta predicha,  $x_i x_j$  son las variables de entrada que influyen la variable respuesta  $Y$ ;  $\beta_0$  es un término constante;  $\beta_i$  es el  $i$ -coeficiente lineal;  $\beta_{ii}$  es el  $i$ -coeficiente cuadrático y  $\beta_{ij}$  es el  $ij$ -coeficiente de interacción).

Como variable respuesta se utilizó la raíz cuadrada de los valores de absorbancia (sqrt(Abs)) obtenidos en 15 horas de incubación. Los valores de la absorbancia del

cultivo son función del número de células tomadas en cada muestra para realizar la medición, que corresponden a una distribución de Poisson en vez de una distribución normal [3, 15]. Los experimentos se realizaron por triplicado. Análisis estadísticos: se utilizó el software Minitab v. 13 para realizar regresiones múltiples y ANOVA.

### Determinación de la producción de CO<sub>2</sub>

La medición continua del desprendimiento de dióxido de carbono por *Nocardia corallina* creciendo en el medio original o sus modificaciones se logró mediante el

uso de un electrodo potenciométrico ión-específico (CO<sub>2</sub>). El diseño, la construcción y el procedimiento de calibración fueron descritos previamente [5, 9].

Con el diseño mostrado en la Figura 1 ha sido posible medir la evolución del desprendimiento de CO<sub>2</sub> durante la degradación aeróbica de una variedad de contaminantes, tales como hidrocarburos o mezclas de bifenilos policlorados [6]. La actividad microbiana libera CO<sub>2</sub> al medio de cultivo y se establece un equilibrio químico entre las diferentes especies químicas y el gas disuelto en la atmósfera del frasco [10]. Los resultados fueron analizados por regresión no lineal con ayuda del software InfoStat v. 1.0.



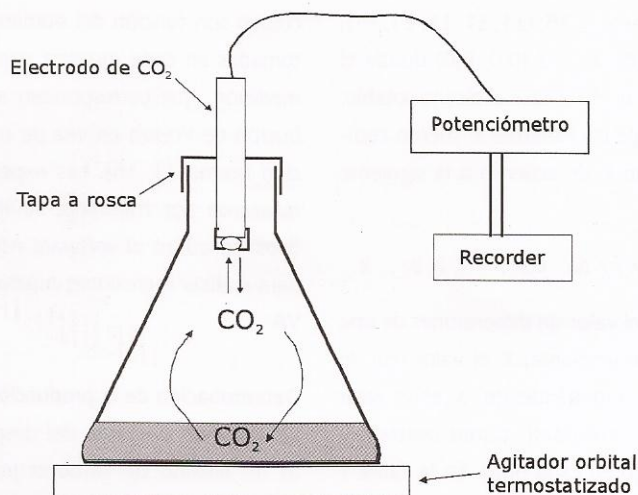


Figura 1. Detalle del dispositivo experimental usado para medir la velocidad de producción de dióxido de carbono durante el catabolismo aeróbico de compuestos xenobióticos usados como fuentes de carbono

**RESULTADOS**

**Análisis del diseño experimental**

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos mediante el DCC para la variable respuesta sqrt(Abs). Los mismos fueron analizados mediante regresión múltiple. Los resultados encajan con la siguiente ecuación polinómica de segundo orden

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

(donde Y<sub>i</sub> es la respuesta predicha, x<sub>i</sub> son las variables de entrada que influyen la variable respuesta Y; β<sub>0</sub> es un término constante; β<sub>i</sub> es el i-coeficiente lineal; β<sub>ii</sub> es el i-coeficiente cuadrático y β<sub>ij</sub> es el ij-coeficiente de interacción).

En la Tabla 3 se muestra el ANOVA de la regresión cuadrática. Puede comprobarse que los términos lineales, cuadráticos y de interacción son estadísticamente significativos. El coeficiente de la determinación (R<sup>2</sup>) fue 0,973 y el lack-of-fit presenta un valor de p = 0.758, lo que demuestra el adecuado ajuste de los datos a la ecuación propuesta.

**TABLA 2. Diseño central compuesto para la optimización del medio de cultivo y respuestas medidas en 15 horas de incubación**

P	N	Mg	Ca	Fe	sqrt(Abs)
-1	-1	-1	-1	1	0.287
1	-1	-1	-1	-1	0.192
-1	1	-1	-1	-1	0.815
1	1	-1	-1	1	0.608
1	-1	1	-1	1	0.969
-1	1	1	-1	1	0.050
1	1	1	-1	-1	0.822
-1	-1	-1	1	-1	0.072
1	-1	-1	1	1	1.400
-1	1	-1	1	1	0.534
1	1	-1	1	-1	1.264
-1	-1	1	1	1	0.614
1	-1	1	1	-1	0.357
-1	1	1	1	-1	0.371
1	1	1	1	1	0.897
-2	0	0	0	0	0.895
2	0	0	0	0	0.786
0	-2	0	0	0	0.962
0	2	0	0	0	0.430
0	0	-2	0	0	0.642
0	0	2	0	0	0.966
0	0	0	-2	0	1.321
0	0	0	2	0	1.034
0	0	0	0	-2	0.930
0	0	0	0	2	0.628
0	0	0	0	0	1.016
0	0	0	0	0	0.789

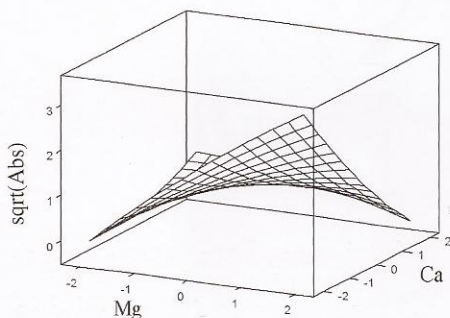
Las abreviaturas corresponde a P = Fosfato, N = Nitrógeno como amonio, Mg = Magnesio; Ca = Calcio; Fe = Hierro



La Tabla 4 muestra la estimación de los coeficientes y la significación estadística de cada uno de ellos. El análisis se realizó para las unidades codificadas. El valor del coeficiente para los niveles de fosfato es pequeño y no resulta estadísticamente significativo. Valores importantes presentan los coeficientes para las interacciones entre los cationes del medio, Mg-Ca, Mg-Fe, Ca-Fe.

En la Tabla 5 presentan los residuos obtenidos para los ajustes en cada una de las condiciones de cultivo. Ninguno de los residuos estandarizados tiene un valor mayor de 2 y muestran una distribución normal en el modelo. El test de Shapiro-Wilks presentó para estos residuos un  $R = 0.9912$  con  $p > 0.100$ .

La variable P muestra interacciones significativas con los cationes debido a la formación de complejos. A altas concentraciones de fosfato el acomplejamiento afecta la variable respuesta en forma importante. Las interacciones entre los cationes son estadísticamente significativas. La Figura 2 muestra el efecto de la interacción entre magnesio y calcio a bajos niveles de fosfato para no exaltar los efectos producidos por el acomplejamiento de ellos.



Niveles de los otros factores: P: -1.0 N: 0.0 Fe: 0.0

Figura 2. Interacción magnesio – calcio a bajos niveles de fosfatos

El uso del software Minitab permitió establecer los valores que predice el modelo cuadrático determinado, dentro de los ran-

TABLA 3. Análisis de la varianza para la respuesta sqrt(Abs)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SS)	Cuadrados Medios (MS)	F	p
Regresión	20	3.2747	0.1637	10.93	0.003
Lineal	5	0.3664	0.1183	7.90	0.013
Cuadrático	5	0.4992	0.0611	4.08	0.050
Interacción	10	2.4091	0.2409	16.09	0.001
Error residual	6	0.0899	0.0150		
Lack-of-fit	5	0.0641	0.0128	0.50	0.785
Error puro	1	0.0258	0.0258		
Total	26	3.3646			

$R^2 = 97.3\%$   $R^2_{(ajustado)} = 88.4\%$

TABLA 4. Coeficiente de regresión estimados para la respuesta sqrt(Abs)

Término	Coefficiente	EE coef.	p
Constante	0.9344	0.0817	0.000
P	0.0099	0.0290	0.744
N	-0.1209	0.0290	0.006
Mg	0.1192	0.0290	0.006
Ca	-0.0881	0.0290	0.023
Fe	-0.1018	0.0290	0.013
P*P	-0.0314	0.0271	0.291
N*N	-0.0676	0.0271	0.047
Mg*Mg	-0.0406	0.0271	0.185
Ca*Ca	0.0529	0.0271	0.099
Fe*Fe	-0.0467	0.0271	0.135
P*N	0.1990	0.0377	0.002
P*Mg	-0.1908	0.0377	0.002
P*Ca	0.2622	0.0377	0.000
P*Fe	0.2700	0.0377	0.000
N*Mg	-0.2736	0.0377	0.000
N*Ca	0.1927	0.0377	0.002
N*Fe	-0.0328	0.0377	0.418
Mg*Ca	-0.2672	0.0377	0.000
Mg*Fe	-0.1757	0.0377	0.003
Ca*Fe	0.2877	0.0377	0.000

gos experimentales. De esta forma se estableció que el medio óptimo para la producción de biomasa, considerando 1.3 como el valor de la variable respuesta sqrt(Abs) es, en valores codificados: P = -1.51, N =

-2.00, Mg = 2.00, Ca = 0.91, Fe = 1.08, lo que corresponde a los siguientes valores de concentraciones: Fosfato 30 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.250  $\text{g l}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4$  0.500  $\text{g l}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$  0.074  $\text{g l}^{-1}$ , citrato férrico 0.040  $\text{g l}^{-1}$ .



### Validación del modelo y producción de CO<sub>2</sub>

La producción de CO<sub>2</sub> por *Nocardia corallina* creciendo con hexadecano como fuente de carbono en medio mineral con modificaciones se determinó con el dispositivo mostrado en la Figura 1 En la Figura 3 se muestra, a título de ejemplo, los resultados obtenidos en medio sin modificar, que corresponde en valores codificados a (00000).

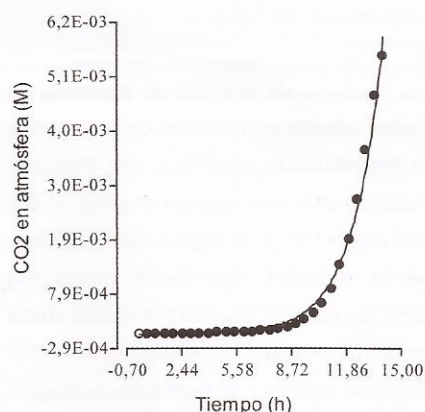


Figura 3. Producción de CO<sub>2</sub> por *Nocardia corallina* creciendo sobre hexadecano

Estos resultados se analizaron mediante regresión no lineal para una ecuación de crecimiento exponencial del tipo  $CO_2 = \alpha \cdot \exp(\beta \cdot T)$  donde  $\alpha$  es una constante que depende del inóculo inicial y  $\beta$  es la velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub>. En el caso mostrado se obtuvieron los valores  $\alpha = 1.8 \times 10^{-6}$  y  $\beta = 0.58 \text{ h}^{-1}$ . En todos los casos se obtuvieron regresiones con  $R^2 > 0.99$  en todos los casos.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para la variable respuesta sqrt(Abs) en 15 horas de incubación en diferentes modificaciones del medio mineral original.

Se observa un adecuado ajuste de los valores experimentales al modelo propuesto. En la Figura 4 puede verse la relación existente entre la velocidad específica de producción de dióxido de carbono y la

TABLA 5. Análisis de los residuos

Observación	sqrt(Abs)	Fit	Residuos	Residuos estandarizados
1	0.287	0.352	-0.065	-1.61
2	0.192	0.193	-0.001	-0.02
3	0.815	0.842	-0.026	-0.65
4	0.608	0.624	-0.015	-0.39
5	0.969	0.959	0.011	0.27
6	0.050	0.064	-0.014	-0.36
7	0.822	0.772	0.049	1.22
8	0.072	0.127	-0.055	-1.36
9	1.400	1.444	-0.044	-1.12
10	0.534	0.603	-0.069	-1.78
11	1.264	1.269	-0.005	-0.14
12	0.614	0.657	-0.043	-1.06
13	0.357	0.336	0.021	0.52
14	0.371	0.375	-0.005	-0.11
15	0.897	0.891	0.007	0.17
16	0.895	0.789	0.107	1.63
17	0.786	0.829	-0.043	-0.58
18	0.962	0.906	0.056	0.85
19	0.430	0.422	0.008	0.11
20	0.642	0.534	0.109	1.45
21	0.966	1.011	-0.045	-0.69
22	1.321	1.322	-0.001	-0.02
23	1.034	0.970	0.065	0.87
24	0.930	0.951	-0.021	-0.32
25	0.628	0.544	0.085	1.13
26	1.016	0.934	0.082	0.90
27	0.789	0.934	-0.145	-1.60

TABLA 6. Relaciones entre las velocidades específicas de producción de CO<sub>2</sub> y la biomasa obtenida en modificaciones del medio mineral original

Niveles de los factores	Velocidad específica de producción de CO <sub>2</sub> $\beta$ (h <sup>-1</sup> )	sqrt(Abs) en 15 hs de cultivo	sqrt(Abs) predicha por el modelo
00012	0,63	1,05	1,083
00000	0,58	0,925	0,934
-1-2211	0,65	1,15	1,18
2-2100	0,45	0,322	0,248



biomasa obtenida al cabo de 15 horas de incubación, medida como sqrt(Abs).

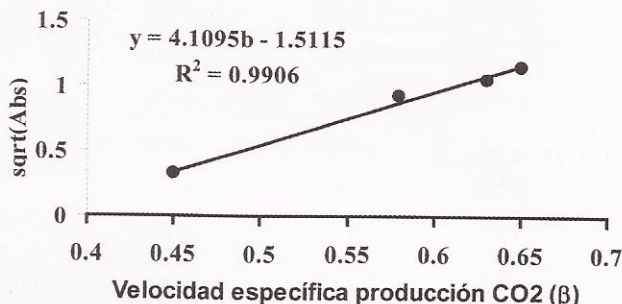


Figura 4. Relación entre la biomasa producida al cabo de 15 horas de incubación y la velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub>

**CONCLUSIONES**

Desde hace tiempo la literatura científica abunda en trabajos sobre la aplicación de técnicas estadísticas para optimizar las condiciones en diferentes procesos microbiológicos [7, 12, 16, 19, 20, 21]. En el presente trabajo se muestra como el auxilio de estas técnicas ha permitido evaluar la composición de un medio mineral para la obtención de biomasa del actinomicete *Nocardia corallina* utilizando un hidrocarburo alifático como fuente de carbono. La obtención de una mayor biomasa es un índice de que el hidrocarburo se ha consumido en mayor cantidad, y por tanto es un reflejo del resultado esperado en el proceso de eliminación del contaminante. El crecimiento puede describirse mediante una ecuación cuadrática en la que las interacciones entre cationes muestran una fuerte influencia sobre el resultado de la incubación. Las determinaciones de biomasa en medios modificados ajustan adecuadamente a los valores propuestos por el modelo, tal como se mostró en la Tabla 6.

Un punto importante a destacar es la interacción entre los cationes Mg<sup>+2</sup> y Ca<sup>+2</sup>. Muchos procesos microbiológicos, tales como asimilación de nitrógeno, esporulación, degradación de una variada gama de

contaminantes, tanto en microorganismos grampositivos como gramnegativos, están

regulados por sistemas de transducción de señales de dos componentes [11, 13, 17]. Estos componentes incluyen una histidín-quinasa sensora (HK), que al recibir una señal se autofosforila en un residuo histidina (HK~P), y un regulador de respuesta asociado, que se activa por HK~P fosforilándose (RR~P) enviando una señal al genoma. Existen además fosfatasa que inactivan a RR~P eliminando el resto fosfato. En el caso de *Nocardia corallina* se postula que la respuesta de este sistema se ve afectada por los cationes Mg<sup>+2</sup> y Ca<sup>+2</sup> por acción de sus efectos activadores sobre

fosforilasas y fosfatasa respectivamente, tal como se esquematiza en la Figura 5.

Altas concentraciones de Mg<sup>+2</sup> y Ca<sup>+2</sup> inhiben el crecimiento porque ambos cationes compiten con el sistema de transporte de Ca<sup>+2</sup> - ATPasa. El Mg<sup>+2</sup> activaría al sistema de autofosforilación de HK cuando esta proteína ha recibido la señal de la presencia de hidrocarburos, mientras que el Ca<sup>+2</sup> activaría a la fosfatasa que, al defosforilar a RR~P provocaría la desactivación de la transcripción de los genes catabólicos.

La medición de biomasa en presencia de hidrocarburos provenientes de los sistemas a decontaminar, constituye una dificultad habitual en la metodología analítica. El uso del dispositivo de la Figura 1 permitió medir la velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> cuando *Nocardia corallina* crecía sobre hexadecano y correlacionarla con la biomasa obtenida. La excelente correlación existente permitirá realizar mediciones de la biomasa generada con sustratos que impidan las lecturas de absorbancia, como sería un aceite mineral.

Teniendo en cuenta las características metabólicas de la cepa usada a lo largo del

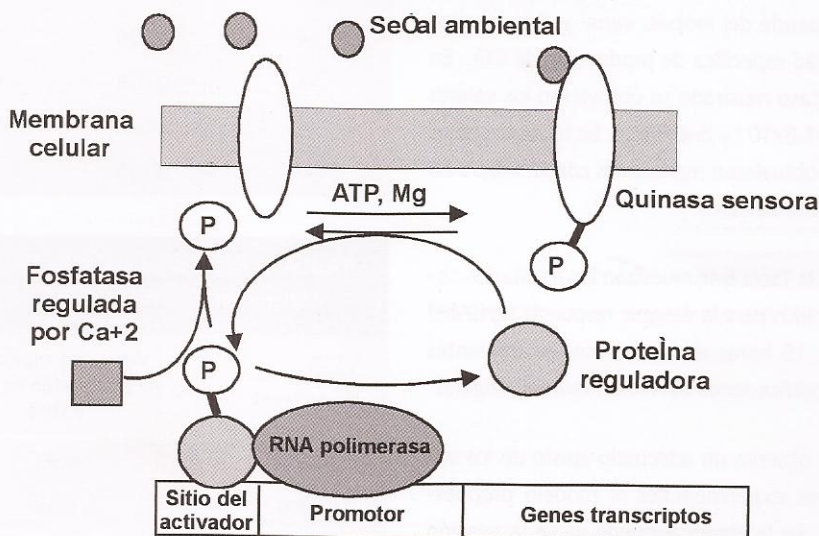


Figura 5. Propuesta de posibles efectos sobre la transcripción de genes para explicar la interacción entre los cationes magnesio y calcio



trabajo y los promisorios resultados obtenidos, se comenzará a estudiar su comportamiento en biorreactores utilizando aceite mineral como sustrato.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por su apoyo financiero..

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alvarez HM, Souto MF, Viale A, Pucci OH (2001) Biosynthesis of fatty acids and triacylglycerols by 2,6,10,14-tetramethyl pentadecane-grown cells of *Nocardia globerula*. *FEMS Microbiol. Lett.* 200: 195 – 200.
- [2] Alvarez HM, Luftman H, Silva RA, Cesari AC, Viale A, Waltermann M, Steinbüchel A (2002) Identification of phenyldecanoic acid as a constituent of triacylglycerols and wax ester produced by *Rhodococcus opacus* PD630. *Microbiology* 148: 1407 – 1412.
- [3] Box GEP, Hunter WG, Hunter JS (1999) Estadística para Investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Editorial Reverté S.A., México
- [4] Box GEP, Wilson KB (1951) On the experimental attainment of optimal conditions. *J. Roy. Stat. Soc. B* 13: 1 – 45.
- [5] Cortón E, Kocmur S, Haim L, Galagovsky LA (2000) Potentiometric determination of CO<sub>2</sub> concentration in the gas phase. Applications in different laboratory activities. *J. Chem. Educ.* 77: 1188 – 1190.
- [6] Englebienne P, López MG, Cortón E, Viale AA. (2002) Use of a CO<sub>2</sub> electrode to monitor fermentations that use xenobiotic compounds as source of carbon. *Rev. Arg. Microbiol.* 34: 72 – 76.
- [7] Gobetti M, Lanciotti R, De Angelis M, Corbo AR, Massini R, Fox P (1999) Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enz. Microb. Tech.* 25: 795 – 809.
- [8] Kennedy M, Krouse D (1999) Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J. Ind. Microb. Biotech.* 23: 456 – 475.
- [9] Kocmur S, Cortón E, Haim L, Locascio GA, Galagovsky LA (1999) CO<sub>2</sub> – Potentiometric determination and electrode construction, a hands-on approach. *J. Chem. Educ.* 76: 1253 – 1255.
- [10] Morse JW, Mackenzie FT (1990) Geochemistry of Sedimentary Carbonates. 1<sup>st</sup> Edition, Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- [11] Parkinson JS, Kofoed EC (1992) Communication models in bacterial signaling proteins. *Ann. Rev. Genet.* 26: 71 – 112.
- [12] Santi L, Cerrutti P, Pilosof AMR, Huergo M (2003) Optimización de las condiciones de electroporación y agregado de nisina en la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Arg. Microbiol.* 35: 198 – 204.
- [13] Saier MH Jr (1993) Introduction: Protein phosphorylation and signal transduction in bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51: 1 – 6.
- [14] Schlegel HG, Daltwasser H, Gottschalk G (1961) Ein Submersverfahren zur kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumphysiologische Untersuchungen. *Ark. Mikrobiol.* 38: 209 – 222.
- [15] Sokal EE, Rohlf FJ (1980) Introducción a la Bioestadística. Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
- [16] Steinberg IN (2001) Desarrollo de biomasa de bacterias degradadoras de hidrocarburos. Tesis de grado, Facultad de Ingeniería, UBA.
- [17] Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53: 450 – 490.
- [18] Strobe RJ, Sullivan GR (1999) Experimental design for improvement of fermentations. En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2<sup>nd</sup> Ed., ASM Press, Washington DC.
- [19] Taragno VM, Pilosof AMR (1999) Application of Doehlert designs for water activity, pH and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enz. Microb. Tech.* 25: 411 – 419.
- [20] Trupkin S, Levin L, Forchassin F, Viale A (2003) Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 682 – 690.
- [21] Watier D, Dubourguier HC, Leguerinel I, Hornez JP (1996) Response surface models to describe the effects of temperature, pH, and ethanol concentration on growth kinetics and fermentation end products of a *Pectinatus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1233 – 1237.
- [22] White LG, Hawari I, Zhou E, Bourbonnière L, Innis WE, Greer HW (1998) Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2578 – 2584.