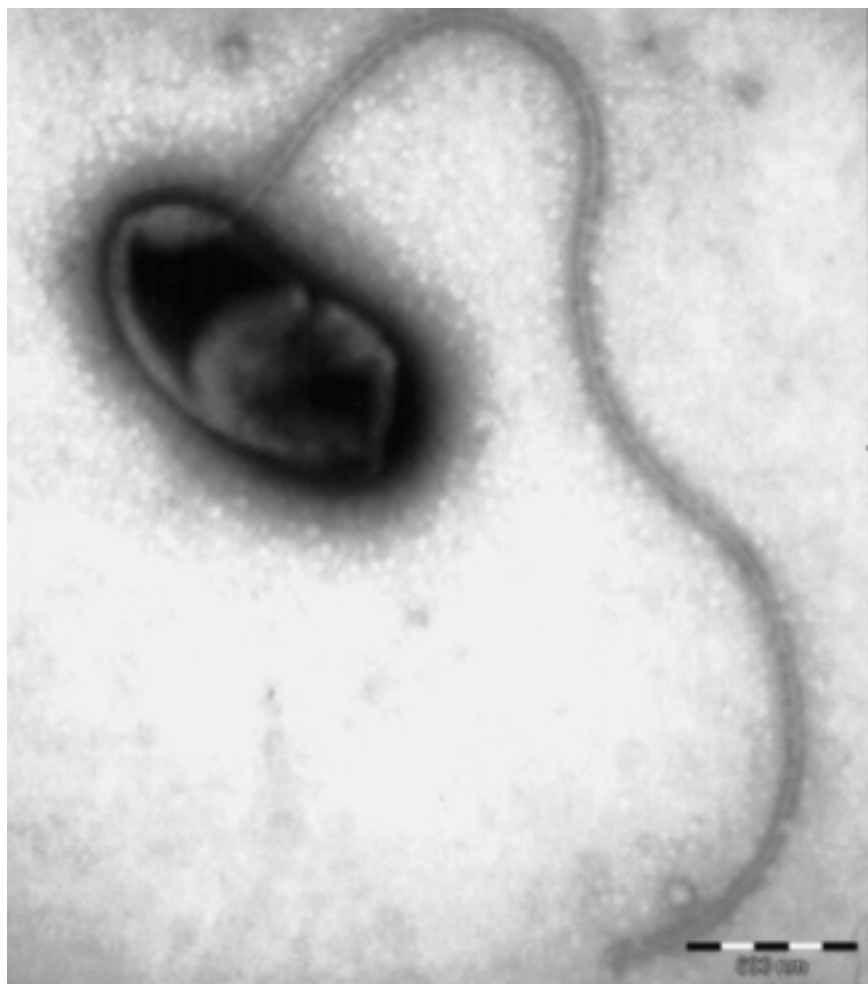


Obtención y purificación de extractos de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa de *Oligotropha carboxidovorans* (cepa OM 5) con actividad de oxidación de monóxido de carbono detectable electroquímicamente por medio de un microelectrodo de platino



RAÚL A. CUERVO¹
CLARA HURTADO²
DIANA M. GÓMEZ²
NEYLA BENÍTEZ³
WALTER TORRES²
FERNANDO E. LARMAT²
ENRIQUE BRAVO^{2*}

Resumen

Se obtuvieron extractos crudos y purificados de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa capaces de oxidar monóxido de carbono a CO₂, a partir de cultivos de la bacteria carboxidotrofa *Oligotropha carboxidovorans* (cepa OM5) cultivadas aeróbicamente en un medio mineral saturado con CO. Los extractos crudos se obtuvieron mediante la ruptura de las células por sonicación y se purificaron por cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico. La actividad enzimática de los extractos se midió utilizando azul

¹ Universidad San Buenaventura.

² Universidad del Valle. ebravo@univalle.edu.co

³ Universidad del Cauca

Fecha de recepción: noviembre 1 de 2005, Fecha de aceptación: marzo 1 de 2006

de metileno como aceptor electrónico artificial en la oxidación del CO a CO₂. Se obtuvieron extractos crudos y purificados con actividad enzimática detectable por medio de espectrofotometría. El grado máximo de purificación obtenido fue de 200 veces y se lograron actividades enzimáticas específicas en el rango de 0.01 a 2.0 mU/mg de proteína. Ensayos electroquímicos usando un microelectrodo de platino y azul de metileno como mediador electrónico, mostraron un aumento de la corriente anódica cuando se adicionó el sustrato monóxido de carbono a la celda que contenía el extracto enzimático. Estos resultados permiten alentar la construcción de un biosensor electroquímico para la detección de monóxido de carbono, utilizando extractos enzimáticos obtenidos a partir de bacterias carboxidotrofas.

Palabras clave: Extractos enzimáticos, *Oligotropha carboxidovorans* cepa OM5, monóxido de carbono deshidrogenasa, ensayos electroquímicos, biosensor, detección de monóxido de carbono

Abstract

Extracts of the enzyme carbon monoxide dehydrogenase capable to oxidize carbon monoxide to CO₂ were obtained from the carboxidotrophic bacteria *Oligotropha carboxidovorans* OM5 cultivated under aerobic conditions in a mineral medium saturated with CO. The extracts were obtained disrupting cells by sonication and purification by molecular size-exclusion chromatography and ion-exchange chromatography. The enzymatic activity of the extracts was measured using methylene blue as

an artificial electronic acceptor in the oxidation of the CO to CO₂. Crude and purified extracts showed enzymatic activity detectable by spectrophotometry. The maximum grade of purification obtained was 200 times and specific enzymatic activities were achieved in the range from 0.01 to 2.0 mU/mg of protein. Electrochemical assays using a platinum microelectrode and methylene blue as an electronic mediator showed an increase of the anodic current when the substrate carbon monoxide was added to the cell that contained the enzymatic extract. These results encourage the construction of an electrochemical biosensor for the detection of carbon monoxide using enzymatic extracts obtained from carboxidotrophic bacteria.

Key words: enzymatic extracts, *Oligotropha carboxidovorans* OM5, carbon monoxide dehydrogenase, electrochemical assays, biosensor, detection of carbon monoxide

1. Introducción

El monóxido de carbono (CO) es un gas contaminante, venenoso, producido durante la combustión incompleta de materiales orgánicos (gas natural, petróleo, gasolina, carbón y materiales vegetales). El monóxido de carbono inhibe la capacidad de la sangre para transportar oxígeno, siendo responsable de síntomas respiratorios, pasando por el dolor de cabeza, náuseas e incluso la muerte (Devlin, 1993).

A nivel mundial hay una conciencia cada vez mayor entre las autoridades competentes de la ne-

cesidad de controlar los niveles de monóxido de carbono presentes en la atmósfera (en el orden de partes por millón y partes por billón). Es por esto que hay un gran interés por el desarrollo de biosensores, es decir, sensores basados en principios de reconocimiento molecular inherentes a muchas reacciones bioquímicas en la que participan enzimas y anticuerpos capaces de detectar concentraciones pequeñas del gas (Cunningham et al, 1998).

Un sensor electroquímico enzimático es un electrodo metálico cuya superficie contiene una enzima redox inmovilizada. Las enzimas pueden aislarse de sus fuentes (microorganismos, tejidos vegetales o animales) y purificarse. Se han realizado diversos intentos de construcción de biosensores enzimáticos para diversos analitos (D'Souza, 2001), incluyendo el uso de la bacteria *Pseudomonas thermocarboxydovorans* para el diseño de un sensor para monóxido de carbono empleando varios aceptores electrónicos artificiales (Turner et al, 1984).

La bacteria gram (-) *Oligotropha carboxidovorans* (cepa OM 5), pertenece al grupo de bacterias carboxidotrofas, que pueden usar el monóxido de carbono como única fuente de carbono y energía mediante la inducción del plásmido responsable de la expresión de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH), ligada a membrana, y que posee la capacidad de oxidar el CO en solución acuosa (Meyer & Schlegel, 1983).

En este trabajo se obtuvieron y purificaron extractos celulares, a partir de la bacteria *Oligotropha carboxidovorans* (cepa OM 5), capaces de oxidar CO a CO₂, con el objetivo de establecer las bases para la construcción de un biosensor amperométrico para la detección de monóxido de carbono.

2. Materiales y métodos

Cultivo de la bacteria

La bacteria *Oligotropha carboxidovorans* cepa OM 5 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC # 49405).

Para el crecimiento autotrófico de *O. carboxidovorans* se utilizó el medio mineral ATCC 1789, que contenía la siguiente composición (g/L de agua destilada): Na₂HPO₄·12 H₂O (9,0 g), KH₂PO₄ (1,5 g), NH₄Cl (1,5 g), MgSO₄·7 H₂O (0,2 g), CaCl₂·2H₂O (20 mg), citrato férrico de amonio (1,2 mg), elementos trazas (1 mL). El pH final fue de 6,8.

Elementos trazas (mg/L de agua destilada): ZnSO₄·7 H₂O (100 mg), MnCl₂·4 H₂O (30 mg), H₃BO₃ (300 mg), CoCl₂·6 H₂O (200 mg), CuCl₂·2 H₂O (10 mg), NiCl₂·6 H₂O (20 mg), Na₂MoO₄·2 H₂O (900 mg), Na₂SeO₃ (20 mg).

La bacteria fue crecida a partir del liofilizado original en 1 mL del medio de cultivo descrito anteriormente. A partir de esta muestra se realizó el enriquecimiento mediante crecimientos sucesivos hasta obtener 200 mL de cultivo. El recipiente con el medio de cultivo inoculado, se colocó en un desecador saturado con monóxido de carbono, con agitación constante a 30 °C, durante 96 horas, tiempo necesario para que las células alcanzaran la fase de crecimiento exponencial

Obtención y purificación de los extractos enzimáticos

La preparación de los extractos enzimáticos se realizó a partir de 200 mL del cultivo bacteriano al cual se le agregó lisozima (2 mL por cada 25 mL de suspensión bacteriana), preparada en 0.89 g de NaCl y 100 mL de agua destilada.

Las bacterias con lisozima se colocaron en un baño maría durante

12 horas a 40 °C. Un volumen final de 5 mL de la suspensión celular tratada con lisozima se sometió a sonicación en un equipo Branson Sonifier (VWR Company), con las siguientes condiciones: "Output control": 7, "Duty Cycle": 60, Tiempo: 10 minutos. La muestra se puso en hielo mientras se sometía a sonicación, con el objetivo de evitar su calentamiento. Los periodos de sonicación fueron de 2 minutos con un periodo de descanso de 30 segundos. Este procedimiento se repitió 5 veces con cada una de las muestras, completando un tiempo total de sonicación de 10 minutos por muestra.

Los extractos celulares se sometieron a los siguientes pasos de purificación:

Solubilización con el detergente Triton X-100: para separar la enzima de los restos de la membrana, a cada 600 µL de extracto celular, después de la sonicación, se añadieron 200 µL de Tritón X-100, se homogenizó la solución y el detergente se dejó actuar por una hora. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10⁴ rpm durante 45 minutos a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y el detergente remanente se retiró mediante diálisis.

Columna de Sephadex G-100: La muestra solubilizada se pasó por una columna de exclusión molecular (filtración por gel) preparada según el protocolo de Cooper & Scopes (1982). Un gramo de Sephadex G-100, fue disuelto en 10 mL de alcohol etílico al 10 % y posteriormente colocado en una pipeta, obteniendo una columna de 1.3 x 10 cm de alto. La columna de Sephadex se lavó 4 veces con buffer fosfato de sodio 0.2 M, pH 7.0. Luego se tapó y se dejó con el buffer durante 3 días antes de usarla.

Se tomaron 300 µL de las muestras, eluidas separadamente en 18 mL del buffer fosfato de sodio 0.2

M, pH 7 y se colocaron en sendas columnas armadas a 4 °C y a presión atmosférica. Posteriormente se recolectaron las fracciones en tubos de 1.5 mL y se les realizaron las pruebas de actividad enzimática y concentración proteica. Solo las fracciones que poseían actividad enzimática y tenían mayor concentración de proteína se sometieron al siguiente paso de purificación con Ecteolla-celulosa.

Columna de Ecteolla-Celulosa: se preparó un gradiente de diferentes concentraciones de Ecteolla (30-80 % p/v), una capa sobre la otra. La columna se equilibró con buffer fosfato 50 mM, pH 7. La elución se realizó con un gradiente lineal de KCl (0 a 1 M). Un mL del extracto obtenido del paso anterior con Sephadex se colocó en la parte superior de la columna y se recolectaron fracciones de 1.5 mL. A todas las fracciones colectadas se les realizaron las pruebas de actividad enzimática y concentración de proteínas.

Electroforesis en condiciones no desnaturizantes: El resultado del proceso de purificación se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, en condiciones no desnaturizantes, de los extractos crudos y después de los pasos de purificación, según el protocolo descrito por Ausubel et al (1989), con modificaciones propias del laboratorio.

Medición de la actividad enzimática y electroquímica de los extractos

El contenido proteico presente en los extractos crudos y purificados se cuantificó por el método espectrofotométrico de Schleif and Wensink (1981).

La actividad enzimática se estimó espectrofotométricamente mediante la reducción del azul de metileno en presencia de monóxido

de carbono, a 30 °C y 664 nm, utilizando un equipo Shimadzu UV 160A. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la actividad catalítica necesaria para reducir un micromol de azul de metileno en un minuto.

El ensayo de actividad enzimática se realizó de la siguiente manera: la mezcla de la reacción contenía 0.91 mL de buffer KH_2PO_4 (50 mM, pH 7.0), 0.05 mL de glucosa 2 mM en buffer, 0.02 mL azul de metileno (0.25 mM), 0.01 mL de la mezcla de 1U de glucosa oxidasa y 1U de catalasa en buffer. La reacción se inició con 200 μL del extracto enzimático, con un contenido aproximado de 0.1 a 1.8 mg de proteína por mL.

La mezcla de reacción se colocó en una cubeta cerrada de 1 cm de diámetro para evitar el escape del gas y el contacto de los reactantes con el oxígeno del aire y posteriormente se burbujeó durante 10 minutos con monóxido de carbono. Los ensayos se realizaron en un tiempo total de 1800 segundos, suficiente para que la reacción se efectuara completamente.

Electroquímica

Para las mediciones electroquímicas se utilizó un Potenciostato/Galvanostato EG&G 273, con software incorporado, EG&G modelo 352/252 SoftCorrTMII y una celda cilíndrica de 5 mL de volumen con desprendimientos laterales para la inyección de los gases y con una tapa de teflón diseñada para montar los tres electrodos que conforman el sistema de trabajo. Como electrodo de trabajo se utilizó un microelectrodo de platino de 100 μm , como electrodo de referencia un electrodo de plata/cloruro de plata y una barra de acero sirvió como electrodo auxiliar. El microelectrodo de platino se pulió con una pasta de alúmina/agua (tamaño de partícula 0.3 μm) para remover las impurezas

de la superficie electródica antes de realizar los experimentos. Se utilizó la técnica de voltametría cíclica en las mediciones.

La caracterización de la electroquímica reversible del aceptor electrónico azul de metileno 0.25 – 5.0 mM (preparado en buffer 50 mM de KH_2PO_4 – NaOH) en pH ácido, básico y neutro se estableció mediante voltamogramas tomados a diferentes velocidades de barrido (5 – 500 mVs^{-1}) y entre el rango de -0.130V a -0.250 V vs Ag/AgCl. Para cada una de las mediciones electroquímicas la celda se burbujeó con nitrógeno (N_2) por 15 minutos para desoxigenarla. Los experimentos para el sistema completo (azul de metileno + extracto enzimático de CODH + CO) se realizaron en buffer a pH 7.0, condición apropiada para la CODH, y en medio aeróbico, anaeróbico y diferentes concentraciones de sustrato (CO). En solución acuosa se usaron diferentes concentraciones del mediador electrónico, del extracto enzimático y del sustrato, con el fin de determinar el efecto del sustrato y/o el extracto enzimático en la electroquímica del mediador.

3. Resultados y discusión

Extracción y purificación enzimática

Extractos enzimáticos

El extracto enzimático se obtuvo a partir de la sonicación de cultivos bacterianos en su fase de crecimiento logarítmica, la cual se alcanzó a los 3 o 4 días. Los extractos se evaluaron por medio de microscopía óptica para verificar el rompimiento celular de las muestras sometidas a sonicación. A pesar de que el grado de ruptura celular fue aproximadamente del 85%, determinado por medio de conteos antes y después de la sonicación, se observaron diferencias significativas

en las distintas muestras tratadas, determinándose que la eficiencia en el rompimiento de las células no era la misma en todos los casos. Posiblemente sea necesario reemplazar el método de ruptura celular por sonicación por uno utilizando una prensa francesa que garantice la ruptura uniforme de las células y por tanto una mayor efectividad en la obtención de los extractos crudos (Meyer & Schlegel, 1979).

Cuantificación de la concentración de proteínas de los extractos enzimáticos

La concentración de proteínas de los extractos varió dependiendo de la cantidad de células lisadas; aunque el procedimiento era el mismo en cada sonicación, el número de bacterias rotas, determinado por el conteo de células antes y después de la sonicación fue variable, lográndose concentraciones proteicas entre 1.21 mg/mL y 23.4 mg/mL

Actividad Enzimática

La actividad enzimática de los extractos se calculó a partir de las curvas espectrofotométricas de la reducción del azul de metileno con el tiempo. Un ejemplo de estas curvas se muestra en la Figura 1.

El valor del cambio de absorbancia por unidad de tiempo, se convirtió a unidades de actividad enzimática utilizando la ley de Beer-Lambert y un coeficiente de extinción molar, para el azul de metileno a 664 nm, de $74.02 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$. La purificación de las muestras procesadas se realizó completamente con las cuatro muestras que presentaron la mayor concentración de proteína y que mostraron buena actividad catalítica. Estas muestras se denominaron M1, M2, M3 y M4. La actividad enzimática específica de los extractos crudos estuvo en el rango de 10 a $36 \mu\text{U}/\text{mg}$ de proteína.

La disminución de la absorbancia del azul de metileno es una medida indirecta de la oxidación del monóxido de carbono. La absorbancia disminuye a medida que transcurre el tiempo de reacción y el color de la mezcla de reacción cambia desde un color azul (estado oxidado del azul de metileno) hasta incoloro (estado reducido del azul de metileno).

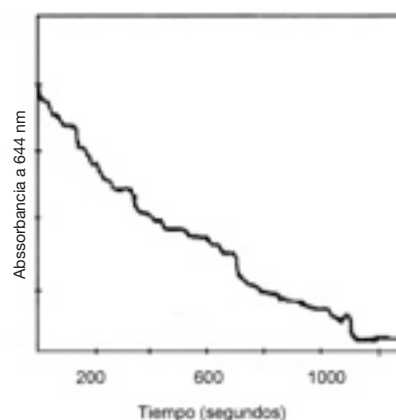


Figura 1. Curva espectrofotométrica de reducción del azul de metileno por extracto enzimático crudo.

Purificación del extracto enzimático crudo

Las muestras sonicadas y solubilizadas con detergente (extractos crudos) se pasaron por una columna de Sephadex G-100. Se emplearon 120 mL del buffer de elución, los cuales fueron recolectados en 12 fracciones de 1 mL cada una. Después de la fracción número 12 no se observó actividad enzimática, ni contenido de proteínas.

Las fracciones que mostraron actividad enzimática y contenido de proteínas se agruparon en una sola fracción y se tomaron $300 \mu\text{L}$ para colocarlos en la parte superior de sendas columnas de Ecteolla Celulosa. Al final de las cromatografías se obtuvieron en promedio 6 fracciones de 1 mL. La depuración de proteínas a través de los pasos de purificación se muestra en la Figura 2. Se observa cómo va dis-

minuyendo el número de bandas a medida que se desarrollan los pasos de purificación.

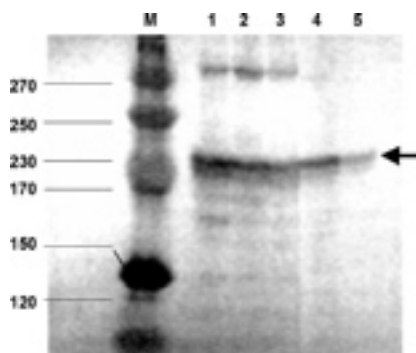


Figura 2: Electroforesis en gel de poliacrilamida, en condiciones no desnaturalizantes, de extractos enzimáticos en diferentes estados de purificación.

La actividad enzimática específica de las muestras purificadas se incrementó significativamente en comparación con la de los extractos crudos y osciló entre 0.2 y 2.0 mU/mg de proteína (ver Tabla 1). Los resultados muestran que utilizando sucesivamente las columnas de Sephadex G-100 y Ecteolla-celulosa, se lograron grados de purificación de 2 a 100 veces con Sephadex y de 6,7 a 200 veces con Ecteolla-celulosa. Para el caso específico de M2, se lograron grados de purificación de 3 veces con Sephadex y de 25 veces con Ecteolla-celulosa (Tabla 1 y Figura 3).

Las curvas espectrofotométricas de los extractos tratados después de Sephadex y de Ecteolla-celulosa se muestran para M2 en la figura 4. Se nota un incremento progresivo de la relación Δ de absorbancia/tiempo, como resultado del aumento de la actividad enzimática específica de los extractos por el proceso de purificación.

M: Marcador de peso molecular (kD), 1: Muestra de extracto crudo, 2 y 3: Muestras después de pasar por Sephadex, 4 y 5: Muestras después de pasar por Ecteolla-celulosa. La flecha señala la banda de 230 kiloDáltones, valor de la masa mo-

Tabla 1: Datos de las muestras M1, M2, M3 y M4 después de pasar por los diferentes pasos de purificación.

Paso purificación	Concentración proteica (mg/ml)	Actividad Específica (mU/mg proteína)	Grado de Purificación
M1			
Inicial después de sonicación	23.4	30	1
Después de Sephadex G-100	15.6	100	3.3
Después de Ecteolla-Celulosa	13	200	6.7
M2			
Inicial después de sonicación	5.15	36	1
Después de Sephadex G-100	2.73	100	2.8
Después de Ecteolla-Celulosa	1.3	1000	27.8
M3			
Inicial después de sonicación	2.01	10	1
Después de Sephadex G-100	1.51	20	2
Después de Ecteolla-Celulosa	1.4	1000	100
M4			
Inicial después de sonicación	1.21	10	1
Después de Sephadex G-100	1.1	1000	100
Después de Ecteolla-Celulosa	0.3	2000	200

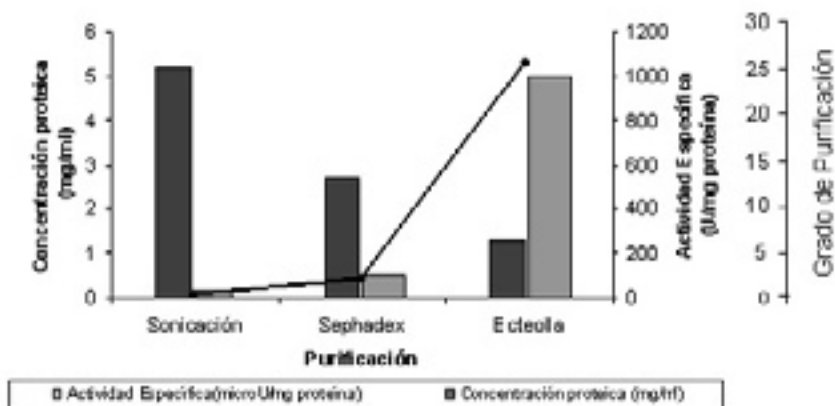


Figura 3: Comparación entre la concentración de proteínas y la actividad enzimática específica de la muestra M2 a través de los pasos de purificación.

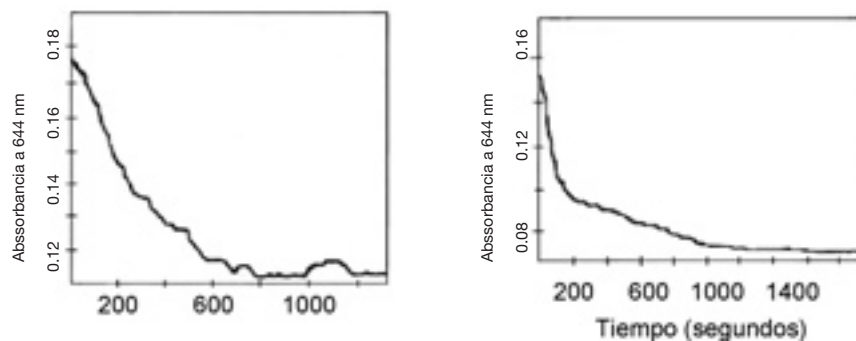


Figura 4: Curvas espectrofotométricas de reducción del azul de metileno por extracto enzimático de la muestra 2 (M2), después del paso por la columna de Sephadex (A) y por la columna de Ecteolla-celulosa (B).

lecular de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH).

El proceso de solubilización proteica por medio del Tritón X-100 influyó positivamente sobre la purificación del extracto enzimático. Por ejemplo, para M2 se obtuvo una actividad enzimática específica de 30 μ U/mg antes del tratamiento con Tritón X-100 y de 110 μ U/mg después del tratamiento con el detergente. El cambio en la secuencia de los pasos de purificación, pasando el extracto enzimático crudo primero por la columna de Ecteocelulosa y luego por la de Sephadex G-100, afectó negativamente la eficiencia del proceso de purificación. En la mayoría de los casos la actividad enzimática se volvía indetectable por el método espectrofotométrico utilizado en este trabajo.

La actividad de oxidación del monóxido de carbono del extracto crudo fue baja en comparación a las reportadas por Meyer & Schlegel (1979), pero estos autores partieron de 10 litros de cultivo frente a los 200 mL en este trabajo y usaron una metodología de purificación que involucraba más pasos: ruptura celular con prensa francesa, ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa, concentración del extracto con Sephadex G-25 y cromatografía de intercambio iónico, lo cual les permitió obtener una purificación de 35.5 veces con una actividad enzimática específica de 1.9 U/mg (Meyer y Schlegel, 1980). Sin embargo, en nuestro trabajo se logró un aumento importante en la actividad enzimática específica de los extractos después de los procedimientos de purificación cromatográfica teniendo en cuenta las condiciones específicas del laboratorio.

Estudios electroquímicos

Voltametría cíclica

Los experimentos de voltametría cíclica no mostraron indicios de electroactividad directa de la

enzima monóxido de carbono deshidrogenasa. El CO tiene un efecto en la aumento de la corriente anódica sobre la voltametría del azul de metileno, mientras que la corriente catódica permanece estable. La Figura 5 muestra la diferencia entre el voltamograma para el azul de metileno (a) y con la adición del sustrato CO al sistema en la presencia del mediador y CODH (b).

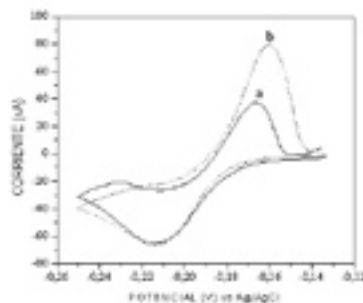
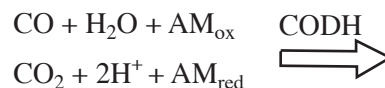


Figura 5. Voltamograma cíclico de: (a) azul de metileno (2.5 mM) en buffer fosfato 50 mM, pH 7, saturado con nitrógeno y con CO (—); (b) con la adición de 0.36 mL de extracto enzimático (---).

La adición del sustrato al medio de reacción en presencia del extracto enzimático y el mediador mostró un aumento en la corriente anódica, que comprueba el intercambio de electrones entre el CO y el azul de metileno, mediado por el extracto enzimático. La diferencia en el aumento de la corriente anódica entre las dos pruebas es pequeña, lo que indicaría que independientemente de la cantidad de extracto adicionado se necesita tener suficiente cantidad de enzima activa presente en el mismo para que se lleve a cabo de manera efectiva la catálisis enzimática que permita un notable aumento en la corriente anódica del mediador electrónico, una vez éste es reoxidado en la superficie electroquímica.

Las pruebas electroquímicas se fundamentan en la oxidación de CO por la enzima CODH. El sustrato reducido, el CO, dona un par de electrones a la enzima; éstos

seguidamente son aceptados por el sustrato oxidado azul de metileno (AM_{ox}), el cual es seguidamente reducido, como lo indica la siguiente ecuación:



El mediador electrónico (azul de metileno) es finalmente reoxidado sobre la superficie del electrodo de platino. La figura 6 muestra el esquema de las reacciones de transferencia electrónica.

El acoplamiento de la enzima CODH con el azul de metileno y la superficie electroquímica permite explorar el diseño de un biosensor para CO en el cual el mediador participe fácilmente en la reacción redox con el componente biológico, ayudando en la rápida transferencia electrónica y haciendo el sistema menos susceptible a sustancias interferentes debido a los potenciales más bajos de electrodo.

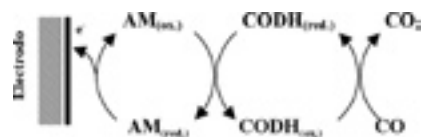


Figura 6. Oxidación electroquímica del monóxido de carbono con el uso de azul de metileno (AM) como un mediador electrónico. CODH (red.) y CODH (ox.): enzima monóxido de carbono deshidrogenasa reducida y oxidada, respectivamente.

4. Conclusiones

Con este trabajo se sentaron las bases experimentales para la construcción de un biosensor enzimático para monóxido de carbono, usando extractos crudos y purificados obtenidos a partir de cultivos de bacterias carboxidotrofas, como *Oligotropha carboxidovorans*.

Los extractos enzimáticos obtenidos dieron una señal amperométrica pequeña, pero suficiente para verificar el paso de electrones desde el monóxido de carbono a la

enzima y de ésta al mediador electrónico (azul de metileno), lo cual fue detectado por el microelectrodo de platino del sistema de trabajo.

Los aumentos notables de la actividad enzimática específica sugieren la efectividad del proceso de purificación de los extractos. Sin embargo, los resultados electroquímicos podrían mejorarse con la presencia de una mayor concentración de la enzima CODH activa. Esto podría lograrse con la utilización de mayores volúmenes iniciales de cultivo bacteriano y de un procedimiento de ruptura celular más eficiente, por ejemplo, por medio de una prensa francesa.

El trabajo futuro estará orientado a la realización de pruebas electroquímicas de los extractos crudos y purificados inmovilizados en la superficie del electrodo, al empleo de mediadores electrónicos más estables que el azul de metileno frente al oxígeno y al ensayo de extractos provenientes de bacterias carboxidotrofas nativas, algunas de las cuales han sido aisladas en otros trabajos de este grupo, a partir de aguas residuales de plantas de tratamiento en el Valle del Cauca.

El diseño y construcción de biosensores usando extractos enzimáticos obtenidos a partir de cultivos bacterianos abre una perspectiva interesante para el desarrollo de proyectos biotecnológicos en los campos de la Electroquímica y la Microbiología Ambiental. ⚙️

5. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del proyecto por parte de Colciencias y la Universidad del Valle, así como también la valiosa colaboración del CIAT.

Referencias

1. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1989. *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.
2. Calvo, J.E & Danilowicz, C. 1997. Amperometric Enzyme Electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.* **8(6)**: 563-574.
3. Cooper, T.; Scopes M. 1982. *The Tools of Biochemistry*. Wiley. New York.
4. Copeland, R. A. 1993. *Methods For Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocols*. Chapman & Hall, New York.
5. Cunningham, A. J. 1998. *Introduction to Bioanalytical Sensors*. Wiley and Sons. New York.
6. Devlin, T. M. 1993. *Bioquímica. Libro texto con aplicaciones clínicas*. Editorial Reverté. Barcelona. España.
7. D'Souza, S.F. 2001. Microbial biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **16**: 337-353
8. Meyer, O., Schlegel, H. G. 1979. Oxidation of carbon monoxide in cell extracts of *Pseudomonas carboxidovorans*. *J. Bacteriol.* **137**: 811-817.
9. Meyer, O., Schlegel, H. G. 1980. Carbon-monoxide: Methylene blue oxidoreductase from *Pseudomonas carboxidovorans*. *J. Bacteriol.* **141**: 74-80.
10. Meyer, O., Schlegel, H. G. 1983. Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 277-310.
11. Schleif, R. F and Wensick, P. C. 1981. *Practical Methods in Molecular Biology*. Springer Verlag, New York.
12. Turner, A.P.F., Aston, W.J., Higgins, I.J., Bell, J.M., Colby, J., Davis, G., Hill, H.A.O. 1984. Carbon monoxide: acceptor oxidoreductase from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2 and its use in a carbon monoxide sensor. *Anal. Chim. Acta.* **163**: 161-74.