



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS

“DETECCIÓN EN LÍNEA DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA
POTABLE”

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA
EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. EN B. ELIA VELÁZQUEZ MEJÍA

Matrícula 2141800868
velazquezkarina@hotmail.com

DIRECTORES

DR. NIKOLA BATINA SKELEDZIJALI
DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO

JURADO

DRA. FLORINA RAMÍREZ VIVES
PRESIDENTA
DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MAZUMURA
SECRETARIO
DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ PÉREZ
VOCAL
DRA. REFUGIO RODRÍGUEZ VÁZQUEZ
VOCAL

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO A 16 DE OCTUBRE, 2024



El H. jurado designado por la División Ciencias Biológicas y de la Salud,
de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, aprobó la tesis:

“Detección en línea de la calidad microbiológica del agua potable”

Que presentó la alumna

Elia Velázquez Mejía

Jurado

Dra. Florina Ramírez Vives

PRESIDENTA

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

SECRETARIO

Dra. Elizabeth Hernández Pérez

VOCAL

Dra. Refugio Rodríguez Vázquez

VOCAL



El presente trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Tratamiento de aguas Residuales y Microbiología Ambiental W-106 y en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular.

El trabajo fue financiado por medio de la beca No. 100414 del CONAHCYT.

El Doctorado de Biotecnología de la UAM, está incorporado en el programa Nacional de Posgrado de Calidad del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, con el número de referencia 001466.



AGRADECIMIENTOS

Gracias al comité tutorial por su asesoramiento, acompañamiento y revisión de este trabajo en cada una de las etapas de su desarrollo.

Dr. Monroy por haberme aceptado en su grupo de trabajo, laboratorio, proporcionado la infraestructura y recursos para la realización del proyecto, además de compartir conmigo sus conocimientos y experiencia.

Dra. Florina por su asesoría y observaciones en el trabajo de microbiología y facilitarme la infraestructura de su laboratorio.

Muy especialmente al Dr. Batina por su paciencia, por su tiempo, sus palabras de aliento, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia. Por sus enseñanzas en el área de nanotecnología y biosensores, por su compromiso con este proyecto y, sobre todo a, aplicar la resiliencia y a ver los obstáculos como una oportunidad de crecimiento, y aprender a trabajar con un equipo interdisciplinario y a respetar los diferentes enfoques de un mismo problema.

Dr. José Sepúlveda y Dra. Cristina Acosta por la ayuda con las micrografías SEM. Dr. Antonio Abad por el diseño de electrodos de oro.

Dr. Eugenio Gómez por sus aportaciones para mejorar el proyecto y poder escalarlo.

Dr. Fernando García, por sus comentarios, aportes a este trabajo y sus palabras de aliento.

M. en Biomédica Paulina Hernández Garcés por su apoyo en la electrónica del equipo y sus aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Michel Picquart por su apoyo para la obtención de los espectros Raman.

Dr. Israel Morales Reyes por asesoría en la construcción de la nanopelícula.

A mis amigos y compañeros de laboratorio de nanotecnología: Alejandro, Alma y Jorge, por las aportaciones a este trabajo y a las promesas, Nano: Dany, Miguel y Yahir con cariño. A Rosario por su amistad y hacer más divertido el camino.

A la coordinación del posgrado de biotecnología, en especial a la Lic. Violeta Luna por su apoyo.

Al jurado asignado para la revisión de este trabajo, por su tiempo y aportaciones.



DEDICATORIA

A mis padres Sofía Mejía C. y Agustín Velázquez F., por ser un ejemplo de temple, de amor al trabajo, de estar en continuo aprendizaje y de comprometerse con los sueños cualesquiera que sean, gracias, en cualquier plano que estén, los amo.

A mis hermanos Jorge y Lariza, con amor.

A Emiliano, mi motor para superarme en todos los aspectos y enseñarme que no importa lo difícil que parezca, “Polvo en el viento” se puede lograr un sueño, gracias; hijo con amor.

A Jazhel que apareció en mí vida por azar del destino con amor.

A Celia por todas las enseñanzas de vida y por creer en mí con cariño.

A David por no dejarme “colgar la bata” en los momentos tan críticos de mi vida.

A.V.F con amor infinito donde quiera que estés Insiste, persiste, resiste y presiona



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA	5
ÍDICE DE FIGURA.....	10
ÍNDICE DE TABLAS	13
NOMENCLATURA	14
GLOSARIO.....	15
RESUMEN.....	16
ABSTRACT	17
1.INTRODUCCIÓN.....	18
2.ANTECEDENTES	20
2.1 Calidad microbiológica del agua potable	20
2.2 Indicadores de la calidad microbiológica del agua	20
2.2.1 Coliformes totales	20
2.2.2 Coliformes fecales.....	21
2.3 Métodos de detección.....	22
2.3.1 Clásicos	22
2.3.1.1 La cuenta en caja de bacterias heterótrofas (HPC)	23
2.3.1.2 Tubo múltiple fermentado.....	23
2.3.1.3 Filtración en membrana.....	24
2.3.2 Rápidos.....	24
2.3.2.1 Enzimáticos.....	26
2.3.3 Moleculares e inmunológicos.....	28
2.3.3.1 Inmunológicos	28
2.3.3.2 Basado en ácidos nucleicos.....	30



2.3.4 Espectrometría Raman	33
2.3.5 Biosensores	34
2.3.5.1 Enzimáticos.....	35
2.3.5.2 Inmunosensores	35
2.3.5.3 Aptasensores	36
2.3.6 Aptámeros como elemento de reconocimiento (bioreceptor) aptasensor	38
2.3.7 Método SELEX para obtención de aptámeros.....	38
2.3.8 ¿Cómo se une el aptámero a su blanco o diana?	39
2.3.8.1 Aptámeros usados para construir aptasensores para <i>E. coli</i>	41
2.3.9 Nanopartículas combinadas con aptámeros para formar híbridos (DNA-NPs), como base para los aptasensores.....	43
2.3.9.1 Rol de los nanotubos de carbono en los aptasensores	43
2.3.9.2 Funcionalización de WNTC.....	46
2.3.9.3 Inmovilización de Aptámeros a los WNTC	46
a) No covalente	46
b) Unión covalente	47
2.3.10 Aptasensores con nanopartículas para detectar <i>E. coli</i> en muestras de agua	47
2.3.11 Transductores usados en los aptasensores para detectar <i>E. coli</i>	49
2.3.11.1 Transductor conductimétrico	50
2.3.12 Los aptasensores como método alternativo para determinar la calidad del agua potable	51
3.JUSTIFICACIÓN	55
4.HIPÓTESIS.....	55
5.OBJETIVO GENERAL	56
5.1 Objetivos Específicos.....	56
6. MATERIALES Y MÉTODOS	57
6.1 Desarrollo del aptasensor	58
6.1.1 Microorganismos.....	58



6.1.2 Reactivos analíticos.....	58
6.1.3 La funcionalización de WMCNT	58
6.1.4 Construcción NASEc.....	59
6.1.4.1 Limpieza	59
6.1.4.2 Inmovilización del AE10-a WCNT-COOH a la superficie de los electrodos.....	59
6.1.4.3 Conexión del aptasensor al conductímetro comercial.....	60
6.1.5 Conservación y cultivo de la cepa de <i>E. coli</i>	61
6.1.6 Preparación del inóculo y diluciones	61
6.1.7 Determinación de <i>E. coli</i> por la técnica de filtración en membrana	62
6.1.8 Determinación de la presencia de <i>E. coli</i> con NASEc	62
6.1.9 Caracterización Raman de las superficies del electrodo con y sin <i>E. coli</i>	63
6.1.10 Análisis SEM de los electrodos con <i>E. coli</i> y <i>S. marcescens</i>	63
6.1.11 Caracterización AFM.....	63
6.1.12 Análisis estadístico	63
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
7.1 Selección del material para los electrodos.....	64
7.2 Construcción de la nanopelícula con electrodos de carbono.....	65
7.3 Construcción del aptasensor con electrodos de carbono.....	65
7.4 Prototipo de aptasensor con electros de latón	69
7.4.1 Modificación.....	70
7.4.2 Detección de <i>E. coli</i> mediante el aptasensor con electrodo de latón.....	71
7.4.3 Análisis de la nanobiopelícula del aptasensor por AFM.....	73
7.4.4 Determinación de la cantidad máxima de AE10 que puede saturar los MWCNT-COOH	75
7.4.5 Análisis por espectrometría Raman de la biopelícula formada por los MWCNT-COOH-AE10.....	76
7.4.6 Determinar la viabilidad de la nanopelícula del aptasensor para detectar <i>E. coli</i>	78
7.4.7 Selectividad de la nanobiopelícula por <i>E. coli</i>	79



7.5 Prototipo con electros de oro	82
7.5.1 Principio del aptasensor	82
7.5.2 Calibración del aptasensor con KCl sin bacterias	84
7.5.3 Variación de la medición de la conductividad con el aptasensor con electrodos de oro sin <i>E. coli</i>	87
7.5.4 Detección de <i>E. coli</i> con el aptasensor con electrodos de oro.....	88
7.5.5 Análisis Raman del electrodo de oro después de medir con <i>E. coli</i>	92
7.5.6 Detección de <i>E. coli</i> con el aptasensor NASEc en muestras de agua comercial	94
7.5.7 Estabilidad del aptasensor	95
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	98
9. BIBLIOGRAFÍA	100
ANEXOS.....	111
1. Artículo en prensa	111
2. Patente obtenida.....	114
3.Tabla A Datos de conductividad de muestras de agua potable de algunos puntos de la CDMX.	115

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Indicadores de contaminación de agua potable: a) coliformes totales = contaminación ambiental, b) coliformes fecales + <i>E. coli</i> = contaminación de origen fecal, c) <i>E. coli</i> . Water--Eph-Dw (2016).....	22
Figura 2. Métodos que se pueden usar para la detección de bacterias en agua, organizados de acuerdo con el tiempo.....	26
Figura 3. Principio de un biosensor. Tomado y modificado de (Vidic <i>et al.</i> , 2017).....	34
Figura 4. Esquema de las partes de un aptasensor a) blanco b) biorreceptor c) elementos transductores tomado de Kurup <i>et al.</i> , 2021.....	37
Figura 5. Método SELEX para la obtención de aptámeros específicos usando bacterias vivas de <i>E. coli</i> 11775, tomado de C., Zhang <i>et al.</i> (2015).....	39
Figura 6. Ilustración de forma esquemática cómo se unen los aptámeros a <i>E. coli</i>	40
Figura 7. Modelo de unión de aptámero de RNA - antibiótico (trobomicina) caracterizado por multi resonancia nuclear NMR. Donde el color amarillo corresponde al aptámero de RNA II y el color gris a la trobomicina. Los puentes de hidrógeno que se forman entre ellos aparecen en color verde.....	41
Figura 8. Estructura secundaria de aptámeros para <i>E. coli</i> a), Kim <i>et al.</i> (2013 y 2014)	42
Figura 9. Unión de aptámeros marcados con fluorescencia (E10, E2 y E4) a la membrana bacteriana, reportada por Kim <i>et al.</i> (2014)	42
Figura 10. Los NTC de pared simple a) y de pared múltiple b) y micrografía SEM de SWCNT c) y de MWCNT d). Tomado de Ali <i>et al.</i> (2023)	45
Figura 11. Funcionalización de NTC prístinos con mezcla de ácidos H ₂ SO ₄ :HNO ₃ . (Cheap Tubes Inc, 2016)	46
Figura 12. Celda conductimétrica y ecuación de conductancia.....	50
Figura 13 Estrategia Experimental.....	57
Figura 14. MWCNT a) sin funcionalizar y b) funcionalizados en solución acuosa.....	59
Figura 15. Epoxi de plata a) MWCNT b) electrodos de oro sin modificar c) electrodos de oro modificados d) electrodos para usarse.....	60

Figura 16. Conductímetro cerrado a), conductímetro abierto para ensamblar los nanoelectrodos modificados b)	61
Figura 17. a) Inóculo preparado con cultivo de <i>E. coli</i> puro y b) diluciones para medir la UFC/100 mL, c) la conductividad con NASEc y caja de Petri con ENDO.....	62
Figura 18. Aptasensor con electrodos de grafito.....	66
Figura 19. Medición de <i>E. coli</i> con los electrodos de grafito.....	66
Figura 20. Micrografía de sustrato (grafito) sin <i>E. coli</i> (a), la superficie del electrodo de grafito con MWCNT y aptámeros con algunas células de <i>E. coli</i> (b) y un acercamiento de <i>E. coli</i> 10^{-3}	69
Figura 21. Electrodos de latón: a) electrodo de 3 mm de diámetro b) electrodo soportes de acrílico.	70
Figura 22. Electrodos modificados (1 y 2) con MNTC y AE10, ensamblados en soportes de acrílico en paralelo a una distancia de 3 mm y AE10	70
Figura 23. Micrografía SEM de electrodo de latón con MWCNT carboxilado con Epoxi de plata y AE10.....	72
Figura 24. Detección de <i>E. coli</i> con el aptasensor a bajas concentraciones (1 UFC/100 mL) y altas (8600 UFC/100 mL) en NaCl 2.5 μ S/cm con electrodos de latón modificados MNTC- COOH y AE10.....	73
Figura 25. Imágenes de alta resolución de AFM, muestran MWCNT antes (a, b, c) y después de modificar con AE10 (d, e y f). La parte superior de la superficie, imágenes (a y d) sección transversal (b y e) y vista 3D (c y F)	74
Figura 26. Adsorción AE10 en NTC con $Q_{max} = 37 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ y $K_b = 81 \mu\text{g mL}^{-1}$	75
Figura 27. Espectro Raman de las muestras CNT: sin aptámero (a) y después de modificado por 14 $\mu\text{g/mL}$ (b) y 139 $\mu\text{g/mL}$ de AE10. Picos Raman característicos de MWNTC 1342 cm^{-1} (D) y 1577 cm^{-1} (G).....	77
Figura 28. Variación de la intensidad relativa (G/D) en función de la concentración de AE10.....	78
Figura 29. a) Electrodos de oro con NTC y NTC-AE10 y b) electrodos con agua estéril.....	79
Figura 30. Electrodo de oro con NTC-sin AE10 a) y Electrodo de oro NTC AE10.....	79

Figura 31. Micrografías SEM de electrodos de oro modificados con MWCNT sin aptámero expuestos a <i>E. coli</i> a) y d) a <i>S. marcescens</i> . Electrodo de oro modificado con MWCNT- funcionalizados con A (E10) en presencia de <i>E. coli</i> b), c) y e) en presencia de <i>S. marcescens</i>	82
Figura 32. Esquema de la construcción de NASEC donde: a) electrodo de oro sin modificar, b) electrodo de oro con NTC, c) electrodo de oro con NTC y aptámero y d) electrodos.....	84
Figura 33. Electodos de oro modificados.....	84
Figura 34. Conductividad de diferentes concentraciones de KCl medidas con un conductímetro de laboratorio estandarizado (I) y el aptasensor con electrodos de oro (II) y la correlación lineal entre ellos al medir la conductividad estandarizada.....	85
Figura 35. Linealidad estándar y conductividad determinada con el aptasensor en ausencia de <i>E. coli</i>	86
Figura 36. Estabilidad de las mediciones obtenidas durante los primeros 5 min con el aptasensor.....	88
Figura 37. Representación esquemática de NASEC y de la medición de la conductividad en presencia de bacterias.....	90
Figura 38. El cambio de ΔC en presencia de <i>E. coli</i> en KCl 2.5 mM.....	90
Figura 39. Espectro Raman de <i>E. coli</i> adsorbida en la nanobioestructura diseñada.....	93
Figura 40. Conductímetro H19811 con NASEc.....	94
Figura 41. Valores de conductividad obtenidos con NASEc con diferentes concentraciones de <i>E. coli</i> en agua purificada marca VENEC.....	95
Figura 42. Prueba de estabilidad de NASEc.....	97



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos para detectar <i>E. coli</i> en agua potable.....	53
Tabla 2. Características que se requieren para un aptasensor para agua potable de uso doméstico.....	54
Tabla 3. Conductividad en agua Milli-Q ^R de diferentes electrodos modificados con.....	65
Tabla 4. Detección de <i>E. coli</i> mediante electrodos de grafito modificados con NTC y AE10.....	68
Tabla 5. Detección de <i>E. coli</i> mediante electrodos de latón modificados con MNTC y AE10 (aptámero sin modificar)	73
Tabla 6. Asignación de bandas de análisis Raman de electrodo de oro con <i>E. coli</i> adheridas sobre la película nanoestructurada y funcionalizada con AE10.....	93



NOMENCLATURA

AFM: Microscopía de Fuerza Atómica.

APHA: Asociación Americana de Salud Pública.

A_{E10}: Aptámero E10 para *E. coli* modificado en el extremo 3' con un grupo amino (NH₃).

CMF: Citometría de Flujo.

EDC. HCl: Clorhidrato de N-(3-dimetilamiopropil) N'etilcabodiimida.

FM: Filtración en Membrana.

MWCNT: Nanotubos de Carbono Multipared (por sus siglas en inglés).

CNT: Nanotubos de Carbono (por sus siglas en inglés).

NHS: hidroxisuccinimida.

NMP: Número más Probable

NOM: Norma Oficial Mexicana

PBS: Amortiguador Salino de Fosfatos.

PCR: Reacción en Cadena de PEG: Polietilenglicol.

SDS: Dodecilsulfato de Sodio.

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido (por sus siglas en inglés)

SELEX: Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial
(Por sus siglas en inglés).

SWCNT: Nanotubos de Carbono de Pared Sencilla
(por sus siglas en inglés).

UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

WHO: Organización Mundial de la Salud (Por sus siglas en inglés).



GLOSARIO

Aptámeros: Son secuencias de ácido nucleico de cadena sencilla compuesta por ADN o RNA que adoptan la forma de estructuras tridimensionales únicas que permiten reconocer a un blanco único con alta especificidad y afinidad, se obtienen por método “SELEX” a partir de genotecas de oligonucleótidos.

Aptasensor: Es un tipo de biosensor que tiene como elemento de reconocimiento a un aptámero.

Coliformes: Se definen como bacterias Gram-negativas, en forma de bacilos, no formadoras de esporas, oxidasa negativa, que fermentan la lactosa a 35-37 °C en 48 H, con producción de ácido y gas.

Coliformes fecales: Son bacterias que habitan el tracto intestinal de humanos y de animales de sangre caliente, estos son *E. coli*, *Klebsiella* y *enterobacter*, se caracterizan porque pueden crecer a 44.5-45.5 °C y producir gas en medio EC 500 G.

Composites: Son materiales hechos por combinación de dos o más materiales, resultando en una mezcla más resistente.

CNT: Son nanomateriales alótropos del carbono como: el diamante, los fullerenos y el grafito.

Elemento de reconocimiento: Es un receptor que reconoce de manera selectiva y específica a un blanco o analito.

Nanomateriales: Son materiales con propiedades morfológicas menores a 1 µm en, al menos, una dimensión.

SWCNT: Consta de una lámina de grafeno enrollada en forma de tubo hueco de aproximadamente 0.5 nm y 2.0 nm de diámetro.

Transductor: Es el responsable de transformar la señal producida por la interacción del bioreceptor y el analito (blanco) específico en el biosensor.

MWCNT: Se componen de dos o más láminas de grafeno enrolladas concéntricamente con una separación de 0.35 nm aproximadamente entre las capas adyacentes y pueden alcanzar un diámetro de 100 nm.



RESUMEN

El agua para uso y consumo humano debe de estar libre de *Escherichia coli*, tal como lo establece la Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-2021), la cual garantiza su calidad microbiológica; por tal motivo, se requiere de análisis constantes para identificar contaminación bacteriana que pudiese afectar la salud de la población mexicana. El objetivo de este proyecto de investigación fue diseñar y fabricar un aptasensor (NASEc) que permita detectar *E. coli*, de forma simple y directa en agua potable. Para ello, se construyó un dispositivo que utiliza electrodos de oro, carbono y latón. Posteriormente se modificaron cada una de las superficies de los electrodos formando una nanopelícula de nanotubos de carbono de multi-pared (MWCNT), con la finalidad de aumentar la superficie de contacto e inmovilizar un aptámero (AE10) con afinidad por *E. coli*. El NASEc se basa en mediciones de conductividad eléctrica entre dos pares de electrodos con y sin modificación. La construcción de la nanopelícula con (MWCNT-AE10) permite que *E. coli* se fije en el electrodo por la afinidad al AE10 de modo que, al fijarse la bacteria satura el área del electrodo y provoca una disminución en la lectura de la conductividad del agua, lo que indica la presencia de *E. coli* en niveles de hasta una sola unidad formadora de colonia (UFC/100 mL). Durante el proceso de construcción del dispositivo fue necesario evaluar las modificaciones nanotecnológicas, para ello se emplearon técnicas de caracterización avanzadas: AFM (microscopía de fuerza atómica), SEM (microscopía electrónica de barrido), espectroscopia Raman y UV-vis. Este NASEc se construyó de manera portátil, simple, reutilizable, con alta selectividad, alta afinidad y una detección rápida (3 min), ofreciendo una ventaja sobre los métodos convencionales para determinar la calidad microbiológica del agua. NASEc está diseñado para mediciones directas sin ningún tratamiento previo de la muestra y se puede usar en agua potable que tiene un rango de conductividad de 50 a 1300 $\mu\text{S/cm}$. El uso de NASEc es una alternativa rápida que puede estar al alcance de la población en general para determinar el agua que se consume.



ABSTRACT

Water designated for human consumption must be free of *E. coli* bacteria, according to the Official Mexican Standard NOM-127-SSA1-2021, which ensures its microbiological safety. Continuous monitoring is crucial for detecting bacterial contamination, which poses a risk to the health of the Mexican population. This research project aimed to develop an aptasensor (NASEc) for direct detection of *E. coli* in drinking water. A device was constructed using gold, carbon, and grass electrodes for this purpose. The electrode surface was modified to create a large contact surface area by attaching nanotubes (MWCNT) and immobilizing an aptamer (AE10) with a strong affinity for *E. coli*. NASEc relies on measuring electrical conductivity between two pairs of electrodes, with and without modification. The nanofilm constructed with (MWCNT-AE10) enables *E. coli* to adhere to the electrode due to its affinity to (AE10). As a result, when the bacteria attach to the electrode, they cover the area, leading to a reduction in water conductivity reading. This decrease indicates the presence of *E. coli* at levels as low as a single colony forming unit (CFU) per 100 mL. For the device's development, it was essential to assess the nanotechnology knowledge. Advanced characterization techniques were employed, including atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), Raman spectroscopy, and UV-vis spectroscopy. NASEc was developed in a portable, simple, and reusable manner with high selectivity, high affinity, and rapid detection (3 min), providing an advantage over conventional methods for assessing microbiological water quality. NASEc is designed for direct measurement without any sample be used in pre-treatment and can be used in drinking water with a conductivity range of 50 to 1300 $\mu\text{S}/\text{cm}$. The use of NASEc is a quick alternative that can be available to the general population to determine the water quality.



1.INTRODUCCIÓN

En la Ciudad de México, la situación del abastecimiento y calidad del agua se presenta como un reto. Con una población de alrededor de 9200 millones de habitantes (sin contar la zona conurbada) de acuerdo con el INEGI 2020. Para cubrir las necesidades de agua, para uso doméstico y urbano de estos habitantes, se requieren aproximadamente 380 litros diarios por persona, los cuales provienen en un 70% de los acuíferos y 30% de fuentes externas como el sistema Cutzamala, de acuerdo con lo señalado por el Sistema de Aguas de la Ciudad de México (SACMEX 2024). La Ciudad de México se considera como una zona crítica desde el punto de vista ambiental por la población que tiene, la cantidad de agua que requiere y por el tipo de suelo donde se ubica. El abastecimiento de agua para uso y consumo humano debe de estar garantizado y además cumplir con los estándares de calidad señalados por la norma oficial mexicana, para prevenir enfermedades relacionadas con el agua.

La NOM-127-SSA1-2021 establece los límites estrictos en cuanto a los parámetros microbiológicos y químicos. La norma señala la ausencia/100 mL de *E. coli* o coliformes termotolerantes, además de 3 especificaciones físicas (turbiedad, pH y color verdadero), dos radiactivas y 35 parámetros más, entre los que destacan cadmio, arsénico y productos clorados de desinfección. Estos son aspectos prioritarios para garantizar la salud de la población y prevenir enfermedades; por lo anterior, se requiere de un monitoreo efectivo y continuo del agua potable todos los días, principalmente para detectar coliformes fecales y *E. coli*. Trabajos como los de Mazari-Hiriart *et al.*, 2019, señalan zonas de la ciudad (Iztapalapa, Tláhuac, Xochimilco y Coyoacán) donde la calidad del agua del acuífero (antes de la cloración), no cumple con la norma oficial mexicana, de acuerdo con datos proporcionados por SACMEX (2002-2017). Algunos elementos nocivos para la salud son sustancias tóxicas y microorganismos coliformes y fecales que alteran la calidad del agua y la vuelven incompatible para el consumo humano. Las causas diversas para la contaminación microbiológica del agua en este contexto son: cuando la fuente primaria (agua subterránea) de abastecimiento presenta:



contaminación cruzada derivada de fracturas en la red de distribución y en el drenaje; cuando hay fallas en el proceso de cloración o cuando el manejo en la fuente de almacenamiento en las cisternas o tinacos en las viviendas es inadecuado.

De cualquier modo, si bien la calidad del agua en México puede no ser la óptima, una cloración adecuada y el consumo de agua embotellada son medidas para evitar enfermedades (salmonelosis, shigelosis, cólera, hepatitis y amebiasis principalmente). Si consideramos esta opción, habría que tener en mente que el consumo de agua embotellada no es viable a largo plazo porque representa costos que podrían evitarse, al igual que la contaminación al medio ambiente por los desechos plásticos de las botellas desechables. Estudios como los de Ramírez (2018) y Montero (2015) señalan que México es uno de los principales consumidores de agua embotellada en el mundo. A pesar de ello, aquí se plantea la posibilidad de que estos consumidores puedan usar el agua de la red de distribución pública de manera directa sin poner en riesgo su salud, una vez que sean capaces de conocer la calidad microbiológica del agua en tiempo real en sus casas, de manera directa, rápida y segura, además que pueda ser utilizado por los usuarios. En esta tesis se propone desarrollar un aptasensor para detectar *E. coli*, mediante conocimientos de nanotecnología y biología molécula. Este dispositivo constituye una invención destinada a promover el bienestar de los usuarios potenciales al evitar costos de salud relacionados con el consumo del agua, debido a que les permite conocer las condiciones de potabilidad del agua que podrían consumir de manera rápida, simple y de bajo costo, considerando que *E. coli* es un tipo de bacterias del grupo de coliformes fecales que se usa como el marcador principal de contaminación fecal. Por ser eliminada en la materia fecal y por ser la ruta de transmisión fecal-oral y el agua uno de los principales vehículos de exposición, es de vital importancia detectarla para evitar enfermedades de origen hídrico. De la misma manera, se considera que el efecto positivo sobre el bienestar se extiende a los ahorros sobre el ingreso personal disponible, debido a que una práctica de consumo común durante los últimos años en el mercado de agua embotellada de México se asocia con la falta de confianza en relación con la calidad del agua proveniente de los sistemas públicos de abastecimiento.



2. ANTECEDENTES

2.1 Calidad microbiológica del agua potable

La calidad del agua se refiere a las características químicas, físicas o biológicas del agua y es una medida de la condición del agua en relación con su impacto en una o más especies acuáticas o en usos humanos, que puede ser para consumo o en actividades recreativas. Rock & Rivera (2014). El agua para uso y consumo humano debe estar libre de patógenos. Para detectar esa condición se han desarrollado métodos de control de calidad microbiológica del agua (Lipps *et al.*, 2022). El origen de muchas de estas enfermedades es causado por bacterias, virus, protozoarios y parásitos que tienen origen fecal. En muchos de esos casos, el agua es el vector de transmisión y los patógenos entéricos son los que se encuentran en ella con mayor frecuencia. También, el grupo de bacterias coliformes, más específicamente *E. coli*, es un indicador de contaminación fecal del agua potable, por lo que su presencia debe ser considerada una posible amenaza y/o un indicativo de la mala calidad microbiológica del agua. Del mismo modo, algunas bacterias entero-patógenas como *E. coli* O157: H7 están en concentraciones muy bajas, mientras que los coliformes pueden estar en mayor número en el agua. Esto se debe a que provienen de la contaminación con materia fecal de humanos o de animales de sangre caliente, en la cual la concentración de coliformes es más alta a la de bacterias patógenas (Rompré *et al.*, 2002, Edberg, 2000).

2.2 Indicadores de la calidad microbiológica del agua

Los indicadores pueden ser de dos tipos: microorganismos como: coliformes fecales, coliformes totales o estreptococos fecales, o la cuenta viable de bacterias heterótrofas, que es una medida general y de control. Éstas están presentes en todos los cuerpos de agua y constituyen un grupo de bacterias ambientales de amplia distribución, ya que son indicadoras de la desinfección del agua, principalmente. De acuerdo con los métodos estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales (Lipps *et al.*, 2022), se definen como:

2.2.1 Coliformes totales

Se conoce como coliformes a las bacterias Gram negativas en forma de bacilos, no fermentadores, no formadoras de esporas y oxidasa negativa que fermentan la lactosa a 35-37°C en 48 H, con producción de ácido y gas (Lipps *et al.*, 2022). Este grupo de coliformes está representado por cuatro géneros de la familia



Enterobacteriáceas: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella* (Davis *et al.*, 1996). La determinación de la presencia de coliformes ha sido utilizada tradicionalmente como prueba de control microbiológico de calidad de agua durante décadas en todo el mundo.

2.2.2 Coliformes fecales

Este grupo fecal se separa del resto del grupo de coliformes, incubando a una temperatura más elevada entre 44.5-44.5 °C y producción de gas. Esta prueba permite esencialmente la detección de *E. coli*. No obstante, algunas cepas de *Citrobacter* y *Klebsiella* se ajustan a esta definición (Koneman *et al.*, 2008). Por otro lado, el grupo de coliformes fecales incluye a los coliformes que habitan en el tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente, esto es *E. coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. (Goldman & Green. 2005), aunque solo se le atribuye un origen fecal a *E. coli*, las especies de los otros géneros ya citados se pueden encontrar en el suelo contaminado. Por lo tanto, se considera a *E. coli* como el mejor indicador de contaminación fecal, y su presencia en agua implica la posibilidad de que existan otros organismos del mismo origen (patógenos entéricos) y algunas cepas de *E. coli* enteropatógena.

En la **Figura 1** se muestran los indicadores de calidad de agua microbiológica y la relación que existe entre ellos en cantidad, así como la proporción entre la población de coliformes totales y coliformes fecales. Dentro de este conjunto notamos también la presencia de *E. coli* y, dentro de este subgrupo, la posible presencia de *E. coli* enteropatógena O157:H7. Por otra parte, se considera que la cepa de *E. coli* O157:H7 es un microorganismo nocivo para la salud que puede estar presente en los alimentos y agua contaminada. Por ejemplo, se ha reportado que es la responsable de 73,000 casos de infección y 61 muertes en Estados Unidos cada año, lo cual implica un costo de salud pública, por lo que es importante su detección (Varshney & Li, 2007). Los métodos más utilizados para la detección de *E. coli* se basan en técnicas microbiológicas clásicas, moleculares e inmunológicas que hacen la determinación tardada y especializada. En la siguiente sección se describen brevemente los métodos de detección más usados.

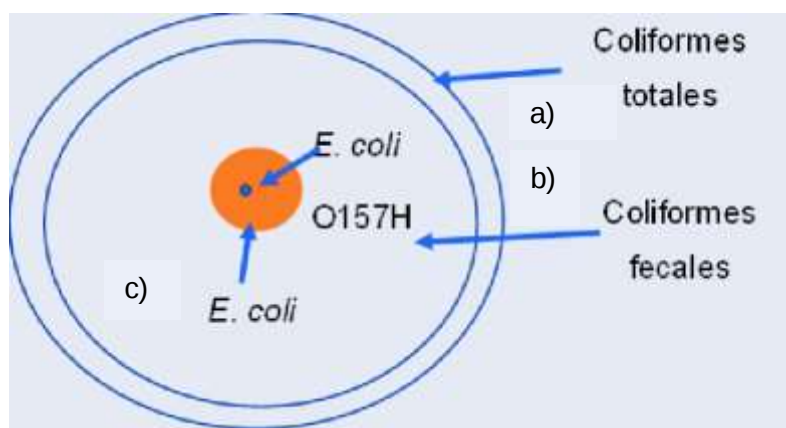


Figura 1. Indicadores de contaminación de agua potable: a) coliformes totales = contaminación ambiental, b) coliformes fecales + *E. coli* = contaminación de origen fecal, c) *E. coli* - contaminación fecal Water--Eph-Dw (2016).

2.3 Métodos de detección

2.3.1 Clásicos

Los métodos tradicionales para determinar la calidad microbiológica del agua para consumo humano son métodos que se han usado por décadas y se basan en métodos que dependen del cultivo. Cada uno de ellos incluye los siguientes pasos para la detección de bacterias: pre-enriquecimiento en medios complejos, enriquecimiento selectivo, cribado bioquímico y confirmación serológica.

La interpretación de estas pruebas es a menudo compleja, lo que genera que el método sea lento, ya que se requieren de dos a tres días para obtener los resultados iniciales y, al menos, de siete a dieciséis días para obtener la confirmación de un resultado positivo (De Boer & Beumer, 1999). Otros inconvenientes asociados con los métodos de cultivo son: la baja sensibilidad, el riesgo de contaminación microbiana que resulta en la inhibición del crecimiento de bacterias de interés, y la presencia de bacterias cultivables viable pero no cultivables



(VBNC); además de requerir personal capacitado para ejecutar esta serie de pasos. Asimismo, las consecuencias de la presencia de VBN son la de subestimar células viables, el número de patógenos y/o dificultad para aislar los patógenos de la muestra (Paniel & Baudart, 2013).

Cabe destacar que las técnicas reportadas por Lipps *et al.* (2022) son métodos en los que se basa la norma oficial mexicana para agua potable y en otros países como: Canadá, la Comunidad Europea, Estados Unidos, etc. La finalidad de establecer estas normas es para garantizar la calidad microbiológica del agua potable, ya que los valores permitidos deben tener cero presencia de *E. coli*. Los métodos clásicos más utilizados son los que se enumeran en seguida:

2.3.1.1 La cuenta en caja de bacterias heterótrofas (HPC)

Se determina como una medida general de la calidad del agua, para estimar la cantidad de bacterias vivas en el agua y poder monitorear los cambios que ocurren durante el tratamiento y cambios de temperatura. La cuantificación indica una primera prueba de que hay un crecimiento alto de bacterias. De acuerdo con la NOM-110-SSA1-1994, se deben de contar cajas con 50 a 250 UFC. Las bacterias heterótrofas incluyen a todas las bacterias que utilizan como fuente de carbono compuestos orgánicos, lo que incluye un amplio grupo de bacterias. Patógenos no patógenos, oportunistas (Lipps *et al.*, 2022).

2.3.1.2 Tubo múltiple fermentado

La técnica de enumerar coliformes por medio de la fermentación multitubo (MTF) se ha utilizado por más de ochenta años como método de monitoreo para la calidad del agua. El método consiste en inocular una serie de tubos con diluciones decimales apropiadas a la muestra de agua. Después, las muestras se consideran presuntivamente positivas cuando se observa crecimiento, producción de gas y ácido después de 24 H a temperatura de 35 °C. Finalmente, una prueba de confirmación positiva es la formación de gas en un tubo de fermentación de caldo de lactosa bilis verde brillante en cualquier momento dentro de las 48 H a temperatura de 35 °C. El resultado de MTF se expresa como número más probable (NMP). Este número es una *estimación estadística* del promedio del número de coliformes en la muestra. adicionalmente, esta técnica ofrece un enfoque



semicuantitativo de los coliformes presentes en la muestra. Sin embargo, la precisión es baja y depende del número de tubos utilizados para el análisis. Por ejemplo: si solo se examina 1 mL en una muestra que contiene 1 UFC/mL, alrededor del 37% de los tubos de 1 mL se espera que arroje resultados negativos debido a la distribución aleatoria de las bacterias en la muestra (Rompré *et al.*, 2002). Por tanto, este método requiere de 48 H para la obtención de resultados presuntivos y, posteriormente, los tubos positivos requieren de un subcultivo en medios selectivos para confirmación; este último proceso requiere de 48 H adicionales. Se puede concluir que este método clásico es tedioso por el alto volumen de diluciones y por el número de tubos por muestras de agua procesada. De cualquier manera, hay que tener en cuenta que es un método económico y relativamente fácil de llevar a cabo después de concluir el entrenamiento microbiológico adecuado que aparece en las normas internacionales.

2.3.1.3 Filtración en membrana

La técnica del filtro de membrana (FM) es una técnica aceptada y aprobada como procedimiento de monitoreo microbiológico para agua potable (NOM-127-SSA1-2021; Rompré *et al.*, 2002). Este método consiste en filtrar una muestra de agua utilizando un filtro estéril que tenga el tamaño de poro de 0,45 µm con el propósito de retener las bacterias. Acto seguido, se incuba en un medio selectivo y se seleccionan las colonias típicas. Es importante mencionar que los medios más utilizados para el análisis de agua potable son los medios M-Endo en América del Norte (Lipps *et al.*, 2022) y el medio Tergitol-TTC en Europa (AFNOR, 1990). Las bacterias coliformes forman colonias rojas con un brillo metálico en un medio tipo Endo que contiene lactosa (incubación 24 H a 35 °C para CT) o colonias amarilla-naranja en medio Tergitol-TTC (incubación 24°C y 48 °C a 37 °C y 44 °C para coliformes totales y coliformes fecales, respectivamente). Para concluir, este método, por sí solo, no es suficiente para identificarlas de manera específica y su procedimiento es más lento, ya que para identificarlas requiere de 24 H más en un medio selectivo.

2.3.2 Rápidos

Los métodos rápidos requieren un tiempo reducido para la obtención de resultados. Algunas de sus cualidades son que permiten procesar un número elevado de muestras por unidad de tiempo y son fáciles de usar, pero requieren de dos pasos.



El primero es la concentración de la muestra, que consiste en realizar la captura de los microorganismos de interés mediante método de concentración de la muestra por alguno de los siguientes métodos. 1) físico (centrifugación y filtración) o por la identificación de reconocimiento por inmunoensayo o sondas específicas, 2) por técnicas de ADN, como es la PCR en tiempo real (q PCR) cuantitativo y secuenciación, 3) mediante enzima/sustrato (cromogénicos o fluorescentes). El segundo paso se dedica a la detección de la respuesta, la cual puede ser por fluorescencia, por métodos electroquímicos, o piezoeléctricos, entre otros. Relacionado a ello, existen dos factores fundamentales para tener en cuenta. Primero, que los resultados positivos obtenidos por métodos alternativos deben de ser confirmados con métodos de referencia (normalizados). Segundo, al igual que cualquier método microbiológico, la toma de muestra es fundamental para obtener buenos resultados (buenas prácticas de laboratorio).

En la **Figura 2** se muestra un resumen de los métodos más importantes que pueden utilizarse para la detección de bacterias en el agua con base en el tiempo de análisis y de la sensibilidad de varios de ellos, y también su importancia. La citometría de flujo es una técnica que detecta *E. coli* en cinco minutos con una sensibilidad de 1050 UFC/100 mL. La técnica de PCR dura 4 H y la sensibilidad reportada es 1030 UFC/100 mL, el método inmunológico dura dos minutos y detecta 100 UFC/100 mL; algunos aptasensores detectan 100 UFC/100 mL en un minuto aproximadamente; por otro lado, la técnica enzimática requiere mayor tiempo; aproximadamente de treinta a sesenta minutos, mientras que la técnica de cultivo en placa necesita aproximadamente 48 H (Wu *et al.*, 2017).

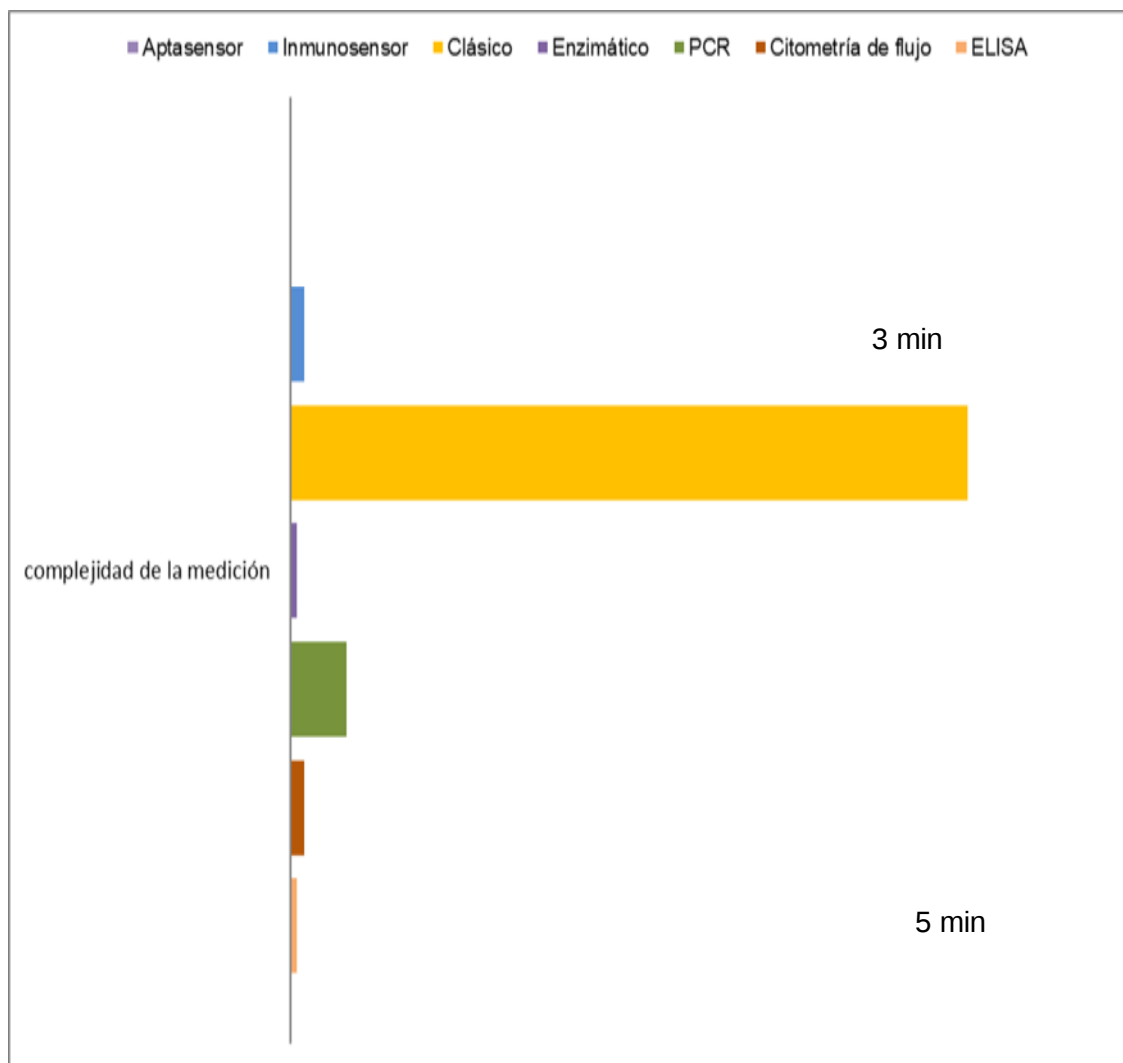


Figura 2. Métodos que se pueden usar para la detección de bacterias en agua, organizados de acuerdo con el tiempo de análisis.

2.3.2.1 Enzimáticos

Estos métodos se basan en las propiedades enzimáticas de las bacterias coliformes y para lograrlo se usa un sustrato definido. Mientras tanto, durante el proceso de incubación de los microorganismos específicos (coliformes totales y *E. coli*) se utiliza sustrato, un compuesto cromógeno o un fluorocromo, adicionado en el medio sólido o líquido para permitir que reaccione con un producto de la reacción enzimática que permita formar un complejo colorido. Esto sería indicativo de la presencia de coliformes o *E. coli*, según sea el caso. También es importante tener en cuenta que esta presencia dependerá del sustrato utilizado y la enzima presente. Asimismo, la actividad enzimática se mide por la aparición del producto de la hidrólisis obtenido mediante diferentes técnicas electroquímicas, tales como la amperometría



(Pérez-López & Merkoçi, 2011), colorimétricas, fluorométricas y luminométricas (Fiksdal & Tryland, 2008).

1. El método de presencia/ausencia con múltiples tubos fermentados consiste en tener caldo de cultivo de Lauril Triptosa para después adicionarse una combinación de sustratos ONPG (4-metil-umbeliferil-beta-D-glucurónido) para la enzima constitutiva β -galactosidasa en todos los coliformes totales y la MUGglu (4-metillumbelliferil-B-D-glucuronido), que es el sustrato cromogénico específico para la identificación de *E. coli* de forma rápida. En este sentido, la reacción consiste en la hidrólisis del MUG por la enzima constitutiva β -D-glucuronidasa que lo hidroliza para producir un producto fluorogénico que se puede detectar bajo la luz UV de onda larga (366 nm). Este método presenta una sensibilidad de 1 UFC/100 mL en 18–24 H. Se tienen resultados positivos sin requerir confirmación por pruebas bioquímicas o serológicas. Verdaderamente, esta es una alternativa para los métodos clásicos porque elimina el paso de cultivo, adicionando la ventaja de ahorrar tiempo en comparación a los métodos clásicos de MTF y MF anteriormente revisados. Estas pruebas enzimáticas son la base para métodos comerciales como Colilert, (INDEXX, Portland ME, USA), Colisure, (INDEXX; USA) y ColiQuick (Hash, Co UK), entre otros. Numerosos estudios se han realizado para comparar los métodos clásicos con estos otros métodos automatizados. De tales estudios no han resultado diferencias significativas entre los dos métodos. Las pruebas de Colisure han sido aprobadas por la U.S. EPA e incluidas en el estándar para análisis de agua potable y agua residual.

2. La filtración en membrana conjugada con detección de actividad enzimática en coliformes funciona con base en la cuenta de bacterias en medio sólido que incluye en su formulación un sustrato cromógeno y/o fluorógeno. Esta filtración facilita el análisis de la presencia de *E. coli* y de coliformes totales en muestras de agua potable. Los resultados se obtienen en 24 H, lo que es un tiempo más corto si lo comparamos con los métodos clásicos de detección con una sensibilidad de 1 UFC/100 mL.

Existen diferentes medios comerciales que se utilizan para medir la presencia de coliformes y *E. coli*, para el análisis de muestras de agua. Estos pueden ser los medios específicos para este grupo de bacterias adicionados con sustratos cromogénicos o/y sustratos fluorogénicos que detectan β -D- glucoronidasa y/o β -D-



galactosidasa. Sobre esto, los que se utilizan con mayor frecuencia son: Agar Cromocult coliforme (Merck-Millipor, Darmstadt, Alemania), Fluorocult para *E. coli* (Merck) y m-Coliblu 24 caldo (Hach). Cabe destacar que estos métodos están aprobados por US EPA para hacer un análisis del agua potable y de agua residual (Lipps *et al.*, 2022). Estos medios pueden ser usados en el laboratorio sustituyendo a los medios clásicos de detección, pero hay que tener en cuenta que son costosos y que no satisfacen el cultivo de bacterias no cultivables ya que requieren de un laboratorio con equipo especializado y de personal capacitado.

2.3.3 Moleculares e inmunológicos

Por otro lado, los métodos moleculares han sido adaptados para el análisis de agua potable en respuesta a la necesidad de tener métodos más rápidos, más sensibles y específicos que eliminan el cultivo en medios tradicionales; incluyendo el mismo tiempo de incubación y el tiempo de análisis. Son métodos que pueden identificar bacterias cultivables y no cultivables en un tiempo corto de 4 H, así como la posibilidad de una detección específica de coliformes y de *E. coli* en agua potable. Los métodos mencionados se describen a continuación.

2.3.3.1 Inmunológicos

Los métodos inmunológicos basados en antígeno/anticuerpo permiten identificar familias, géneros, especies y serotipos específicos dependiendo del nivel de taxonomía del antígeno blanco que incluyan. También, los anticuerpos pueden ser de dos tipos: policlonales y monoclonales; estos últimos son los más específicos. Pero, si vamos por partes, podemos decir que el complejo antígeno/anticuerpo puede ser detectado y cuantificado por los siguientes métodos: 1) por inmunocaptura de células o antígenos resultante de unirse a enzimas, IMS -por sus siglas en inglés- (Separación inmunomagnético), o ELISA (Enzimoinmuno ensayo de adsorción), que genera un complejo que puede ser detectado por una señal fluorescente; 2) detección de la célula por inmunoensayo. Cabe destacar que los métodos inmunológicos se han usado para detectar microorganismos indicadores de la calidad del agua mediante ELISA con anticuerpos monoclonales específicos para detectar coliformes.

Asimismo, trabajos como el método descrito por (Hübner *et al.*, 1992) proponen realizar un ensayo de ELISA -*tipo sándwich*- con anticuerpos específicos para enterobacterias G2a898 en combinación con un precultivo de la muestra en método selectivo. Esta unión permitió tener resultados en veinticuatro H sin



necesidad de confirmar los resultados por pruebas serológicas, lo cual lo vuelve un método más rápido, que el convencional de cuantificación de enterobacterias en agua. En este sentido, es importante mencionar otras de las bondades del método ELISA, como lo es la alta sensibilidad con la que trabaja ya que es fácil de realizar y detecta 10^{-9} g de antígeno-proteína. Por el contrario, una de sus limitantes es la especificidad de los anticuerpos que pueden dar reacciones cruzadas con otras bacterias presentes en la muestra de agua (Rompré *et al.*, 2002). Otra desventaja por considerar si se usa este método es la concentración del anticuerpo que sería alta y el bajo número de microorganismos presentes en la muestra de agua potable; resultado de filtrar gran cantidad de muestras para concentrar los microorganismos presentes y poder detectarlos. Por último, la presencia de microbiota y otros materiales pueden estar presentes en la muestra y eso puede derivar en una interferencia en la detección deseada.

Dentro de la misma línea metodológica hay que tener presente el ensayo Immunofluorescente por ser otro método inmunológico que se ha utilizado para la identificación de *E. coli* y coliformes en agua potable. Su principal cualidad es que se puede usar de forma directa o indirecta en la célula blanco. El procedimiento directo consiste en marcar un anticuerpo específico con un fluorocromo para observarse al microscopio epifluorescente. Este método se usó para la evaluación de contaminación fecal en muestras de agua; cabe destacar que estas muestras reportaron muy buenos resultados ya que se encontró mayor sensibilidad que en los métodos tradicionales de cultivo de cuenta en caja y con una detección de *E. coli* de 10^2 UFC/100mL, (Zaccone *et al.*, 1995). Por el contrario, el método indirecto consiste en usar un anticuerpo específico para *E. coli* -que puede ser comercial-, y un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo para que reconozca al primer anticuerpo. Esta acción sucede con gran exactitud y precisión al observarse la fluorescencia en el microscopio, aunque también puede cuantificarse en el citómetro de flujo por ser un método rápido una vez que se filtró la muestra de agua. Esta rapidez recae también en la posibilidad de marcar directamente la membrana con inmunofluorescencia para cuantificar coliformes fecales. Es importante mencionar que este método equivale al de filtración en membrana y que una desventaja es que no puede distinguir entre bacterias vivas y muertas; ni tampoco dar información sobre el estado fisiológico de las bacterias.

En conclusión, la limitante de los métodos inmunológicos como se señaló anteriormente recae principalmente en la necesidad de usar un gran volumen de



muestra porque contiene un bajo número de bacterias blanco. Sin embargo, esta limitante se puede resolver al usar esferas magnéticas con anticuerpos monoclonales, o policlonales, ya que pueden atrapar a las bacterias si concentramos la muestra y las identificamos por medio de un ensayo inmunofluorescente de forma directa; o mediante la forma quimioluminiscente-Elisa. Asimismo, con este método se puede detectar rápidamente la presencia de *E. coli* en agua potable, una vez hayamos concentrado la muestra al ser incubada con ECA unido a NMP (nanopartículas de fierro) previamente sintetizadas. Después de ello, se hace pasar por una columna magnética para separar las nanopartículas unidas a *E. coli* separación (inmunomagnética). Por último, posterior a la realización del ELISA tipo sándwich tendremos una detección de *E. coli* de 5×10^6 células/mL en un tiempo de análisis de tres a cuatro H (Pappert *et al.*, 2009).

2.3.3.2 Basado en ácidos nucleicos

La introducción de las técnicas moleculares para determinar la calidad microbiológica del agua son una alternativa para reducir el tiempo de análisis y la sensibilidad, principalmente. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Iqbal *et al.*, 1997) consiste en replicar un segmento DNA junto a una enzima DNA polimerasa (*taq polimerasa*) y oligonucleótidos (iniciadores) específicos. La eficiente detección depende de tres factores: 1) la homología y complementariedad entre la secuencia a amplificar, 2) los iniciadores seleccionados, y 3) la temperatura de hibridación. Los ciclos de PCR dan como resultado una amplificación exponencial del blanco que permite tener un número alto de copias; aun cuando se parta de un número bajo de microorganismos en la muestra a analizar, como sucede con el agua potable (Bej *et al.*, 1991). El método de PCR se ha aplicado en muestras de agua potable para detectar coliformes totales, amplificando el gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa y para detectar coliformes fecales el gen *uidA*. Actualmente se han reportado ensayos para detectar *E. coli* y coliformes totales en agua mediante la recuperación microbiana y la detección de genes *lacZ*, *wecG* y 16SRNA. (Maheux *et al.*, 2014) Un estudio importante ha sido el comparativo entre la técnica de PCR, el método Colilert y el medio clásico (Maheux *et al.*, 2014). Por otro lado, existen diversas variantes de PCR que se pueden aplicar en el análisis de agua potable de acuerdo con las necesidades del estudio que se requiera realizar. Por ejemplo, PCR multiplex donde se utiliza una mezcla de diferentes iniciadores para amplificar diferentes fragmentos de DNA en un mismo tubo de reacción y así poder identificar coliformes



totales y *E. coli* en una misma muestra de agua (Bej *et al.*, 1991); también está la PCR anidada que se trata de un análisis con un doble PCR que utiliza un iniciador interno en la segunda PCR. Para más información se pueden consultar los resultados publicados por (Juck *et al.*, 1996). De cualquier modo, con estas modificaciones se obtiene mayor especificidad y no requiere de hibridación para confirmar los resultados, lo que se traduce en una ventaja, ya que el análisis puede detectar en un periodo de 6 a 8 H. Es importante destacar que la visualización de productos de PCR por hibridación con sonda marcada, para muestras con baja concentración detectando hasta concentraciones de (1 célula /100 mL) de producto de PCR

Otra característica importante de mencionar es que el PCR en tiempo real es una variante del PCR tiempo final. Es decir, es una técnica cuantitativa donde se monitorea la concentración de producto y se amplifica. También, la fluorescencia emitida que generalmente usa el SYBR Green® como fluorocromo emite una luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 522\text{nm}$), o bien, funciona con sondas específicas marcadas. Cabe destacar que la técnica de qPCR se ha utilizado para cuantificar *E. coli* y otros indicadores de calidad de agua, (Ahmed *et al.*, 2012; Botes *et al.*, 2013) con alta sensibilidad. El método de qPCR también se ha utilizado para detectar la cepa enteropatógena *E. coli* O157: H7 que es un patógeno bacteriano que causa colitis hemorrágica (HC) y síndrome urémico hemolítico (SHU), Rodríguez-Angeles *et al.*, 2002. Del mismo modo, se ha reportado que se le implica como el agente etiológico de varios brotes de enfermedades transmitidas mediante el agua. Es decir, que la dosis infecciosa de este patógeno se encuentra en el rango de diez a cien células. Cabe destacar que *E. coli* O157:H7 fue incluido como contaminantes del agua potable por la EPA en 2009 debido a su potencial para causar enfermedades transmitidas por el agua potable (Sen *et al.*, 2011).

Actualmente se han utilizado tecnologías donde convergen métodos moleculares e inmunológicos. Por ejemplo: PCR-Elisa, para detectar coliformes en agua, donde el tiempo de análisis es de cuatro h y detecta cinco UFC/100 mL para coliformes totales. Aquí, el margen de error es del 1.4% en la detección (Kuo *et al.*, 2010). Para concluir se puede decir que, si bien los métodos moleculares son precisos, altamente sensibles y más rápidos que los métodos clásicos, tienen la desventaja de ser más caros y de requerir de equipo especializado, por lo que no es la mejor de las opciones disponibles para un público amplio y que no tiene conocimientos del área.



2.3.3.3 Citometría de flujo

Esta es una técnica multiparamétrica y cuantitativa donde su principal característica es el análisis de dispersión y fluorescentes de las células al hacer pasar un haz de luz (Laguado, 2007). Esta técnica se ha utilizado en el campo de la microbiología con mucho éxito por ser una herramienta rápida y sensible para la detección de microorganismos en el agua. La citometría de flujo (CMF) permite obtener información sobre la genética y datos fisiológicos, así como morfológicos considerados en la diversidad de microorganismos. Una de sus principales aplicaciones ha sido en la microbiología ambiental porque es utilizada para caracterizar microorganismos en ambientes extremos y en nuevos ecosistemas, así como en muestras de agua potable donde se detectan microorganismos viables de forma rápida pero que no son cultivables que no se pueden detectar por métodos convencionales.

Por otro lado, el principio de la citometría se basa en las células en fase líquida pasan individualmente al frente de una fuente de luz (láser) y los datos de aquella luz reflejada, y de la fluorescencia emitida, son recolectados y organizados para analizarse posteriormente mediante un software especializado. De modo general, puede destacarse que la técnica de CMF ha sido utilizada para detectar bacterias presentes en muestras de agua potable al usar compuestos químicos como el yoduro de propidio y el SYBR Green, por la capacidad que esto tiene para marcar el ADN. Este ejercicio sucede bajo condiciones diversas de la membrana celular y el mecanismo de acción en la cual la célula intacta (células vivas) deja pasar el SYBER Green para teñir de color verde; mientras que el yoduro de propidio no puede penetrar en la célula intacta. Hay que tomar en cuenta que, en situaciones donde la membrana está dañada y se tiñe con el SYBR Green y el yoduro de propidio juntos, se tiñen de rojo muertas y las células vivas se tiñen en verde.

Para concluir este método, cabe destacar que la evaluación de la calidad del agua por medio de citometría de flujo es útil para el monitoreo en los procesos de tratamientos de agua o para la detección de cambios en la calidad del agua potable. Por ejemplo, esta técnica ha sido utilizada por el Instituto Federal de Ciencia y Tecnología del Agua de Suiza (EAWAG) como el método oficial para determinar la calidad microbiológica del agua. Esta decisión probablemente ha tenido relación con el hecho de que este método permite determinar el número total de células en una muestra de agua en pocos minutos de medición, aunque se requiere de una preparación de la muestra; lo que permite tener indicios sobre su contaminación,



mediante la huella digital del agua. Asimismo, detecta cambios en las bacterias en estado fisiológico. Por ejemplo, si se encuentran activas o inactivas. Otra cualidad destacable es la intensidad en la fluorescencia ya que está determinada por el alto o bajo contenido de DNA en la célula bacteriana (Koetzsch., 2012; Nevel *et al.*, 2017).

2.3.4 Espectrometría Raman

Esta es una técnica fotónica que proporciona información química y estructural de un compuesto orgánico, inorgánico o biológico de forma rápida; además de ser técnica con alta precisión. El método se basa en el examen de la luz dispersa al incidir sobre el material un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de luz es dispersa inelásticamente, que experimenta ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado independientemente de la frecuencia de luz incidente, es una luz no destructiva y se realiza sobre el material directamente. Es una técnica que se ha aplicado en sistemas biológicos para la identificación de microorganismos mediante los espectros vibracionales específicos de cada molécula.

La técnica de espectrometría Raman en sus diferentes modalidades SERS (espectrometría mejorada en superficie), se ha utilizado como una herramienta analítica para la identificación y detección de bacterias patógenas *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, a nivel laboratorio; el espectro SERS va de 600-1800 cm^{-1} y 600-1600 cm^{-1} respectivamente este espectro permite una identificación rápida y sensible de estas bacterias (Su *et al.*, 2015), las bandas importantes que Su *et al.*, 2015 reportaron, fueron, 722 y 729 cm^{-1} que corresponden a la deformación vibracional de adenina y son bandas características del espectro de ADN, otro conjunto de bandas reportadas se encuentran en la posición 1442, 1472 y 1478 que corresponde a la deformación C-H₂ de moléculas proteicas. El análisis de células individuales de *E. coli* fue realizado mediante espectrometría micro-Raman confocal, mediante el cual se encontraron bandas en la posición 728 cm^{-1} para adenina y 1453 cm^{-1} para lípidos (CH₂) (Xie and Li, 2003). Mediante esta técnica, se puede estudiar la superficie de los biosensores microbiológicos y analizar las modificaciones a nivel nanométrico, por ejemplo, la inmovilización de aptámeros para identificar bacterias, además de electrodos que se modifican con NTC y se fijan sondas de DNA a NTC para la identificación de *E. coli* (Ozkan-Ariksoysal *et al.*, 2017).

El grupo de técnicas anteriormente descritas son técnicas que se han utilizado para

el análisis de bacterias en agua; sin embargo, el uso de este dispositivo para determinar la calidad microbiológica del agua ha sido poco utilizado.

2.3.5 Biosensores

El IUPAC define un biosensor como un dispositivo analítico capaz de proporcionar información analítica, cuantitativa o semicuantitativa en el cual se incorpora un material biológico (tejidos, anticuerpos, microorganismos, enzima, organelos, etc.) o biomimético (aptámeros, ácidos nucleicos, péptidos y polímeros de impresión molecular), íntimamente asociado o integrado con un transductor físico químico (Lazcka *et al.*, 2007). El rasgo característico de un biosensor es el contacto directo entre el elemento de reconocimiento biológico o bioreceptor y el transductor. En un biosensor el material biológico le confiere la selectividad, mientras que el transductor, le aporta la sensibilidad. En la **Figura 3** se muestra el principio de funcionamiento de un biosensor (Strehlitz *et al.*, 2008). Los biosensores se pueden clasificar de acuerdo: al tipo de interacción que se da entre el elemento de reconocimiento y el analito; el método para detectar la interacción y la naturaleza del elemento de reconocimiento o del sistema de transducción (González *et al.*, 2005).

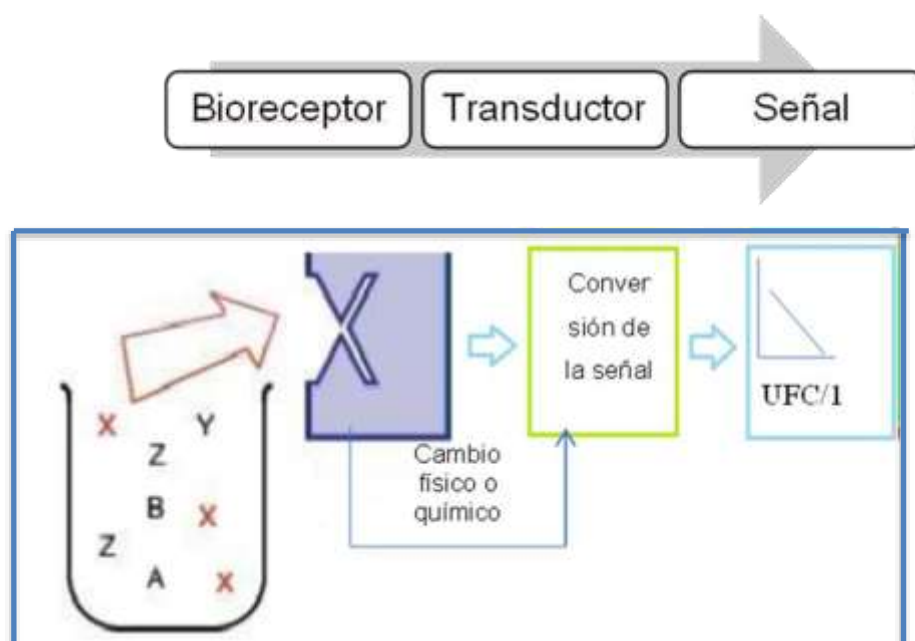


Figura 3. Principio de un biosensor. Tomado y modificado de (Vidic *et al.*, 2017).

Los biosensores son dispositivos analíticos que tienen las siguientes características: la capacidad de detectar en tiempo real, alta sensibilidad, tiempo



corto de análisis, facilidad de automatización, capacidad de inclusión en sistemas de integración y la miniaturización. Este abanico de cualidades ha permitido que en los últimos años la tecnología de biosensores se desarrolle para aplicarla en diferentes campos: ambiental, médico y biotecnológico, lo cual ha favorecido el desarrollo comercial de biosensores para la detección de microorganismos patógenos o indicadores de calidad en alimentos y agua (Lazcka *et al.*, 2007). Los biosensores desarrollados para detectar microorganismos en agua se detallan en la siguiente sección

2.3.5.1 Enzimáticos

Los biosensores basados en la detección de la actividad enzimática han sido ampliamente reportados en la literatura y se basan en la detección de la actividad enzimática de los microorganismos indicadores de la calidad del agua: coliformes fecales (*E. coli*) y coliformes totales. Una de las más utilizadas, es la β -D-galactosidasa (β -GAL) que cataliza la hidrólisis de la lactosa en galactosa y glucosa (Wutor *et al.*, 2007), el uso de sustratos criogénicos y fluorogénicos, como el cromógeno clorofenol β -D-galactopiranosido (CPRG) por sus siglas en inglés. Este compuesto es de color amarillo y mediante la enzima β -galactosidasa puede desdoblarse en clorofenol de color rojo (CPR). Con el principio de esta reacción se han desarrollado biosensores electroquímicos, donde se puede detectar contaminación fecal en agua. Algunos autores han reportado la modificación de los electrodos con metalofalocianina para diseñar un biosensor electroquímico que detecta 1 UFC/100 mL de coliformes en agua contaminada (Wutor *et al.*, 2007); otro biosensor portátil basado en este mismo principio (hidrólisis de la lactosa) y midiendo con un glucómetro la desaparición de glucosa en el medio por presencia de *E. coli* en la muestra de agua (Chavali *et al.*, 2014). En la Universidad de Alberta, en Canadá (Gunda *et al.*, 2014) desarrollaron un kit para detectar la presencia y la ausencia de *E. coli* y coliformes totales en agua para usarlo en campo y tiene como fundamento la cuantificación del producto de la hidrólisis enzimática.

2.3.5.2 Inmunosensores

Son biosensores donde los anticuerpos son el elemento de reconocimiento y pueden estar acoplados a diferentes sistemas de transducción según sean las necesidades y el interés de la aplicación. El uso de anticuerpos en estos biosensores ha sido muy utilizado para la detección de microorganismos en diferentes muestras complejas como alimentos, sangre y medio ambiente (sistemas acuáticos). Diferentes inmunosensores se han desarrollado para detectar *E. coli* en agua, entre ellos, el de superficie plasmón resonancia que utiliza



anticuerpos policlonales para reconocer específicamente a *E. coli* con un límite de detección de $9 \times 10^2 - 18 \times 10^6$ UFC/100 mL en treinta minutos (Dudak & Boyaci, 2007).

Del mismo modo, en los cuerpos de agua abiertos o cerrados que abastecen a los sistemas de potabilización, se pueden encontrar bacterias patógenas como *E. coli* enteropatógena (O157:H7), la cual puede causar severas diarreas (hemorrágicas) y daño renal. Por tanto, en la literatura se han reportado diversos inmunosensores que miden la impedancia de la bacteria capturada en la superficie del electrodo de oro por parte de los anticuerpos (Wan *et al.*, 2016; Cimafronte *et al.*, 2020). Los autores ahora citados reportaron el desarrollo de un inmunosensor que detecta la presencia y la ausencia de *E. coli* en agua en concentraciones de 300 UFC/ 100ml en una hora. Para lograrlo, el método se basa en usar sensores de oro serigrafiados donde se inmovilizan anticuerpos anti *E. coli*, y se mide la impedancia como respuesta. Otro diseño de inmunosensor muy promisorio es el diseñado por (Dudak & Boyaci, 2007) con anticuerpos policlonales específicos para *E. coli*. Aquí, los anticuerpos fueron inmovilizados en electros de oro y detectaron 9×10^3 UFC/100 mL y se usó un microscopio de resonancia plasmón como transductor.

2.3.5.3 Aptasensores

Son biosensores que cuentan con un aptámero como elemento de reconocimiento. Otras de sus características son que los transductores y /o potenciadores de señal son los nanomateriales u otros compuestos. Cabe resaltar que el estudio y la comprensión en profundidad de cómo actúan los aptámeros de ácido nucleico, en términos de sus propiedades conformacionales y ligando-vinculante, han producido investigaciones para desarrollar sensores basados en aptámeros y transductores electroquímicos, ópticos y pizoeléctricos (Son *et al.*, 2008).

Dentro de las ventajas que brindan los aptasensores sobre los inmunosensores, destacan la estabilidad que presentan los aptámeros sobre los anticuerpos, entre ellas la modificación que puede hacerse en los extremos del oligonucleótido (3' o 5') que permite unirse a diversos nanomateriales. Esta acción les confiere estabilidad y resistencia a las enzimas nucleasa al estar fijo a los electrodos vía adsorción física o química (Hayat & Marty, 2014; Wu *et al.*, 2008). Cabe destacar que los aptámeros pueden sintetizarse por PCR una vez que estén diseñados y, a su vez, esto permite sintetizarlos químicamente a partir de una secuencia conocida que los hace más económicos que los anticuerpos que para obtenerlos se requiere de animales de laboratorio para su síntesis. Los aptámeros

son moléculas más pequeñas de 5-20 kda (1-2 nm) (Sun and Zu, 2015). Son regenerables por lo que se pueden usar para fabricar aptasensores reusables. Para concluir, este diseño permite que los aptasensores exhiban una excelente selectividad, alta sensibilidad y estabilidad que permiten contar con una gran flexibilidad en el diseño gracias a su novedosa aplicación para el monitoreo de cuerpos de agua y determinar la presencia de microorganismos, **Figura 4a** se muestran diferentes blancos como bacterias, virus, fármacos etc., en b se presentan diferentes receptores aptámeros, DNA, anticuerpos etc., en c., nanopartícula de oro, NTC, etc.

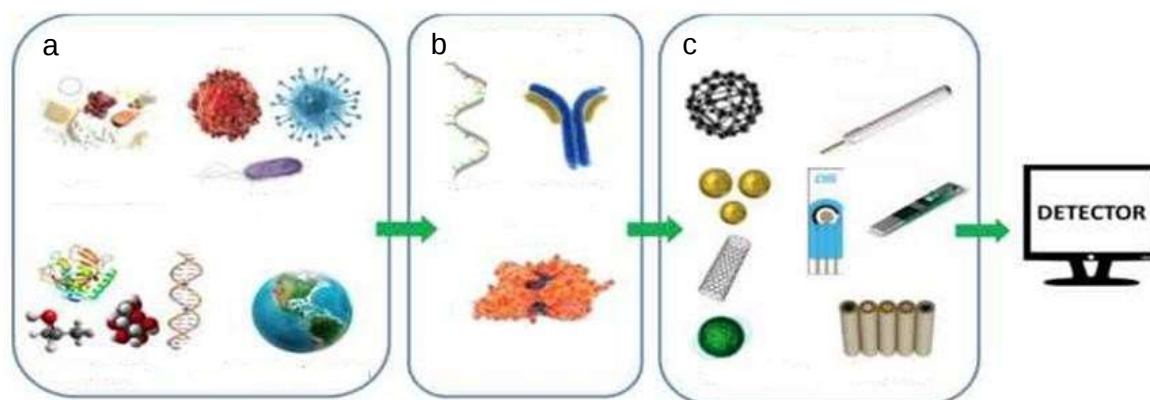


Figura 4. Esquema de las partes de un aptasensor a) blanco b) biorreceptor c) elementos transductores tomado de Kurup *et al.*, 2021.

La integración de nanomateriales en la plataforma del diseño de los aptasensores abre muchas posibilidades expresadas en los siguientes apartados. Del mismo modo, los bioreceptores que han presentado mayor uso en la fabricación de biosensores en los últimos años son los aptámeros, por la gran variedad de ventajas mencionadas anteriormente. Las publicaciones reportadas en la base de datos (Science Direct), indican un incremento de aproximadamente 300% de publicaciones con el término aptasensor en 10 años Kurup *et al.*, 2021, lo que muestra su importancia e interés en el campo científico y tecnológico. Los aptámeros son la base de los aptasensores y se describen enseguida.

2.3.6 Aptámeros como elemento de reconocimiento (bioreceptor) aptasensor

a) ¿Qué son los aptámeros?

Los ácidos nucleicos fueron durante mucho tiempo considerados como depósito de la información genética (ADN) y de su transferencia de genes a proteínas (ARN). Actualmente se sabe que pueden tener otras funciones, como la de catálisis enzimática (ribozymes), y la de oligonucleótidos que pueden unirse a varias moléculas diana de nombre “aptámeros” que confirman la multifuncionalidad de los ácidos nucleicos (Lakhin *et al.*, 2013). El término aptámeros (del latín *aptus* que significa “fijar” y del griego *meros* que significa “partícula”) fue acuñado en 1990 por Gold y Tuerk en paralelo con Andy Ellington y Jack Szostak. Estos son ácidos nucleicos de cadena sencilla (ssDNA y RNA) de longitud (70-100) nucleótidos y (5-15) KD (Lakhin *et al.*, 2013). Dichos oligonucleótidos tienen una región no variable en la parte central flanqueada por dos secuencias variables a los extremos. Estas moléculas pueden adoptar estructuras globulares dependiendo de su secuencia y de las condiciones en las que se encuentran. Asimismo, estas estructuras tridimensionales permiten unirse de manera estable a sus dianas, las cuales van desde pequeñas moléculas hasta complejas estructuras multiméricas (Aptusbiotech, s.f.). Los aptámeros se seleccionan mediante la técnica de SELEX.

Figura 5.

2.3.7 Método SELEX para obtención de aptámeros

Usualmente se piensa que los ácidos nucleicos son los titulares de la información genética y que no tienen comportamiento como el de las proteínas globulares. Sin embargo, se ha demostrado que aptámeros seleccionados por el método SELEX (por sus siglas en inglés) y la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (Wu *et al.*, 2012) pueden comportarse como anticuerpos; de ahí que también se conocen como anticuerpos sintéticos, Ospina (2020). Este método utiliza la química combinatoria para la selección de ácidos nucleicos sintéticos con alta afinidad por su molécula blanco. La química combinatoria consiste en la síntesis de un número significativo de moléculas de estructura similar que forman una colección (bibliotecas), consiguiendo una gran diversidad.

El método SELEX consta de tres pasos principales: 1) la interacción de los miembros de la biblioteca con la molécula blanco, 2) la selección de los miembros que poseen afinidad por la molécula blanco, 3) el enriquecimiento de la secuencia por PCR (**Figura. 5**). En esta Figura se presentan los pasos principales para la

obtención de la secuencia del aptámero por método SELEX. En este caso, para obtener aptámeros que potencialmente pueden reconocer a la célula de *E. coli*, donde se encuentran biomoléculas como lipopolisacáridos y proteínas, entre otros. Para este caso se utilizó la cepa (11775), Zhang *et al.* (2015). Estos autores utilizan ocho ciclos para seleccionar aptámeros que reconocen a la célula de *E. coli*. De este método se obtienen moléculas que, a pesar de que están hechas químicamente de ácido nucleico, son parecidas a las proteínas.

Por último, los aptámeros obtenidos tienen afinidad a nivel nM por su diana; esta afinidad depende del número de ciclos utilizados para la selección. Se han reportado aptámeros con afinidad a nivel de picomoles; superando a los anticuerpos en este nivel de afinidad. Uno de los atributos de los aptámeros es el de distinguir entre cambios estructurales a nivel de grupo funcional de la molécula diana; esto los hace altamente específicos.

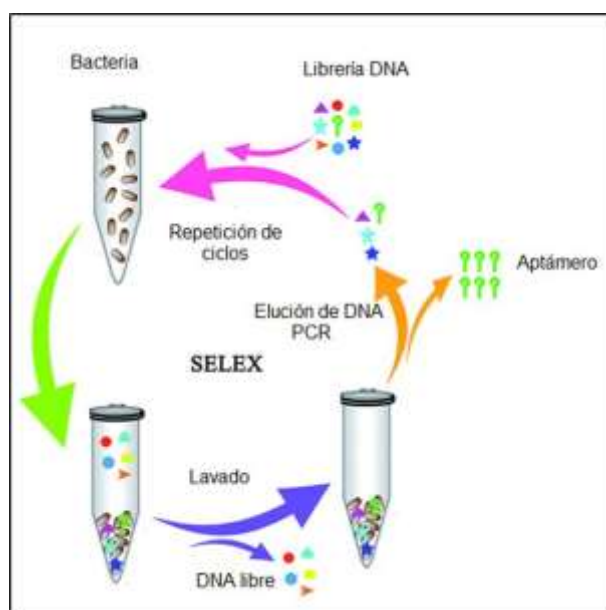


Figura 5. Método SELEX para la obtención de aptámeros específicos usando bacterias vivas de *E. coli* 11775, tomado de C., Zhang *et al.* (2015).

2.3.8 ¿Cómo se une el aptámero a su blanco o diana?

Los aptámeros de ADN y ARN se unen estrechamente a una amplia gama de blancos o dianas (p. ej., proteínas, péptidos, aminoácidos, fármacos, iones metálicos). En este caso, células enteras también pueden incorporar moléculas pequeñas en su estructura de ácido nucleico e integrarse en la estructura de las macromoléculas (proteínas), o bien, unirse a uno o dos sitios.

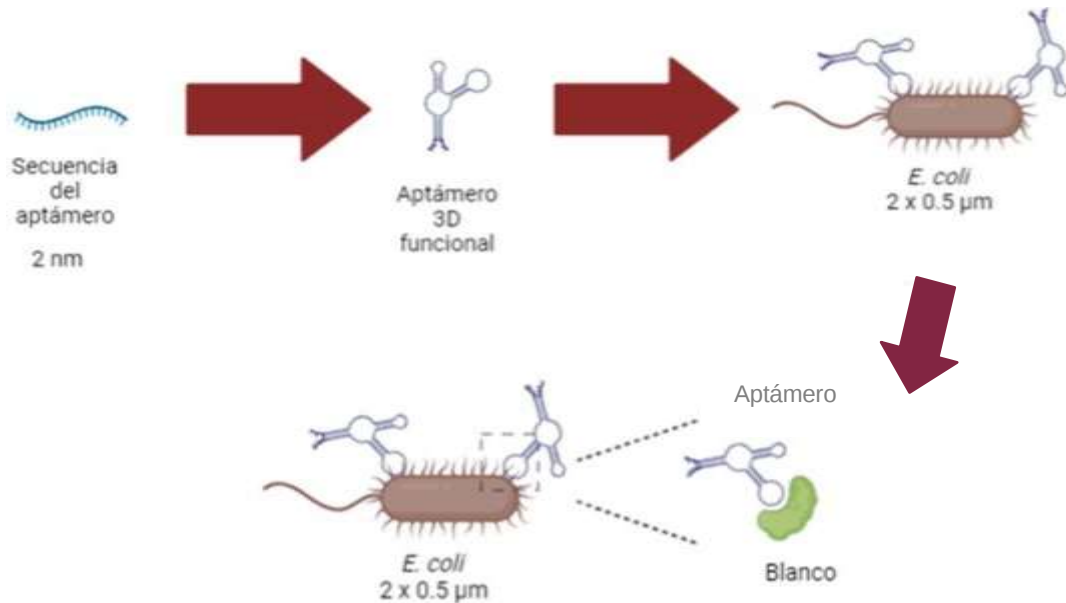


Figura 6. Ilustración de forma esquemática de la unión del aptámero a *E. coli*.

En la unión de los aptámeros a la molécula blanco se resalta la importancia de que no dependen directamente de su secuencia primaria para la interacción con su blanco, sino de su estructura tridimensional, **Figura 6**, y de los diversos plegamientos que adoptan los aptámeros: tallos-bucles, horquillas, protuberancias, pseudonudos y G-cuádruplex. Todos estos elementos les permiten reconocer a su blanco por medio de puentes de hidrógeno, mediante interacciones hidrofóbicas e interacciones de van der Waals y apilamiento (Ospina, 2020). El reconocimiento y la unión al blanco implican interacciones tridimensionales dependientes de la forma, así como interacciones hidrófobas, apilamiento de bases e intercalación. Por otro lado, se requieren diversos cambios de conformación, tanto del aptámero como del blanco, para producir un “ajuste inducido”; esencial para una integración afín. Precisamente, los aptámeros no “reconocen” su blanco, sino que “encajan” con su blanco. A partir de esta idea nace su definición de “molécula que encaja”, la cual se puede ver cuando se forma la estructura terciaria donde todo el aptámero se pliega en un estado complejo con el ligando blanco. Esta estructura tridimensional permite a los aptámeros funcionar como anticuerpos, lo que contrasta con el pensamiento tradicional, de que el ADN/ARN eran estructuras de información lineal.

El aptámero tiene la capacidad de unión a proteínas a nivel de los anticuerpos monoclonales. (Hermann and Patel, 2000) (Song *et al.*, 2008). La unión entre aptámero y bacterias no se ha analizado a nivel molecular por técnicas como la difracción de rayos X o multi resonancia nuclear. Sin embargo, existe un modelo muy estudiado que ejemplifica la unión del aptámero específico a la tobramicina nivel molecular. En la **Figura 7** se presenta el modelo de análisis por multi

resonancia nuclear y se observa la unión por puentes de hidrógeno entre el aptámero-el antibiótico. Del mismo modo, sirve para entender cómo se puede unir el aptámero a su blanco.

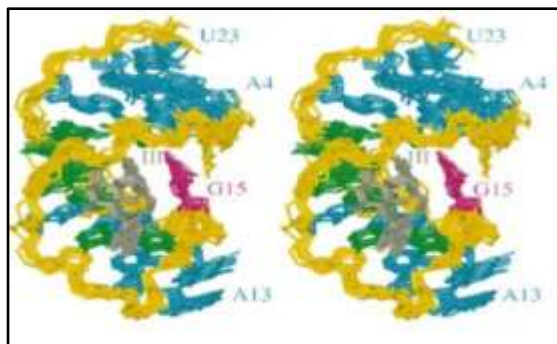


Figura 7. Modelo de unión de aptámero de RNA - antibiótico (tobramicina) caracterizado por multi resonancia nuclear NMR. Donde el color amarillo corresponde al aptámero de RNA II y el color gris a la tobramicina. Los puentes de hidrógeno que se forman entre ellos aparecen en color verde.

2.3.8.1 Aptámeros usados para construir aptasensores para *E. coli*

Existen gran cantidad de trabajos reportados sobre aptámeros sintetizados para la detección de *E. coli*. De acuerdo con la base de datos (Science Direct), el número de publicaciones a partir del año de 1996 fue aumentado y ha alcanzado el máximo en 2001; año donde se publicaron sesenta artículos principalmente para trabajos de investigación con aptámeros para *E. coli* del serotipo enteropatogénica de alta prevalencia en fuentes de agua (Saxena *et al.*, 2015). Por otro lado, mediante el método SELEX, se obtuvieron aptámeros específicos para *E. coli* de RNA y DNA para reconocer a *E. coli* O157:H7 (toda la célula) y otros para detectar el factor O157:H7 que reconoce lipopolisacáridos de *E. coli* O111. También se han reportado aptámeros que reconocen proteínas de membranas externas (ECA I y ECA II) y se han utilizado para identificarla en agua mediante aptasensores y electroquímica. Trabajos como el de Kim *et al.*, 2013 reportaron cuatro aptámeros para *E. coli* que reconocen las proteínas de membrana externa. En **la Figura 8** se presenta la estructura secundaria de los cuatro aptámeros (E1, E2, E10 y E4). Por otra parte, en la **Figura 9** se observa a los aptámeros marcados con fluorescencia (E10, E2 y E4) y a través de microscopía se observa cómo se une el aptámero a la membrana de *E. coli* marcada (Kim *et al.*, 2014).

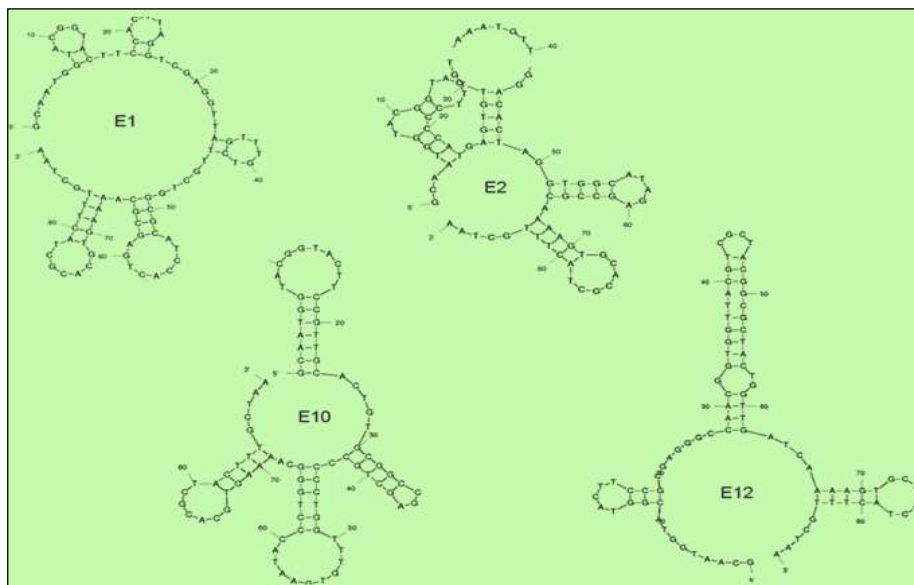


Figura 8. Estructura secundaria de aptámeros para *E. coli* a), Kim *et al.* (2013 y 2014).

De acuerdo con el análisis de las estructuras secundarias predichas por el programa Mfold, estos cuatro aptámeros comparten la misma estructura de bucle-vástago y posiblemente es el punto de unión del aptámero con *E. coli*. Resultados semejantes reportaron Wu *et al.*, 2017, quienes señalan que la estructura particular del tallo-bucle en la **Figura 8** hace una contribución clave a la unión de *E. coli* (Wu *et al.*, 2017). En la **Figura 9** se observa esquemáticamente a los aptámeros marcados con fluorescencia (E10, E2 y E4), que fueron observados a través de microscopía y de cómo se une el aptámero a la membrana de *E. coli*, emitiendo fluorescencia estos experimentos fueron reportados por Kim *et al.*, 2014 para reportar la eficiencia y punto de unión de los aptámeros seleccionados.

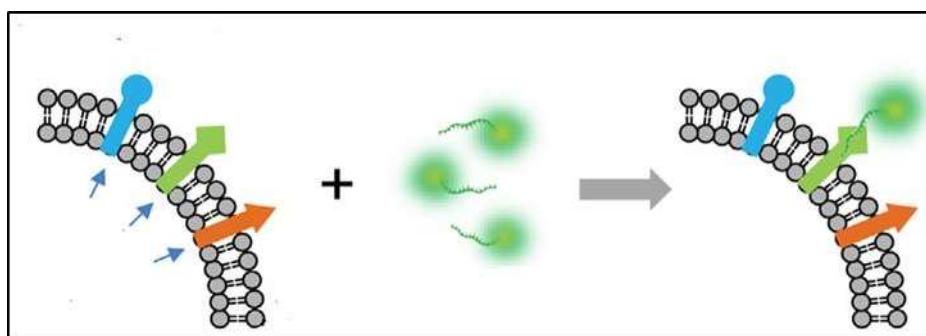


Figura 9. Unión de aptámeros marcados con fluorescencia (E10, E2 y E4) a la membrana bacteriana, reportada por Kim *et al.* (2014).



2.3.9 Nanopartículas combinadas con aptámeros para formar híbridos (DNA-NPs), como base para los aptasensores

Las moléculas biológicas pueden ser combinadas con nanoestructuras inorgánicas para formar híbridos multifuncionales con propiedades que han permitido avances en el área de la medicina, alimentos, medioambiente, etc. Los nanomateriales son la base para incorporar nanopartículas o nanoestructuras en las que se pueden conjugar biorreceptores naturales o sintéticos para generar biosensores con alta sensibilidad y especificidad que permiten detectar microorganismos. Asimismo, los aptámeros son bioreceptores que pueden estar unidos principalmente a nanoestructuras de carbono: NTC (Zelada-Guillén *et al.*, 2010), grafeno (Zuo *et al.*, 2013), nanopartículas de carbono y de Au (Wu *et al.*, 2014), partículas fluorescentes quantum dots (QDs) (Bruno, 2014) y perlas magnéticas (Wu *et al.*, 2014) para ser base de biosensores de tercera generación conocidos como nanobiosensores (Yang *et al.*, 2017).

2.3.9.1 Rol de los nanotubos de carbono en los aptasensores

En los aptasensores, los NTC tienen diferentes roles: pueden facilitar la inmovilización de gran número de moléculas como los aptámeros por aumentar la superficie de contacto, y permitir la inmovilización de un número alto de molécula blanco. También pueden actuar como transductores generando una señal de salida al interactuar con el analito, mandarla al detector, o ambas.

Estas características dependen de las propiedades de los NTC (Vasilescu, *et al.*, 2018). Estos tienen dimensiones de uno hasta trescientos nm de diámetro y de un nm hasta varios μm . Los NTC se han catalogado como uno de los avances tecnológicos más prometedores para el área biológica y médica. Desde el descubrimiento de los nanotubos de carbono (NTC) en 1991 por S. Iijima, despertaron gran interés debido a sus propiedades fisicoquímicas como el modo elástico, alta resistencia, sus propiedades térmicas, así como electrónicas, la gran superficie de contacto y la facilidad que tienen para funcionalizar.

Estas estructuras se caracterizan por ser huecas, porosas y ligeras, su estructura puede considerarse procedente de una lámina de grafeno enrollada sobre sí misma. Dependiendo del grado de enrollamiento, y de la manera como se conforma la lámina original, se puede tener distinto diámetro y geometría (Marty *et al.*, 2018). Asimismo, los enlaces químicos que unen a los átomos de carbono en los NTC son uniones sp^2 similares a las del grafito, bajo condiciones de altas



presiones los NTC pueden fusionarse modificando algunos enlaces a tipo sp². Esta característica les confiere fuerza y longitud ilimitada. Las láminas de grafeno de los NTC se atraen entre ellas mismas mediante fuerzas de van der Waals, de tal manera que los NTC tienden a entrelazarse, Montes, S. (2009), Gallastegui, A. G. (2009).

Por otro lado, los NTC tienen propiedades extraordinarias que los hacen ser un nanomaterial de gran ayuda en la fabricación de nanosensores, entre las cuales destacan la estructura química de los nanotubos de carbono, su alta relación de superficie a volumen, su extraordinaria capacidad para promover la transferencia de electrones y carga entre fases heterogéneas y la presencia de electrones móviles sobre la superficie de los nanotubos. Estas cualidades los hacen particularmente adecuados para la detección electroquímica a nivel nanoescala (Marty *et al.*, 2018). Los procesos de transferencia de carga en los nanotubos de carbono son impulsados por la alta capacitancia de doble capa resultante de la gran superficie de contacto entre el nanomaterial y la solución. Cabe destacar que el rol de NTC en la fabricación de biosensores es bien conocido porque pueden transferir electrones en las diferentes superficies de transductores como los electrodos (Vasilescu *et al.*, 2017). Las propiedades de los NTC antes mencionadas le permiten usarse con éxito en la fabricación de biosensores: enzimáticos, inmunosensores y aptasensores, para detectar microorganismos u otras biomoléculas que se encuentren en el agua.

Los NTC forman agregados en solución acuosa. Este fenómeno ocurre debido a los enlaces π y a las fuerzas de van der Waals entre los tubos. Esta característica es una limitante al usarse en la fabricación de biosensores, ya que los hace que formen películas inestables y poco homogéneas. Esto tiene la consecuencia de que se necesitan encontrar estrategias de modificación de los MWCNT con grupos funcionales; haciéndolos más polares para un mejor manejo como la funcionalización, con grupos polares carboxilos e hidroxilos An Tsai *et al.* (2013). Es importante destacar que los NTC's son una forma alotrópica del carbono, como el diamante, el grafito o las formas sintéticas de carbono alotrópico (fulerenos y grafeno). Cualquiera de estos está constituido por redes hexagonales curvadas y cerradas que pueden formar tubos monocapa o de pared sencilla (SNTC's) y multicapa de pared múltiple (MNTC's) **Figura 10**.

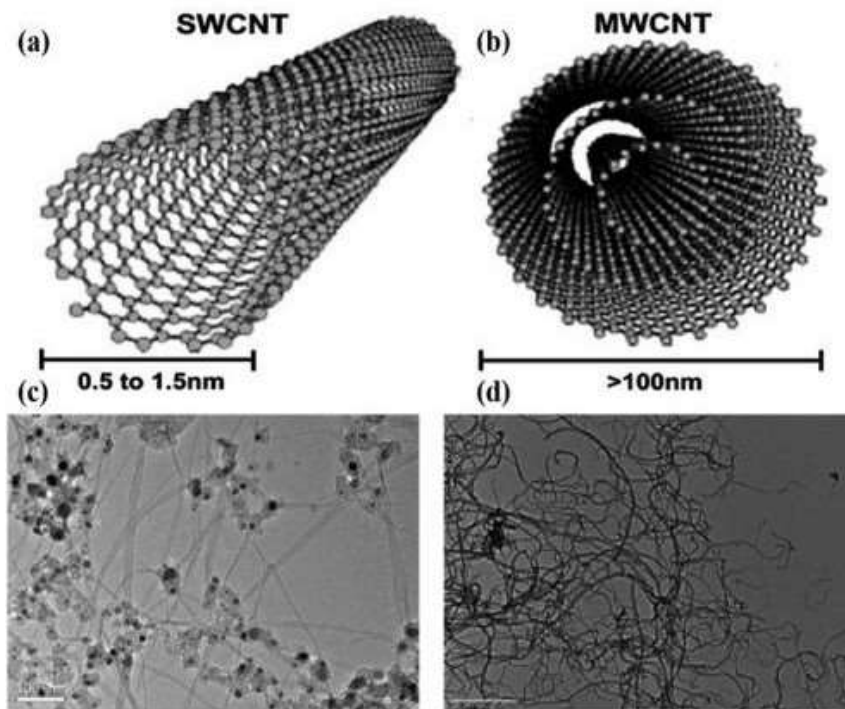


Figura 10. Los NTC de pared simple a) y de pared múltiple b) y micrografía SEM de SWCNT c) y de MWCNT. Tomado de Ali *et al.*, 2023.

2.3.9.2 Funcionalización de WNTC

La manipulación de los NTC se limita debido a que son insolubles en la mayoría de los solventes comunes, incluyendo el agua. La funcionalización orgánica de los NTC es muy importante, ya que permite un alto nivel de solubilidad en cloroformo, diclorometano, acetona, metanol, etanol e incluso en agua. La oxidación de NTC (con ácidos fuertes HNO_3 y mezcla de ácidos $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$) es muy utilizada, ya que permite eliminar impurezas producto de la síntesis (carbono amorfo, nanopartículas de carbono y los residuos de los catalizadores metálicos). El tratamiento ácido de los NTC los funcionaliza con grupos más polares COOH^- y ^-OH como se muestra en la **Figura 11** (Datsyuk *et al.*, 2008). Cabe destacar que esta funcionalización facilita la interacción entre los grupos pegados en las paredes y moléculas biológicas como ADN, oligonucleótidos, proteínas etc., lo que facilita la bioconjugación para el diseño de biosensores con nanotubos de carbono. Lin *et al.*, 2000; Vasilescu *et al.*, 2018.

2.3.9.3 Inmovilización de Aptámeros a los WNTC

a) No covalente

Los NTC sirven de soporte para el bioreceptor. Por ejemplo, en el caso del ADN, se envuelve alrededor de nanotubos mediante interacciones de apilamiento π - π y por interacciones electrostáticas entre las bases de nucleótidos (púricas y pirimídicas) y las paredes laterales formando complejos ssDNA/NTC estables (Yang *et al.*, 2015). La adsorción física es uno de los métodos más simples de unión de los aptámeros a los NTC. Por último, la adsorción electrostática de los aptámeros es posible, ya que estos tienen carga negativa; puede ser viable que se unan a un transductor con carga positiva. (Johnson *et al.*, 2008).

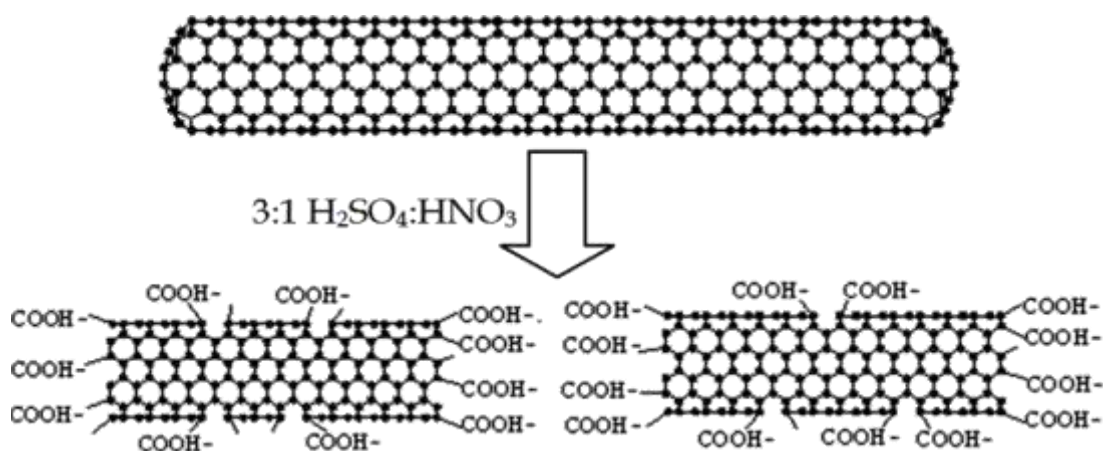


Figura 11. Funcionalización de NTC prístinos con mezcla de ácidos $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$. (Cheap Tubes Inc)



b) Unión covalente

Esta unión requiere de una primera funcionalización de los NTC por oxidación química, como se señaló en párrafos anteriores. Al incrementar el número de los grupos carboxilo, carbonilo e hidroxilo, se aumenta el número de sitios de unión para anclar biomoléculas en la superficie de NTC. El enlace se realiza mediante el grupo amino (aptámero funcionalizado con un grupo amino) y el grupo carboxilo de los nanotubos previamente oxidados para formar una amida terciaria (carbodiimida). La reacción se lleva a cabo en presencia de EDAC (1-etil-3-(dimetil-aminopropil) hidrocloruro carbodiimide) y N-hidroxisuccinimida (NHS) como catalizador (Guler & Sarac, 2016).

2.3.10 Aptasensores con nanopartículas para detectar *E. coli* en muestras de agua

El desarrollo de aptasensores con NTC para la detección de microorganismos patógenos o indicadores de calidad en alimentos y agua (Lazcka *et al.*, 2007) han proporcionado alta sensibilidad y especificidad del 100%. Se ha publicado mucho sobre aptámeros para *E. coli* y biosensores para detectarla. La mayoría están encaminados a detectar *E. coli* patógenas, enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAC) y adherencia difusa (DAEC) y enteropatógenas, que son aquellas que causan diarreas (Rodríguez-Angeles, 2002). Cabe destacar que existen muy pocos trabajos de aptasensores que se usen en la detección de *E. coli* como indicador de calidad microbiológica en agua.

Los aptasensores para la detección *E. coli* en agua se basan principalmente en inmovilizar aptámeros específicos para *E. coli* en Nps. El trabajo de Kaur *et al.* (2020) propone un aptasensor electroquímico y con aptámeros específicos para *E. coli* O157:H7. Una cualidad que presenta al usar nanopartículas de níquel es que tiene una sensibilidad de 1000 UFC/100 mL y un rango de 10^3 a 10^5 UFC/100 mL en agua potable. Este aptasensor también está diseñado para medir bacterias en alimentos (Kaur *et al.*, 2020). Si bien es un excelente nivel de detección, está lejos del valor que establecen las normas para agua potable de cero UFC/100 mL de *E. coli*.

Otro caso interesante por su uso y el volumen que se requiere es el desarrollo de un aptasensor para detectar *E. coli* O157:H7 en agua de riego. Este aptasensor



colorimétrico se basa en inmovilizar el aptámero específico en AuNPs y relacionar la concentración de bacterias con la aparición de color. El límite de detección que reportan es de 8×10^4 UFC/100 mL en agua contaminada, por lo que este aptasensor tiene la característica de requerir de 10 μ L de muestra y se obtiene un resultado en una hora, por otro lado, no se necesita pretratamiento ni concentración de la muestra y se puede usar directamente sin equipo costoso (Soheili *et al.*, 2020). Kaur *et al.*, 2017, propusieron un aptasensor para detectar *E. coli* O78:K80:H11 con un electrodo serigrafiado de grafeno donde se inmovilizó un aptámero específico para este serotipo. La presencia de *E. coli* se determinó por medición electroquímica de la impedancia. Asimismo, (Kaur *et al.*, 2017; Jim *et al.*, 2017) construyeron un aptasensor para detectar *E. coli* en agua de la llave, depósitos de agua y leche, donde en veinte minutos se tienen resultados con una sensibilidad de 3000 UFC/100 mL, este aptasensor fue diseñado para detectar *E. coli* ATCC 8739 como modelo; el diseño del aptasensor consistió en inmovilizar el aptámero en nanopartículas de oro como compuesto receptor de fluorescencia y como donador de fluorescencia el UCNPs (nanopartículas de conversión ascendentes) unida a la secuencia complementaria del aptámero marcado y el complejo nanopartículas aptámero se une a la bacteria emitiendo fluorescencia a 540 nm y absorbiendo a 980 nm, para lograr el resultado anteriormente descrito, se mide la fluorescencia verde por la espectroscopía de transferencia de energía de resonancia, por sus siglas en inglés (FET) (Jin *et al.*, 2017). Se han desarrollado aptasensores con NTC para la detección de *E. coli* en alimentos, pero no para agua potable, sin embargo; estas metodologías se pueden adaptar para el diseño de aptasensores para agua potable, por ejemplo, el propuesto por (So *et al.*, 2008), donde utilizan un aptámero de ARN como elemento de bioreconocimiento para detectar la cepa de *E. coli* α -DH5 que fue utilizada como modelo de estudio. El aptasensor se construyó inmovilizando los aptámeros a NTC y evaluando la conductancia como respuesta, logrando un límite de detección de 1050-1070 UFC / 100 mls de *E. coli*.

Otro tipo de aptasensor interesante es el desarrollado con aptámero de ARN que se obtuvo al inmovilizar químicamente en SWCNT para detectar *E. coli* CECT 675 en una matriz compleja en alimentos. El límite de detección fue de 600 UFC /100 mL en leche y 2600/100 en zumo de frutas (Zelada-Guillén *et al.*, 2013).

Estos aptasensores son muy sensibles, pero no lo suficiente para determinar la calidad microbiológica de agua potable, que debe estar libre de *E. coli*, de acuerdo



con la norma para agua potable. Sin embargo, las metodologías se pueden adaptar para desarrollar un aptasensor para agua potable.

2.3.11 Transductores usados en los aptasensores para detectar *E. coli*

Los transductores son dispositivos cuya función es transformar la energía recibida en otra forma de energía de salida, pero dependiente de la primera. En la tecnología de los biosensores, los modos de transductor más reportados son los electroquímicos que pueden ser: potenciométricos, amperométricos, conductimétricos. De una manera general, se puede anotar que este tipo de transductores miden la transferencia de especies electroactivas (iones o moléculas) presentes en una solución y en el electrodo en condiciones analíticas definidas. Por otro lado, los materiales convencionales como oro, platino o grafito, así como otros nuevos materiales (NTC o BDD), abren la posibilidad de tener microsensores portátiles, reusables, multifuncionales y que permitan el análisis de muchas muestras a efecto de que se puedan usar en campo para el análisis de muestras ambientales en la detección de microorganismos (Grieshaber *et al.*, 2008).

2.3.11.1 Transductor conductimétrico

Los biosensores conductimétricos determinan directamente la medida de la variación de la conductancia en un electrolito, el cual contiene iones móviles o partículas cargadas, para lo que se aplica un voltaje alterno entre el electrodo de trabajo, en el cual se inmoviliza el bioreceptor y un electrodo de referencia. Aquí se selecciona una frecuencia en la cual se minimicen los efectos de la polarización. Cabe destacar que la conductividad se mide en soluciones acuosa y los iones responsables de la conductividad provienen de electrolitos disueltos en el agua, como se muestra en la **Figura 12** la conductividad se calcula de acuerdo con la ecuación (1).

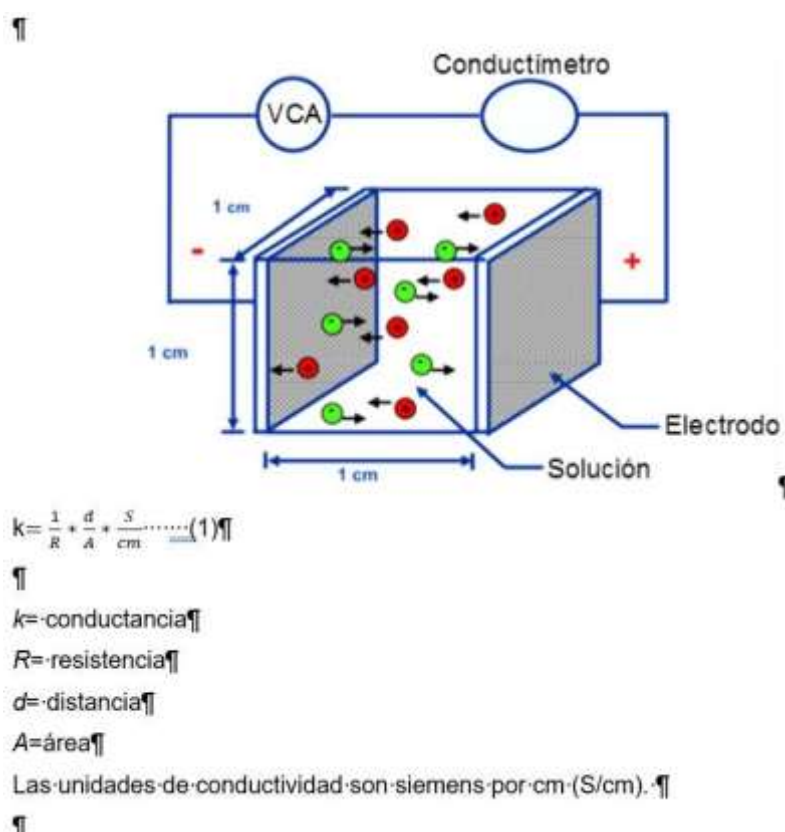


Figura 12. Celda conductimétrica y ecuación de conductancia

En el diseño de biosensores para determinar contaminantes en agua, se han utilizado transductores conductimétricos. En el caso de los biosensores enzimáticos donde la interacción entre el contaminante y el receptor inducen un cambio de conductividad debido a la producción de especies cargadas son ampliamente



utilizados como lo proponen Jaffrezic-Renault & Dzyadevych, 2008. Los factores que pueden hacer variar la conductividad son: generación de grupos de iones producto de las reacciones enzimática como (amidasa); separación de diferentes cargas (hidrogenasa y carboxilasa); migración de iones (esterasa); cambios en el tamaño de los grupos de carga (fosfatasa y sulfatasa). De los primeros biosensores contruidos con este principio destacan los que sirven para detección de urea, L- asparagina y creatinina con aplicación en el laboratorio clínico (Watson *et al.*,1987).

Por otra parte, los biosensores conductimétricos desarrollados se han aplicado en el área ambiental para la detección de fertilizantes (organofosforados), pesticidas (atrazina), nitratos y metales pesados; pero no para detectar bacterias directamente en agua. Las ventajas de usar un transductor conductimétrico sobre otros son diversas, entre las que destacan, bajo costo, fácil de medir, reusable. No obstante, las ventajas que el transductor conductimétrico presenta. Existen ciertas limitaciones como la relación ruido/señal; lo que ocasiona que se confunda con ciertos artificios con la señal generada. Sin embargo, este método ofrece un gran potencial para desarrollar biosensores comerciales en el área ambiental para control microbiológico de calidad de agua.

2.3.12 Los aptasensores como método alternativo para determinar la calidad del agua potable

Los aptasensores tienen de base los aptámeros; debido a las propiedades intrínsecas como ácidos nucleicos, alta flexibilidad de la estructura y beneficio en el diseño de su estructura, los aptámeros juegan un rol importante en el desarrollo de novedosos biosensores que ofrecen ventajas sobre los sensores que tienen como bases receptores naturales, enzimas y anticuerpos. Dentro de las más interesantes para la fabricación de biosensores y su aplicación en campo de la microbiología, es la de la estabilidad química y estabilidad a la temperatura ambiental de los aptámeros de DNA que se utilizan como elementos de reconocimiento; las cualidades anteriores contribuyen a la robustez y estabilidad de los aptasensores. Los aptámeros se modifican químicamente con facilidad para poder inmovilizarse a un soporte sólido como las NP y dar origen a

nanoaptasensores muy estables (Seok Kim *et al.*, 2016). La miniaturización de los nanoaptasensores es una cualidad que puede aprovecharse para ensamblarlos en dispositivos comerciales multiparamétricos para uso público, ofreciendo un bajo costo. En el diseño y fabricación de los nanoaptasensores la síntesis de los aptámeros es más económica, sencillas y reproducible en comparación a los anticuerpos y su especificidad es tan efectiva como los anticuerpos que es a nivel de género y especie para los microorganismos (Van Dorst *et al.*, 2010).

En la Tabla 1 se recopilieron diferentes métodos para la detección de *E. coli* en agua potable que se desarrollaron recientemente. Algunos son muy sofisticados y se basan en sensores electroquímicos (línea dos de la tabla uno), ocho sensores espectroscópicos de impedancia o enzimáticos (líneas: diez a trece); utilizando el conocimiento moderno de la nanociencia y la nanotecnología. Si bien estos métodos requieren menos tiempo para detectar *E. coli* en comparación con el método de recuento de colonias (48 h), tienen una sensibilidad muy baja. Ninguno de los métodos descritos en las primeras trece líneas fue capaz de detectar una sola UFC/ 100 mL en tiempo real.

El nanoaptasensor (NASEc) mide sin necesidad de preconcentración o incubación previa, lo que permite su uso no solo en entornos de laboratorio sino también para mediciones de campo en diversas condiciones ambientales, sin ninguna limitación. Es fácil de usar y no requiere ningún operador profesional.

Como se demuestra en este trabajo, NASEc se puede utilizar en modo reutilizable, lo que reduce significativamente el costo de operación. Vale la pena recordar que los métodos mencionados en la Tabla 2, los sensores basados en actividad enzimática de un solo uso (Mitra *et al.*, 2017) tienen un tiempo de actividad muy corto; mientras que el prototipo de NASEc se utilizó sin problemas durante dieciocho meses, como se muestra en la sección de resultados.

En la tabla 2 se presentan características deseables en un aptasensor como una alternativa eficiente y novedosa para determinar la calidad microbiológica del agua. La primera característica es la que determine una UFC/100 mL, para que cumpla con la normatividad internacional para agua potable. El agua consumida

como el agua potable está libre de *E. coli*, la rapidez para determinar si el agua es segura o no, portabilidad porque se usa en el hogar, estabilidad que sea durable y baje el costo del biosensor y sea accesible a la compra.

Tabla 1. Métodos para detectar *E. coli* en agua potable.

	Método de Detección	Sensibilidad UFC/100 mL	Tiempo de detección	Referencias
1	Orgánico/nanocompuesto, medidor de resistencia	1 X10 ⁷	5 - 24 H	Malla <i>et al.</i> (2014)
2	Aptasensor/Quimiluminiscente, aptámero-6 FAM	4.5X10 ⁵	1 H	Khang <i>et al.</i> (2016)
3	Electroforesis capilar de microchip/ aptámero específico	3.7X10 ⁴	20 min	Zhang (2019)
4	Prueba de inmersión/papel de litmus con quimiotramiento y sustrato enzimático	2 X10 ⁴	75 min-3 H	Gunda <i>et al.</i> (2017)
5	Inmunosensor / Grafeno y AuNPs	1.5 X10 ⁴	30 min	Zhao <i>et al.</i> (2018)
6	Microfluído / Mediciones impedancia	< 10 ⁴	15 -16 min	Kim <i>et al.</i> (2015)
7	Glucómetro/actividad enzimática	2 X 10 ³	8 H	Chavali <i>et al.</i> (2014)
8	TaqMan-PCR	2 X 10 ³	18 H	Frahm y Obst (2003)
9	Smartphone/ µPad	1 X10 ³	30 s	McCracken <i>et al.</i> (2016)
10	Plataforma de biosensores/ µPad	1 X10 ³	30-90 s	Ionescu (2017)
11	Detección enzimática GUD/fluorescencias	1 X10 ³	20-120 min	Hesari <i>et al.</i> (2016)
12	Detección electroquímica / biosensores compuestos de tirosinasa	1 X10 ²	6:5 H	Serra <i>et al.</i> (2005)
13	PCR – ELISA	5	4 H.	Kuo <i>et al.</i> (2010)
14	Hidrólisis enzimática de 4-methylumbelliferone- B_D Galactoside	1	7 H	Berg <i>et al.</i> (1988)
15	Detección B-galactosidasa /ensayo quimioiluminométrico en célula permeabilizada	1	6 - 9 H	Van Poucke <i>et al.</i> (1995)
16	PCR /genosensores amperométricos magnéticos – AuSPE	1	4 H	Loaiza <i>et al.</i> (2009)
17	Detección de biosensores de B-D- galactosidasa, GCE eléctrico	1	15 min	Wutor <i>et al.</i> (2006)

En la **tabla 2** se presentan características deseables en un aptasensor como una alternativa eficiente y novedosa para determinar la calidad microbiológica de agua potable.



Los métodos reportados en las líneas 14-16 lograron identificar una sola UFC en 100 mL, pero el tiempo de análisis fue entre 4 y 9 H. Finalmente, el método reportado en la línea 17, detectó una única UFC en 100 ml en 15 minutos. Sin embargo, todos requieren instrumentación y laboratorios sofisticados para procesos complejos de preconcentración, incubación y personal calificado (Meng *et al.*, 2017). Por el contrario, el nanoaptasensor (NASEc) podría detectar la presencia de 1 UFC de *E. coli* en un volumen de muestra de 100 ml en 3 minutos. Como resultado, el dispositivo descrito en esta tesis es relativamente simple, con alta sensibilidad, alta selectividad y reproducibilidad.

La primera característica es que determine una UFC/100 mL para que cumpla con la normatividad internacional para agua potable. El agua consumida como agua potable está libre de *E. coli* esta se analiza para determinar la presencia o ausencia en 100 ml de agua, o el nivel. La rapidez para determinar si el agua es segura o no, la portabilidad porque se usa en el hogar, la estabilidad para que sea durable y baje el costo del biosensor y sea accesible a la compra.

Tabla 2. Características que se requieren para un aptasensor para agua potable de uso doméstico.

Propiedad	Cualidad
Sensibilidad	1 UFC/100mL
Especificidad	La requerida para <i>E. coli</i> (marcador microbiológico del agua)
Tiempo de detección	Rápido 5 minutos
Tamaño del biosensor	Portátil y compacto
Consistencia	Las condiciones de lectura no se alteren en el laboratorio y fuera de él
Estabilidad	Elemento de bioreconocimiento, no sufra cambios que lo desnaturalicen o modifiquen
Procesamiento de la muestra	No se procese la muestra que sea una medición directa
Manejo	Simple, se pueda operar en casa por cualquier persona

Como se demuestra en este trabajo el nanoaptasensor (NASEc) mide sin necesidad de preconcentración o incubación previa, lo que permite su uso no solo en entornos de laboratorio sino también para mediciones de campo en diversas condiciones ambientales, sin ninguna limitación. Es fácil de usar y no requiere ningún operador profesional. NASEc se puede utilizar en modo reutilizable, lo que reduce significativamente el costo de operación. Vale la pena recordar que los métodos mencionados en la Tabla 2, los sensores basados en actividad enzimática de un solo uso (Mitra *et al.*, 2017) tienen un tiempo de actividad muy corto; mientras que el prototipo de NASEc se utilizó sin problemas durante dieciocho meses, como se muestra en la sección de resultados.

3.JUSTIFICACIÓN

En México, el análisis de la calidad microbiológica del agua para consumo humano se realiza mediante métodos normalizados (NOM-127-SSA1-021). Estos métodos involucran medios selectivos, pruebas bioquímicas y tiempo de análisis de 48 a 72 H para detectar *E. coli*, marcador de contaminación fecal. Más importante, estos análisis se realizan en laboratorios con personal especializado y tiempos largos de análisis. Como respuesta a ello, en este trabajo se propone contar en los hogares con un instrumento compacto que permita determinar la calidad microbiológica del agua directamente, sin reactivos o con la cantidad mínima, sin laboratorio y sin personal especializado. Para lograrlo, se consideró la plataforma de los nanobiosensores porque es una tecnología que involucra métodos moleculares con biomoléculas y nanomateriales.

4.HIPÓTESIS

La presencia de *E. coli* sobre electrodos de oro modificados con nanotubos de carbono y aptámeros puede ser detectada por la obstrucción de la superficie, disminuyendo la conductividad eléctrica.



5.OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un aptasensor basado en electrodos modificados con una superficie nanoestructurada que permita detectar en tiempo real a *E. coli* como indicador microbiológico de la calidad del agua potable.

5.1 Objetivos Específicos

1. Construcción una nanopelícula mediante la inmovilización del aptámero E10 – NH₂ a la superficie de los WNTC-COOH, mediante la metodología de enlace covalente y demostrar a nivel nanométrico la modificación y la especificidad
2. Investigar el efecto de la nanobiopelícula inmovilizada a los electrodos de oro, en la medición de la conductividad en muestras de KCl 2.5 mM en presencia y ausencia de *E. coli*.
3. Detectar la presencia de *E. coli* en muestras de KCl 2.5 mM y agua potable con NASEc en tiempo real y por el método de filtración en membrana para determinar las UFC/100 mL.
4. Determinar la estabilidad de NASEc en función del tiempo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

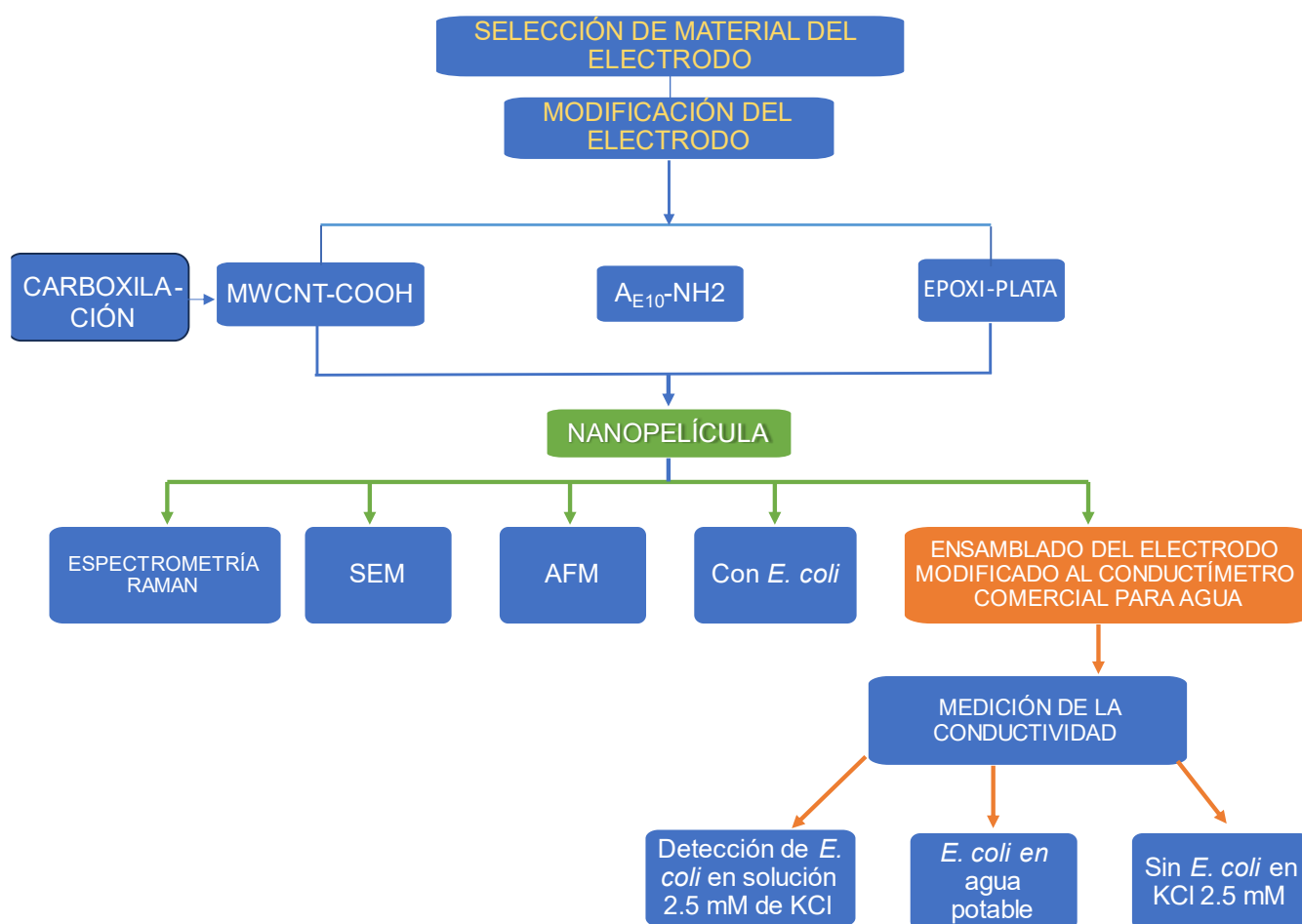


Figura 13. Estrategia experimental.



6.1 Desarrollo del aptasensor

Se desarrolló un nanoaptasensor (NASE) para detectar en tiempo real la presencia de *E. coli* en el agua potable, basado en una celda de conductividad con electrodos de oro (Au) sin modificar y modificados con WMCNT/aptámero. En su construcción, un aptámero (AE10) se une covalentemente a una capa de WMCNT carboxilados, que a su vez se adhiere a un electrodo de oro mediante epoxi de plata, formando una composite. Las variaciones de conductividad eléctrica debidas a la presencia o ausencia de bacterias (*E. coli*) en la muestra, se miden como respuesta (ΔC)

6.1.1 Microorganismos

Se utilizó una cepa de *E. coli* de origen ambiental proporcionada por el laboratorio de microbiología ambiental y tratamiento de aguas, UAM-I. Una cepa de *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), fue obtenida del cepario de la Facultad de Química de UNAM. La pureza de las cepas bacterianas fue corroborada por microscopía óptica y por las características típicas de cada una de las UFC en medios selectivos.

6.1.2 Reactivos analíticos

a) El aptámero (AE10) para *E. coli*, modificado con -NH₂ en el extremo 3' (5'GCAATGGTACGGTACTACTTCCGTTGCACTGTGCGGCCGAGCTGCCCCCTGGTGTGTGAATACCCTGGGCAAAAGTGACGCTACTTTGCTAA3'MW = 60.000 g/mol), sintetizado por Sigma-Aldrich Inc., USA, se utilizó para construir el electrodo modificado (Kim *et al.* 2013). Para preparar los electrodos modificados con WNTC, el aptámero liofilizado se disolvió en agua Milli-Q[®] hasta obtener una solución madre de 114 μ M y se conservó en congelación a -20 °C para su uso posterior.

b) Ácido nítrico (HNO₃), ácido sulfúrico (H₂SO₄), dodecilsulfato de sodio (SDS), clorhidrato de N- (3-dimetil-aminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl), N-hidroxisuccinimida (NHS), polietilenglicol y 2-mercaptoetanol. Los reactivos utilizados fueron grado reactivo (>99%) y fueron adquiridos en Sigma – Aldrich Inc., Toluca de Lerdo, Estado de México, México. Epoxi de plata adquiridos en MG chemicals®, Burlingto, Ontario, Canada. MWCNT (Cheaptubes Inc. Cambridgeport, VT, USA) con diámetro medio 20-40 nm y longitud de 10–30 μ m, pureza > 95% y contenido de cenizas < 1,5%.

6.1.3 La funcionalización de WMCNT

La funcionalización de WMCNT se realizó con mezcla de ácidos fuertes. Se pesó 20 mg WCNT y se mezcló con 100 mL de una solución 3:1 de ácido sulfúrico y ácido nítrico concentrados, la mezcla se sometió a sonicación continua durante 2 H a 40°C;

posteriormente se centrifugó a 12.000 g durante 20 min. Los WMCNT obtenidos se lavaron dos veces con agua ultrapura (Milli-Q, Millipore, I USA). El sedimentado resultante de MWCNT se volvió a suspender en 30 ml de una solución de dodecil sulfato de sodio con sonicación durante 15 min y se centrifugó a 12.000 g durante 30 min, posteriormente se lavó dos veces con agua ultrapura (Evtugyn et al., 2008). El resultado fue MWCNT-COOH. Figura 14. Los MWCNT se conservaron en viales a temperatura ambiente para ser utilizados posteriormente para la inmovilización del aptámero por unión covalente.

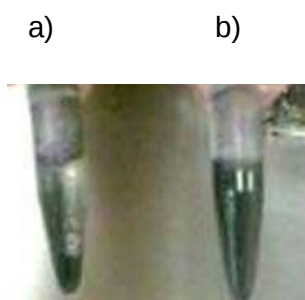


Figura 14. MWCNT a) sin funcionalizar y b) funcionalizados en solución acuosa

6.1.4 Construcción NASEc

Construcción de la nanopelícula funcionalizada con AE10 sobre los electrodos. En el desarrollo de este trabajo se probaron tres tipos de electrodos para modificarlos: de grafito 2 mm, latón 3 mm y oro 5 mm de diámetro. Los electrodos fueron modificados con WCNT-COOH y AE10 para formar la nanopelícula. El procedimiento general fue el siguiente:

6.1.4.1 Limpieza

Los electrodos de trabajo se limpiaron con acetona durante 10 minutos y mediante agitación por sonicación en un baño de agua, para quitar impurezas. Posteriormente se enjuagaron en agua bidestilada por 10 minutos y se secaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Este procedimiento se realizó para los electrodos de grafito, latón y para los de oro solo se limpiaron con acetona y agua.

6.1.4.2 Inmovilización del AE10-a WCNT-COOH a la superficie de los electrodos

Para realizar este procedimiento, primero se aplicó una capa delgada del adhesivo epoxi de plata **Figura 14 a)** 8331D (MG Chemicals) de (≥ 1 mm) sobre los electrodos, posteriormente se aplicaron y se fijaron los MWCNT-COOH⁻ **Figura 15** hasta cubrir la superficie con los NTC y formar un composite, en la Figura 15 d) se muestran los electrodos con MWCNT. Los electrodos se dejaron secar a temperatura ambiente. Para la inmovilización de los aptámeros se siguió el protocolo de Ocaña et al., 2012,

que consistió en aplicar 15 μL de la mezcla [15 μL (EDC 0.4 M) y 16 μL (NHS 0.1M) y 300 μL de AE10 (114 μM)] para la reacción del aptámero AE10 aminado con los nanotubos carboxilados mediante enlace covalente. Los electrodos se dejaron secar 24 H y posteriormente se recubrieron con mercaptoetanol para evitar uniones inespecíficas.

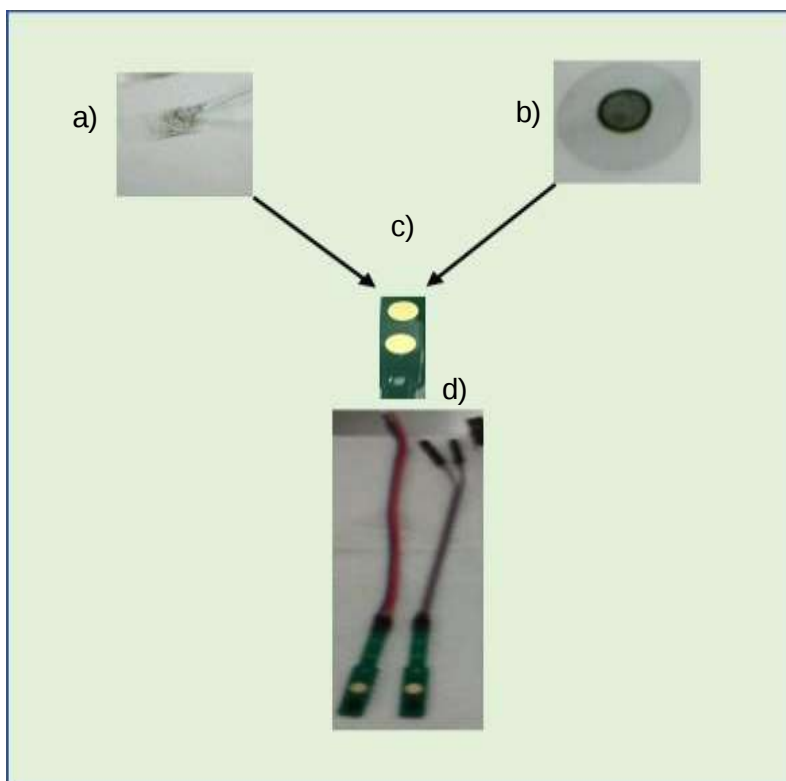


Figura 15. Epoxi de plata a) MWCNT b) electrodos de oro sin modificar c) electrodos de oro modificados d) electrodos para usarse.

6.1.4.3 Conexión del aptasensor al conductímetro comercial modelo H19811 para electrodos de oro y latón

Se prepararon dos juegos de electrodos (Au-Au) y (Au-NTC-AE10-MWCNT-AE10) **Figura 14 d)** y se acoplaron en un soporte de plástico y se posicionaron en paralelo a una distancia fija de 3 mm entre cada soporte y posteriormente se conectaron a un conductímetro Hanna Instruments multiparametric (H19811). En la **Figura 16** se muestra el conductímetro cerrado a) y el conductímetro abierto b) en este conductímetro la sonda se abrió y se conectaron los electrodos modificados (aptasensor), sustituyendo a los de carbono para realizar las mediciones de conductividad en presencia y ausencia de bacterias.

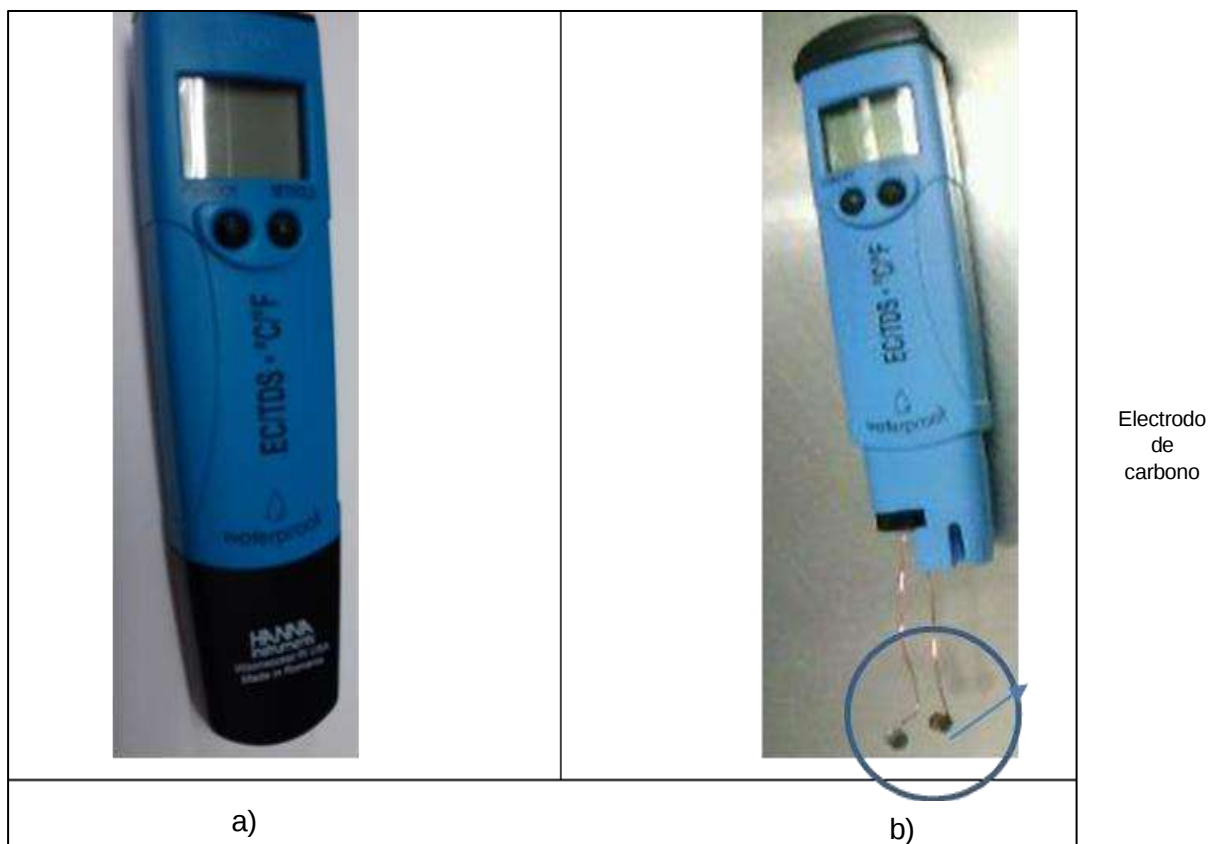


Figura 16. Conductímetro cerrado a), conductímetro abierto para ensamblar los nanoelectrodos modificados b).

6.1.5 Conservación y cultivo de la cepa de *E. coli*.

Para la conservación de la cepa de *E. coli* se utilizó viales con medio líquido de Soya y Trypticaseína (BD Bioxon™) en glicerol 10%, y tubos inclinados de agar del mismo medio como inóculo de trabajo, para propagar se usó cajas de agar del mismo medio, para cuantificar se usó el medio agar Eosina y Azul de Metileno (BD Bioxon).

6.1.6 Preparación del inóculo y diluciones

Para la preparación del inóculo; se partió de una colonia proveniente de un medio sólido de agar Soya y Trypticaseína; se propagó en matraces con medio líquido. Se incubó a 37 °C por 12 H con agitación a 150 rpm en una agitadora de laboratorio y se verificó la pureza de cada cultivo en cajas de Petri con medio Eosina y azul de metileno y con observación en el microscopio. Para la preparación de las diluciones, primero se tomó una alícuota de un volumen de 1 mL del medio de cultivo y se centrifugó a 12 000 g durante 15 minutos y se lavaron las bacterias para eliminar los componentes residuales del medio, se descartó el sobrenadante. El botón de bacterias se suspendió en 1 mL de agua destilada, este procedimiento se realizó dos veces. El botón de bacterias resultante se resuspendió en 1 mL de agua destilada

para medir la densidad óptica y ajustarla a ≥ 0.300 de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, para posteriormente tomar 0.5 mL de la suspensión y preparar una serie de 15 diluciones secuenciales 1:10 en botellas de dilución de 100 mL con una solución de KCl 2.5 mM estéril (120 °C, 15 min), se preparó por duplicado, para posteriormente medir la conductividad de cada dilución.

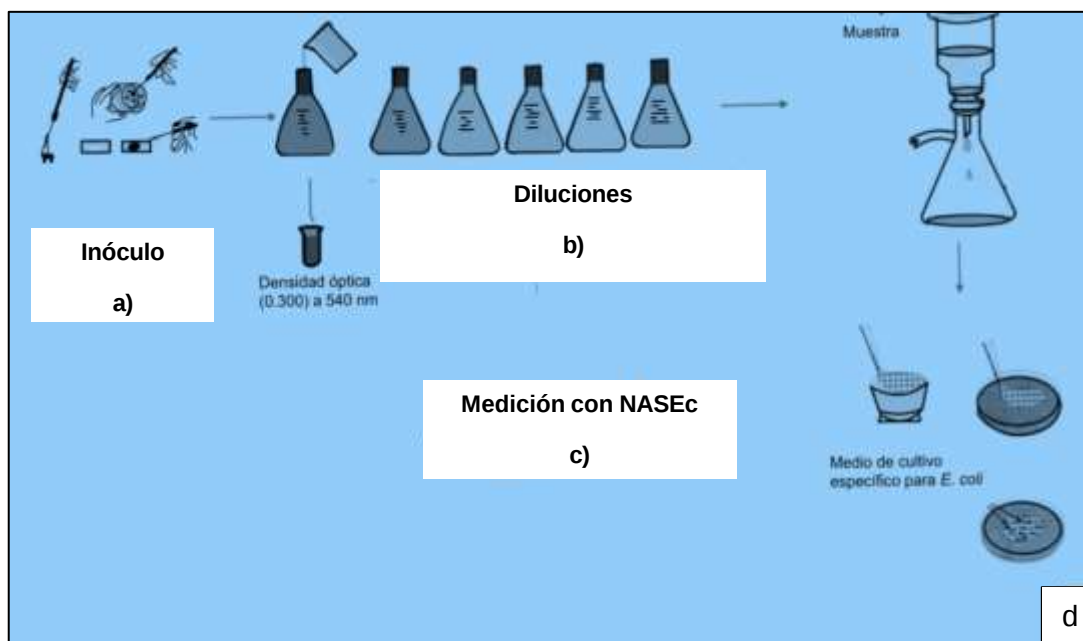


Figura 17. a) Inóculo preparado con cultivo de *E. coli* puro y b) diluciones para medir la UFC/100 mL, c) la conductividad con NASEc y caja de Petri con ENDO.

6.1.7 Determinación de *E. coli* por la técnica de filtración en membrana

Mediante la técnica de filtración en membrana se contaron las colonias crecidas en el medio agar Eosina y Azul de metileno de cada una de las diluciones como se muestra en la **Figura 17**. Posteriormente se cuantificó *E. coli* como unidades formadoras de colonias (UFC/100 mL) de acuerdo con (Lipps., *et al* 2022; NMX-AA-093-SCFI-2000; Rompré *et al.*, 2002).

6.1.8 Determinación de la presencia de *E. coli* con NASEc

Las diluciones de la suspensión de *E. coli* preparadas en la sección 6.1.2 se colocaron en un vaso de precipitados de 150 ml y se introdujo el NASEc en cada dilución durante tres minutos y se tomaron las lecturas por triplicado de los pares de electrodos (Au-Au y Au-Au) y (Au-CNT-A_{E10}- Au-CNT-A_{E10}). Los resultados se expresaron en $\mu\text{S}/\text{cm}$.



6.1.9 Caracterización Raman de las superficies del electrodo con y sin *E. coli*

La espectrometría Micro-Raman (Horiba Jobin Yvon, T64000), fue realizada a temperatura ambiente con 532,1 nm y 20 mW de potencia láser a la salida con objetivo 100 X. De igual manera, se realizaron diez acumulaciones de 1 minuto por espectro, en donde los espectros Raman se registraron al menos tres veces en tres puntos diferentes de la muestra, utilizando un microscopio confocal Olympus BX40 (Edison, NJ, EUA). Los espectros se calibraron utilizando las líneas de 521 cm^{-1} de silicón monocristalino.

6.1.10 Análisis SEM de los electrodos con *E. coli* y *S. marcescens*

Las micrografías de la superficie de Au sin AE_{10} y con NTC- AE_{10} , fueron analizadas después de estar en presencia de *E. coli* y *S. marcescens* (10^3 UFC/mL) con un microscopio, SEM Hitachi S-570. Para evaluar la viabilidad de las bacterias en los electrodos modificados y sin modificar, se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo y fueron cultivadas en medios selectivo Eosina y Azul de Metileno para *E. coli* y medio Agar Soya y Trypticaseína *S. marcescens* durante 48 H de incubación.

6.1.11 Caracterización AFM

La caracterización con AFM fue realizada a temperatura ambiente con un microscopio (Veeco Instruments Inc., USA) en modo *tapping*. La sonda de silicio dopado con antimonio tenía una frecuencia de resonancia de 37-382 kHz con una constante de resorte de 20-80 N/nm fue usado a una velocidad de escaneo de 0.4-0.7 Hz. Las imágenes de AFM fueron obtenidas manualmente en 45 min en promedio. El análisis fue realizado con un software NanoScope. Cada muestra fue analizada en 5 diferentes sitios sobre la superficie en dos diferentes series de medición.

6.1.12 Análisis estadístico

Para determinar la diferencia entre los tratamientos con y sin bacterias, se realizaron análisis de varianza y comparaciones de medias múltiples (Duncan y Tukey) a un nivel de significación (α) de 0,05. El análisis se realizó con Minitab 18.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Selección del material para los electrodos

Inicialmente, para la fabricación de los electrodos se seleccionaron diferentes materiales (cobre, titanio, óxido de titanio, hierro y grafito) y se modificaron con epóxido de plata y MWCNT, además de determinar la conductividad. Estos resultados se muestran en la Tabla 3. El electrodo de carbono modificado con MWCNT–Epoxi fue el que tuvo mayor conductividad (870 $\mu\text{S}/\text{cm}$), lo que permitió construir la nanoestructura con aptámeros altamente conductiva. Este fue el punto de partida para realizar los experimentos preliminares para la fabricación de la nanopelícula, uniendo los aptámeros por adsorción física para tener una nanopelícula que identifique a *E. coli* de forma específica.

Los electrodos contruidos y modificados con MWCNT-Epoxi, se dejaron durante 3 meses para determinar la estabilidad en agua; el más estable fue el de carbono modificado. Este electrodo no presentó desprendimiento de la película de MWCNT en la nanopelícula al estar en contacto con el agua. Lo que permitió la construcción del primer aptasensor, primero se seleccionaron los electrodos de carbono para modificarse. De acuerdo con la bibliografía, éstos se han utilizado para modificarlos con MWCNT y la construcción de biosensores en la detección de microorganismos (*E. coli*, *Salmonella tiphy*, *S. thyphimurion*), en alimentos y agua (Zelada–Guillen *et al.*, 2009, 2010; Kim *et al.*, 2016; Ozcan-Ariksoysal *et al.*, 2017), con bastante eficiencia. Por lo tanto, se procedió a construirlo y probarlo con *E. coli*.

Tabla 3. Conductividad en agua Milli-Q^R de diferentes electrodos modificados con MNTC y Epoxi de plata.

Material del electrodo	Electrodo sin modificar	Modificación con Epoxi	Modificación Epoxi + WMNTC
	$\mu\text{S}/\text{cm}$		
Hierro	660	630	380
Carbono	250	800	870
Titanio	350	310	210
cobre	270	250	230

7.2 Construcción de la nanopelícula con electrodos de carbono

Este primer aptasensor, se construyó con un electrodo de grafito e inmovilizado con una mezcla de Aptámero (A_{E1} , A_{E2} , y A_{E10}), como lo reportó Kim *et al.*, 2014. MWCNT sin funcionalizar, para probar la forma más simple de funcionalizar, el grafito se recubrió con epoxi de plata y se revistió con MWCNT. Para formar una nanocomposite, de acuerdo con material y métodos. Los aptámeros se inmovilizaron mediante adsorción física directa a los WCNT a través de interacciones débiles con los grupos carboxilo de los MWCNT.

La adsorción física entre el ssDNA y MWCNT es el método más simple de inmovilización entre ellos. Li, *et al.*, (2009), demostraron que el complejo formado entre WCNT-aptámero es altamente estable y que el ssDNA se enrolla al nanotubo haciendo una nanocomposite estable que puede durar meses.

La nanoestructura se puede utilizar para la fabricación de aptasensores para medir diferentes analitos, como lo reportó Ocaña (2012), en el diseño del aptasensor para trombina y en la construcción de genosensores para detectar microorganismos. Ozkan-Ariksoysal *et al.* (2017).

7.3 Construcción del aptasensor con electrodos de carbono

Los electrodos modificados se insertaron en un soporte de plástico y se conectaron al conductímetro comercial H19811 tal y como se muestra en la **Figura 18**. Los electrodos con la nanobiopelícula aparecen en la **Figura 19** y en la tabla 5 se muestran los resultados de las pruebas con diferentes soluciones modelo:

agua de la llave de la red de distribución (Iztapalapa, Ciudad de México), con y sin adición de *E. coli* con diferentes concentraciones.



Figura 18. Aptasensor con electrodos de grafito.



Figura 19. Medición de *E. coli* con los electrodos de grafito.

En un primer experimento, se analizó una suspensión bacteriana de 23×10^5 , UFC/mL, para evaluar, si las modificaciones a los electrodos con la nanopelícula con MWCNT y los AE₁₀ detectaban *E. coli*. En la tabla 4 se muestran los resultados de la



detección de *E. coli*, y se puede decir que, si hubo un cambio en la conductividad, producto de la presencia de *E. coli*. De cualquier modo, los valores de la conductividad de la muestra sin bacterias fueron de 270 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y con bacteria de 240 $\mu\text{S}/\text{cm}$ con aptámeros la diferencia fue de 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Por efecto de la presencia de bacterias, el aptasensor detectó *E. coli* en tiempo real como se muestra en la **Figura 19**, después de la medición se analizó la superficie nanoestructura mediante microscopio SEM, las micrografías se muestran en la **Figura 20**, en a) un electrodo limpio de grafito, en la b) se presenta los MWCNT y *E. coli* adsorbida sobre la película de MWCNT-AE₁₀, la c) se presenta un acercamiento de *E. coli*. Estos resultados confirman que esta nanoestructura detecta *E. coli*, debido a los aptámeros específicos usados como elemento de reconocimiento, como lo reportó Kim *et al.*, 2013 y 2014. El experimento se realizó con una muestra de agua potable de Iztapalapa, que tiene una alta conductividad (1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$) y alta concentración de Fe y Mg (Mazari-Iriat., *et al.*, 1998) y aun bajo estas condiciones de alta conductividad los electrodos modificados detectaron un cambio de conductividad electrolítica por la presencia de *E. coli*, lo que indica que los aptámeros siguen teniendo la capacidad de reconocer a *E. coli* aún en presencia de estas sales. Aunque en la literatura se reporta que existe métodos como el de PCR, los cuales son muy sensibles a estas sales, y se requiere un pretratamiento de la muestra de agua antes de analizarla. Por otro lado, AE (1,2 y 10), Kim *et al.* (2013) y Kim. *et al.* (2014), reportaron que estos aptámeros presentan una alta afinidad por *E. coli* en concentración nM, (E1: 12.4, E2: 25, y E10: 14.2 nM) y se unen a diferentes sitios de la membrana externa. Kim *et al.* (2014), como lo demostraron al realizar un experimento con aptámeros E1, E2 y E10 marcados con diferentes sondas QDs. Wu *et al.* (2017) reportaron la fabricación de un aptasensor para *E. coli* usando el aptámero E2 obtenido por Kim *et al.* (2014) para detectar *E. coli* en agua, obteniendo muy buenos resultados.

Con este primer prototipo podemos concluir que existe un cambio en la conductividad producto de la captura de *E. coli* por los aptámeros específicos utilizados de acuerdo con la literatura (Kim *et al.*, 2013), como se pudo observar en las micrografías realizadas del sustrato después de haber medido *E. coli* (**Figura 20**). Sin embargo, la fragilidad del grafito y la poca adherencia de los MWCNT sobre el electrodo fueron un factor determinante para buscar otros electrodos que permitieran una mejor adhesión entre los MWCNT y el electrodo.



Hay que destacar que el uso de la adsorción física del aptámero a la superficie nanoestructurada del electrodo de carbono tiene las desventajas de una posible desorción del aptámero de la superficie o la degradación de los aptámeros por estar expuestos a las nucleasas al estar libres los extremos 3' y 5'. Otra desventaja puede ser la adsorción inespecífica en la superficie del electrodo por parte de la molécula blanco.

Zelada-Guillen *et al.*, 2012, construyó diferentes aptasensores para detectar diferentes microorganismos, incluyendo *E. coli*, mediante la inmovilización del aptámero a los NTC, por la técnica de adsorción física y por la técnica de enlace covalente, y comparó la respuesta obtenida, una diferencia de hasta cinco veces más sensibilidad en los aptasensores donde se utilizó la inmovilización química en comparación a la adsorción física, por lo que se decidió cambiar el método de inmovilización del aptámero para siguientes experimentos. Con este prototipo, se logró tener una nanoestructura que detecte *E. coli* y el método de la conductividad como respuesta a medir. Sin embargo, se decidió construir la nanomembrana con el método de bioconjugación por enlace covalente para aumentar la sensibilidad, como lo reportó Zelada-Guillen *et al.* (2012), para la construcción de un aptasensor para *E. coli*.

Tabla 4. Detección de *E. coli* mediante electrodos de grafito modificados con NTC y AE10

Electrodo		Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
	Agua de la llave (Iztapalapa)	Agua de la llave + <i>E. coli</i> 23×10^7 UFC/100 mL
Grafito + NTC+ epoxi	333	310
Grafito + NTC + AE10 + epoxi	270	240

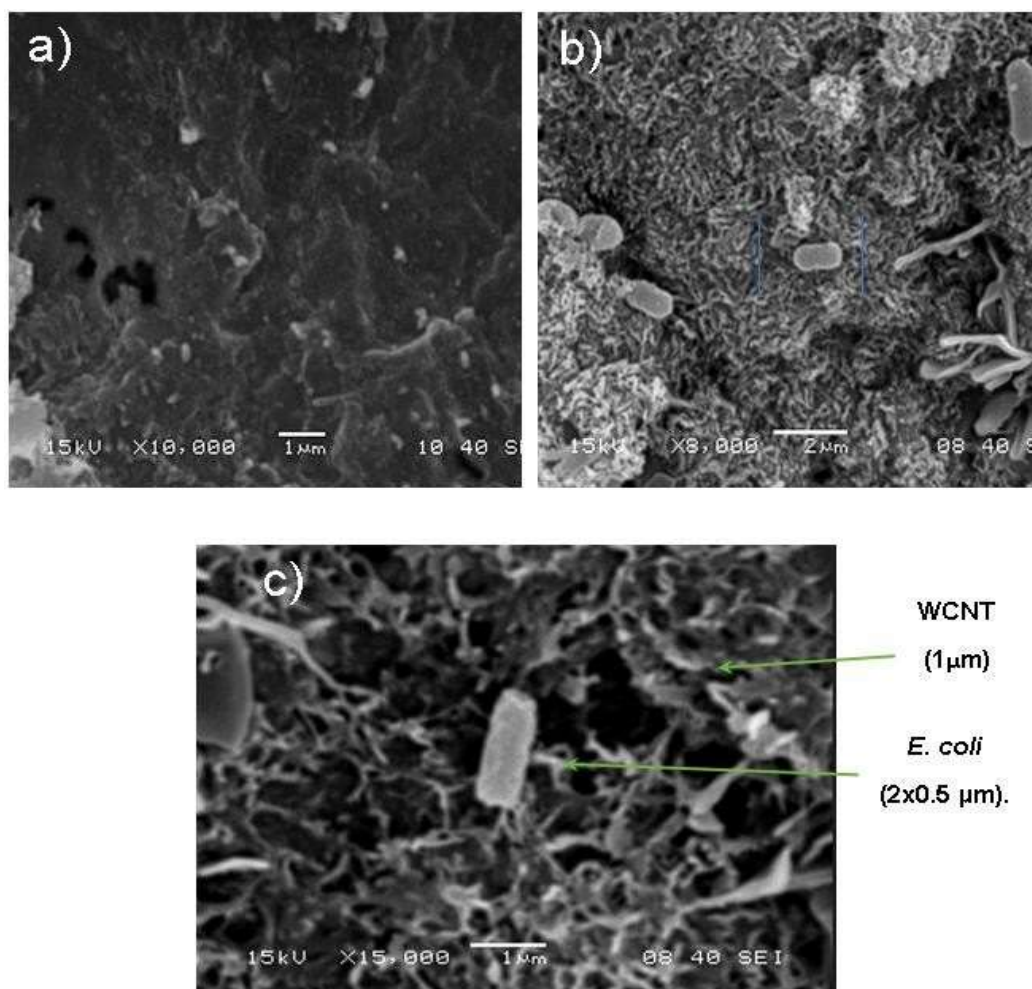


Figura 20. Micrografía de sustrato (grafito) sin *E. coli* (a), la superficie del electrodo de grafito con MWCNT y aptámeros con algunas células de *E. coli* (b) y un acercamiento de *E. coli* 10^{-3}

7.4 Prototipo de aptasensor con electros de latón

El segundo prototipo que se construyó fue con electrodos de latón, el cual podemos observar en la **Figura 21**. En la imagen a) se presenta el electrodo de 3 mm de diámetro, b) el electrodo modificado con MWCNT-COOH y AE₁₀ y otro electrodo sin AE₁₀, y c) los electrodos ensamblados en el soporte de acrílico colocados a 3 mm de separación. Para la selección de estos electrodos se realizaron los siguientes criterios: Sus propiedades conductivas, su costo y la facilidad para construir la nanopelícula sobre el electrodo de latón. Además, se probó la adhesión del epóxi de plata al latón y al MWCNT, formando un composite resistente al agua durante un

mes. Para la construcción del aptasensor se siguieron los siguientes pasos:

7.4.1 Modificación

Limpieza de los electrodos de latón con acetona y agua químicamente pura como se indicó en materiales y métodos. La construcción de la nanobiopelícula se realizó con el epoxi de plata y los WCNT previamente carboxilatos (Evtugyn *et al.*, 2008) como se describió en material y métodos. Para este experimento se utilizó el aptámero A_{E10} modificado en el extremo 3' con un grupo funcional NH_3 , como lo reportó Zelada-Guillén 2009, para construir un aptasensor para *Salmonella typhi*. Para inmovilizar el aptámero aminado a los WCNT-COOH con enlace covalente, se realizó la reacción con EDC y NHS para formar un éster parcialmente estable que permitiera que el aptámero aminado se uniera al grupo carboxilo. El procedimiento se detalla en material y método, ahí se presenta la reacción de inmovilización de los WCNT- COOH y A_{E10} aminado, de acuerdo con Téllez Plancarte (2019).

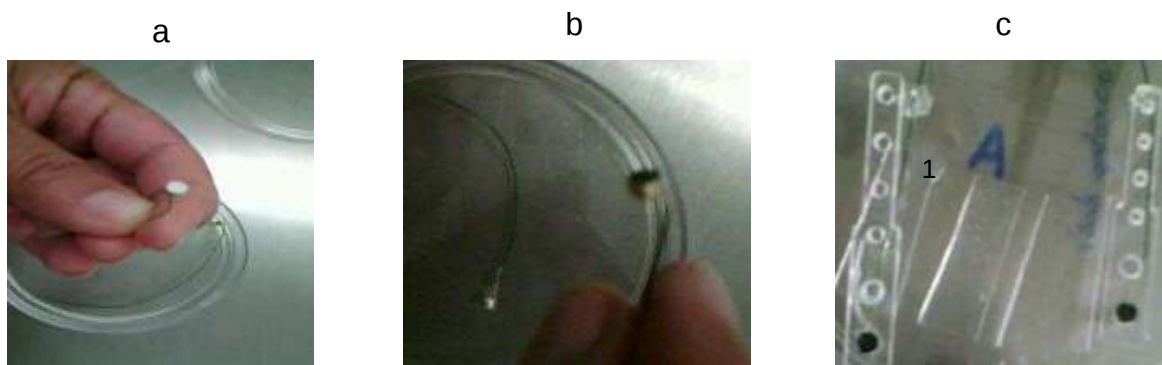


Figura 21. Electrodo de latón: a) electrodo de 3 mm de diámetro b) electrodos soportes de acrílico.

La formación de la nanobiopelícula Se evalúa mediante la técnica de espectrometría aman, UV, SEM y AFM y la unión del aptámero y MWCNT, así como la selectividad de la nanopelícula y la modificación de MWNTC.

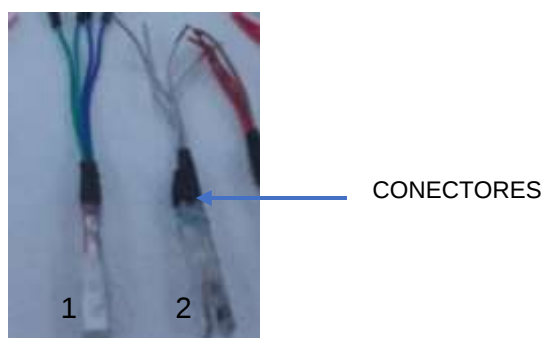


Figura 22. Electrodo modificado de latón (1 y 2) con MNTC y A_{E10} , ensamblados



en soportes de acrílico en paralelo a una distancia de 3 mm, listos para conectarse al conductímetro.

7.4.2 Detección de *E. coli* mediante el aptasensor con electrodo de latón

Los electrodos de latón modificados con MWCNT-Epoxi de plata-AE₁₀, se muestran en la **Figura 21 y 22**. En la micrografía, **Figura 23**, se observa una superficie irregular de los MWCNT modificados con los aptámeros. En ella los aptámeros están cubriendo los MWCNT. Se han reportado resultados de algunas micrografías donde se muestran los nanotubos de carbono multipared y DNA inmovilizado, como en el trabajo de Ozkan-Ariksoysal *et al.*, 2017 y se observa similitud con la micrografía de la **Figura 23** donde aparecen nanotubos multipared cubiertos de ssDNA. Posteriormente se evaluó la nanopelícula construida por espectrometría Raman y por AFM. Los electrodos modificados de latón se utilizaron para formar el aptasensor y medir la presencia de *E. coli*, en solución de NaCl 2.5 mM como electrolito.

Es importante señalar que los MWCNT en el aptasensor son parte del transductor, los cuales pueden actuar físicamente boqueando la superficie y como soporte para inmovilizar los aptámeros (AE₁₀). Esto es parte del principio del aptasensor; que permitirá explicar el efecto de las bacterias inmovilizadas sobre la disminución de la conductividad medida en el experimento.

En este experimento, se midió primero el control negativo (NaCl 2.5 mM y cero UFC/mL), al medir la conductividad con el conductímetro y el aptasensor. Se obtuvo un valor CE₁ de 191.67 $\mu\text{S/cm}$ y CE₂ de 397.67 con bacterias y la diferencia entre CE₁ - CE₂ fue de 206 $\mu\text{S/cm}$. Este valor de ΔC , se utilizó para determinar la presencia o ausencia de *E. coli* en las muestras (tabla 5). Se midió la EC1 y EC2 para 1 UFC/100 y se obtuvo un valor de $\Delta C = 11.67 \mu\text{S/cm}$, y para la muestra de 64 UFC/100mL el valor de para un valor más alto de UFC/100mL del orden de 10^3 se obtuvo un $\Delta C = 17.33 \mu\text{S/cm}$. Los resultados muestran en la tabla 7 y **Figura 24**, que *E. coli* se determinó en tiempo real con este aptasensor y se midió la presencia de *E. coli* por la disminución del valor de ΔC para 1 y 64 UFC/100 mL.

Posteriormente al aptasensor con electrodos de latón, se le midió la estabilidad en agua potable durante tres meses y se observó que hay una reacción de coloración verde en la superficie del electrodo (los resultados no se muestran). Esta reacción puede deberse a la presencia de plata del epoxi que reacciona con el cobre del latón

oxídandolo. Por otra parte, la corrosión del latón en presencia de humedad, cloruros, amoníaco, acetatos y ácidos débiles es una desventaja para la fabricación del aptasensor con electrodos de latón porque influye en la estabilidad y durabilidad de los electrodos, razón por la cual no se utilizaron los electrodos de latón. Es importante señalar que con los experimentos anteriores se estableció el principio del aptasensor, el cual se explicará con detalle en el prototipo de oro, la construcción de la nanopelícula en electrodos de oro y la calibración.

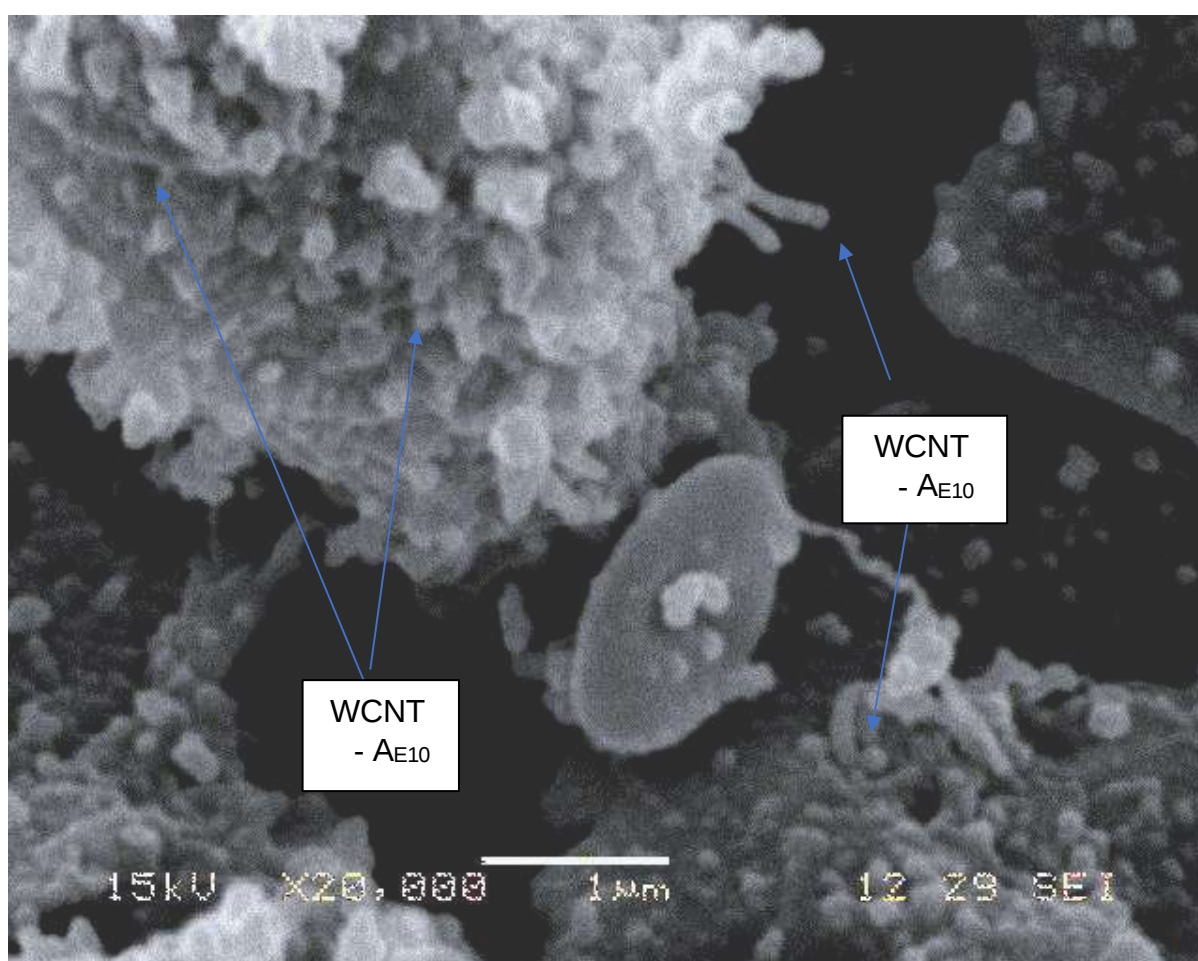


Figura 23. Micrografía SEM de electrodo de latón con MWCNT carboxilado con Epoxi de plata y AE10.

Tabla 5. Detección de *E. coli* mediante electrodos de latón modificados con MWCNT y A_{E10} (aptámero sin modificar).

UFC/100 mL	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)			
	CE ₁	CE ₂	ΔC	ΔCL (NaCl 0.001 M – ΔC (suspensión bacteriana))
0.001M NaCl	191.67	397.67	206	0
1	186.33	404.33	218	12
64	187.33	405	217.67	11.67
8 X10 ³	191.33	414.67	223.3	17.33

CE₁= Electrodo de metal, CE₂= Electrodo modificado NTC- aptámero, ΔC = CE₂-CE₁

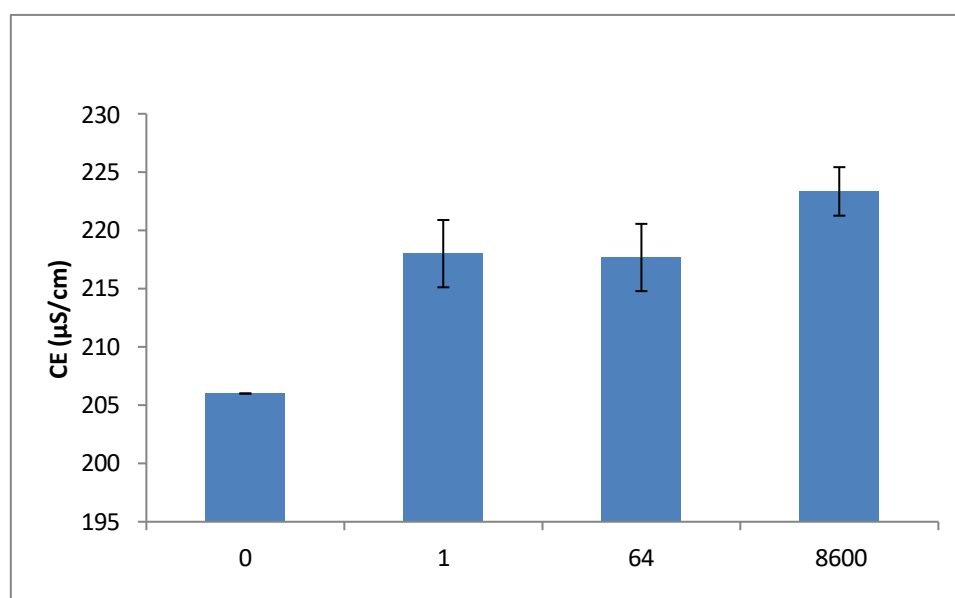


Figura 24. Detección de *E. coli* con el aptasensor a bajas concentraciones (1 UFC/100 mL) y altas (8600 UFC/100 mL) en NaCl 2.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ con electrodos de latón modificados MNTC-COOH y AE10.

7.4.3 Análisis de la nanobiopelícula del aptasensor por AFM

La nanobiopelícula formada con A_{E10} y MWCNT se analizó por AFM, realizando un barrido sobre la superficie (500 nm) para determinar el diámetro del WCNT

desprovisto de A_{E10} de $(40.43 \pm 6.3 \text{ nm})$ y con A_{E10} un diámetro de $(62.52 \pm 8.10 \text{ nm})$. La **Figura 25** presenta las imágenes: a, b y c, correspondientes a la muestra de MWCNT sin A_{E10} , y las imágenes d, e y f para MWCNT funcionalizados. En la **Figura 25** se presenta el análisis de la sección transversal (b y e) y una vista 3D (c y f) de la muestra sin y con A_{E10} . El aumento del diámetro del MWCNT por presencia de los aptámeros confirma la formación exitosa de la nanobiopelícula formada por A_{E10} -MWCNT, esta técnica se ha utilizado por Wu *et al.*, 2017, para evaluar la modificación en la construcción de un aptasensor con grafeno modificado con aptámeros para detectar *E. coli*. Si bien se aplicó la técnica de AFM para evaluar la modificación de la superficie con aptámeros, no se pudo emplear para identificar la presencia de *E. coli* en la superficie, después de que se usó con muestras de *E. coli*, como sí lo describen, So *et al.*, 2008, quienes reportaron resultados del análisis por AFM al fabricar un nonoaptasensor con nanotubos de carbono de pared sencilla, los cuales fueron previamente funcionalizados e inmovilizados con un aptámero específico para *E. coli*, obteniendo el análisis de la superficie por AFM. La técnica anterior puede aplicarse para detectar *E. coli* en la superficie, pero existe el problema de contaminación del equipo, por lo que se requiere aplicar modificaciones en la metodología que se utiliza para determinar microorganismos por AFM, lo cual no se hizo en este estudio. Sin embargo, en este trabajo se aplicaron otras técnicas como: Espectrometría Raman y SEM para comprobar la presencia de *E. coli*, más adelante en la sección de prototipo con electrodos de oro se presentan los resultados.

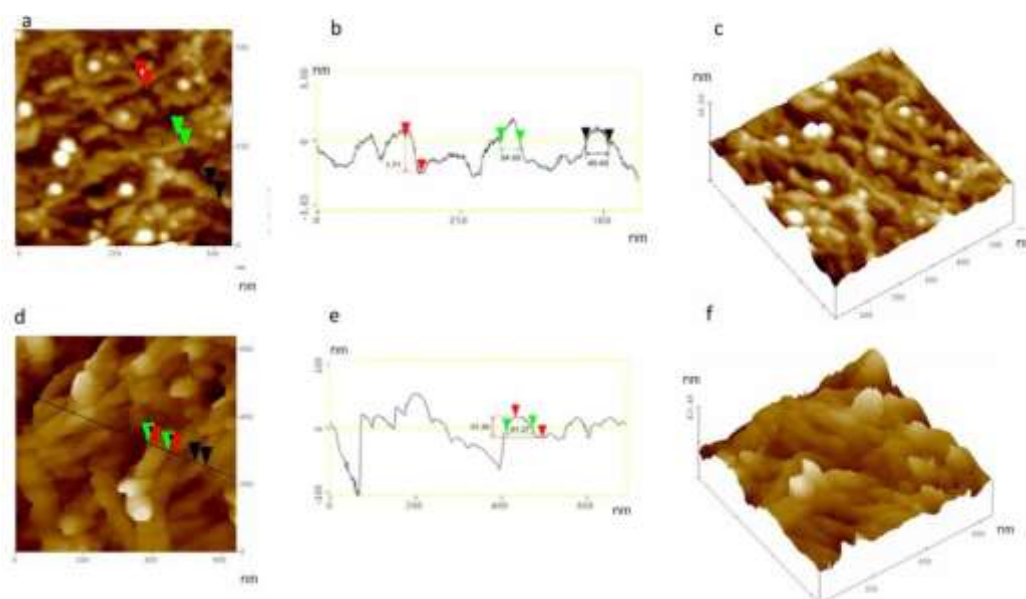


Figura 25. Imágenes de alta resolución de AFM, muestran WCNT antes (a, b, c) y después de modificar con A_{E10} (d, e y f). En la parte superior se presentan imágenes de (a y d) sección transversal (b y e) y vista 3D (c y F).

7.4.4 Determinación de la cantidad máxima de AE10 que puede saturar los MWCNT-COOH

Para conocer la cantidad máxima de AE10 que puede unirse a MNTC-COOH mediante reacción de acoplamiento, se realizó un experimento donde se prepararon muestras con diferentes concentraciones de AE10 (1.5, 5, 10, 15, 70, 150 µg/ml), 1.5 mg de MWNTC-COOH, concentración fija y los reactivos de acoplamiento, EDC (0.4 M) y NHS (0.1 M), aforados a 1 ml. Después de mezclar por sonicación, la muestra se dejó en reposo durante 12 h a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugó para separar. Se tomó 1 µL del líquido sobrenadante y se midió en el Nanodrop la concentración ([AE10]*), utilizando el factor de conversión de 1 OD₂₆₀ nm = 33 µg/mL para ssDNA (Maniatis, F. & Sambrook, 1985). La diferencia entre la concentración inicial ([AE10]₀) y la concentración de equilibrio [AE10]* dividida por la concentración de NTC da Q, la AE10 unida a la MWCNT-COOH, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Q = ([AE10]_0 - [AE10]^*) / [CNT] = Q_{\max} \cdot [AE10]^* / (K_b + [AE10]^*) \quad (2)$$

Donde: Q_{max} es la cantidad máxima de AE10, que puede unirse al MWCNT en una monocapa (µg/mg) y K_b la constante de afinidad para los sitios de unión, indicando la concentración AE10 que produce 1/2 · Q_{max}, **Figura 26**.

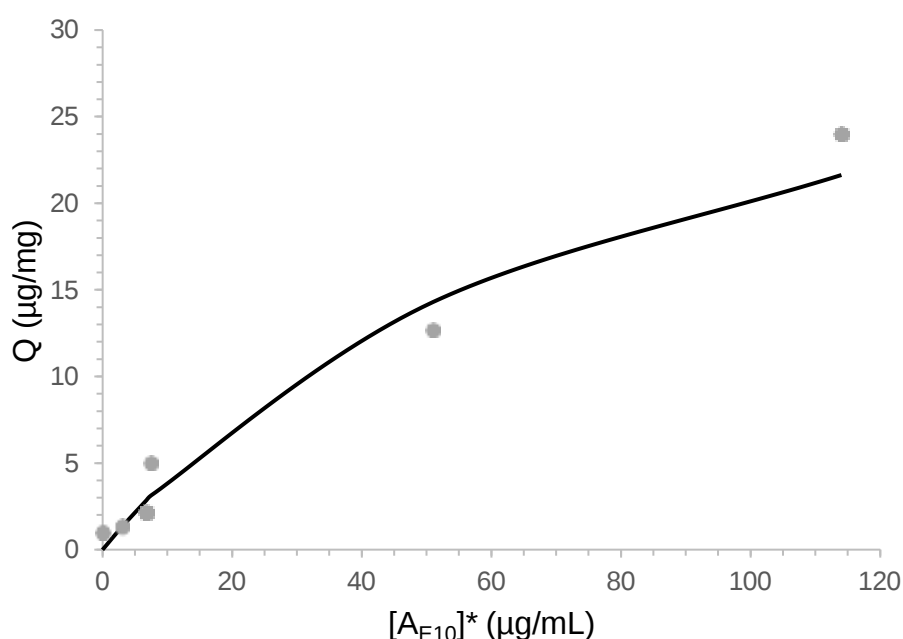


Figura 26. Adsorción AE10 en NTC con Q_{max} = 37 µg.mg⁻¹ y K_b = 81 µg mL⁻¹.

7.4.5 Análisis por espectrometría Raman de la biopelícula formada por los MWCNT-COOH-AE10

En este experimento se realizó la reacción de inmovilización *in vitro* en microtubos de 2.5 mL, donde se colocó 1 mg/mL de los MWCNT-COOH, los reactivos de acoplamiento NHS (0.4 M), EDAC (0.1 M) y concentraciones variables de AE10. Como se indica en material y métodos, se realizaron las reacciones y se analizaron por espectrometría Raman. En la **Figura 27** se presenta el espectro típico Raman de la bioconjugación del aptámero AE10 y MWCNT-COOH (b y c), concentraciones de baja y alta respectivamente de aptámero y se compararon con los espectros de los nanotubos carboxilados (MWCNT-COOH) y sin funcionalizar con AE10 (a). Los espectros Raman obtenidos para la nonopelícula de WCNT sin (a) y con 14 µg/mL y 139 µg/mL de AE10, presentan diferente intensidad entre los picos D y G, que se utilizaron para monitorear el proceso de modificación de MWCNT.

Se pudo observar que la intensidad entre los picos D y G cambia en función de la modificación de AE10 (ver **Figura.27**); pero la posición de los picos D y G es la misma como se expone en los espectros de la **Figura 27**. En esta Figura se presentan los tres espectros donde aparecen dos bandas intensas a 1342 y 1577 cm⁻¹.

Las cuales se llaman las bandas D y G respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados por Li *et al.*, 2009 para MWCNT-DNA, donde estos autores reportan la banda G en aproximadamente 1580 cm⁻¹.

La banda D está vinculada a los defectos e impurezas en la estructura de la pared del CNT, los cuales se deben a los planos grafíticos y otras formas de carbono, como anillos y defectos en las paredes de nanotubos, formando pares, heptágono-pentágono, torceduras y heteroátomos, defectos que se forman en la síntesis de los MWCNT (Datsyuk *et al.*, 2008). La banda G se atribuye a la vibración de C-C longitudinal de las capas de grafito y es un indicador del grado de grafitización ordenada de MWCNT (Le *et al.*, 2013). La banda observada cerca de 250 cm⁻¹ está vinculada al diámetro de las MWCNT. El AE10 está unido químicamente a la superficie de las MWCNT carboxilados por los enlaces formados entre los grupos COOH de la superficie de MWCNT y los grupos amino en uno de los extremos de los aptámeros modificados. En los espectros que se presentan en la **Figura 27**. (AE10) no se observa ningún pico del aptámero por sí solo, probablemente debido a una concentración muy pequeña.

Ozcan-Ariksoysal *et al.* (2017), identificaron picos característicos en 1300 y 1600 cm⁻¹

¹ en el análisis Raman de la superficie de un nanosensor modificado con MWCNT y DNA, estos valores están ligeramente desplazados.

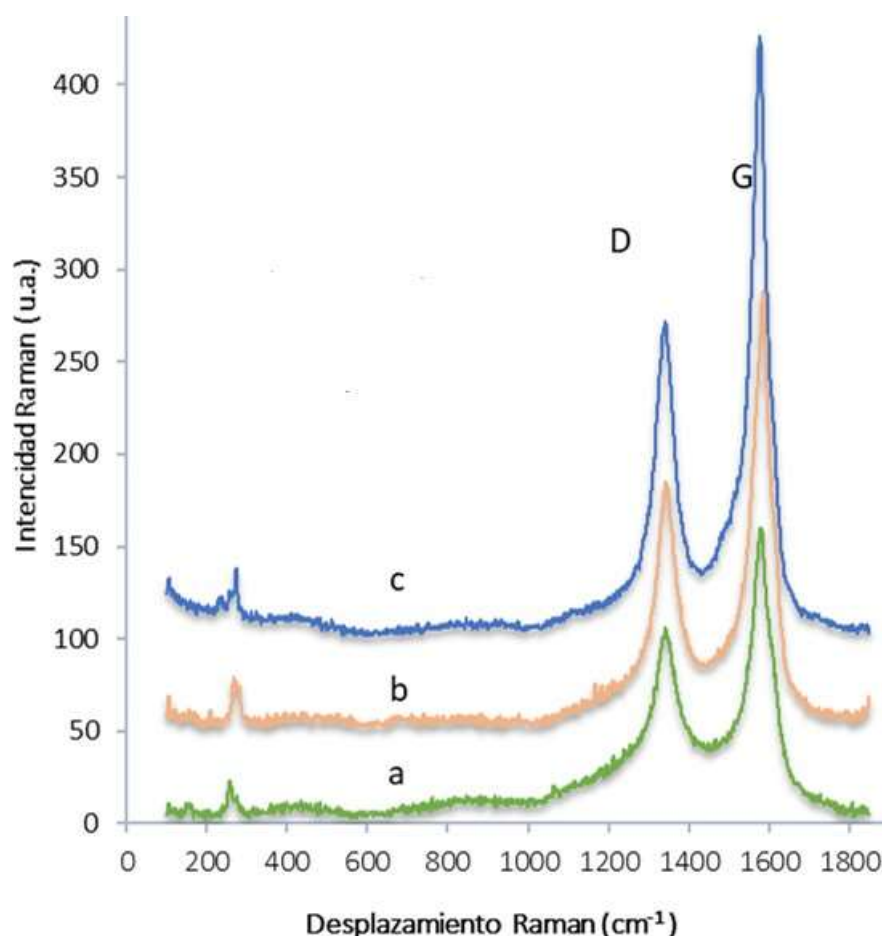


Figura 27. Espectro Raman de las muestras CNT: sin aptámero (a) y después de modificado por 14 $\mu\text{g/mL}$ (b) y 139 $\mu\text{g/mL}$ de A_{E10} . Picos Raman característicos de CNT multi pared 1342 cm^{-1} (D) y 1577 cm^{-1} (G).

La relación entre la intensidad de los picos G / D se representa en la **Figura 28**. Diversos autores proponen la relación de las bandas D y G (G/D) para caracterizar el grado de desorden estructural de las moléculas analizadas (Boyer *et al.*,2010). Este parámetro se utiliza para conocer la eficiencia de la modificación, **Figura 28**. Estos cambios en la intensidad de los picos con y sin aptámeros nos indican que la matriz de MWCNT con aptámeros forma una amplia red en la cual la *E. coli* puede inmovilizarse, debido a la gran cantidad de puntos de unión en los MWCNT modificados. Una de las ventajas de usar los MWCNT para la fabricación de aptasensores es la alta relación superficie y diámetro.

Esta relación permite tener un biosensor miniaturizado como lo señalado por (Kurup *et al.*, 2021) al fabricar un aptasensor.

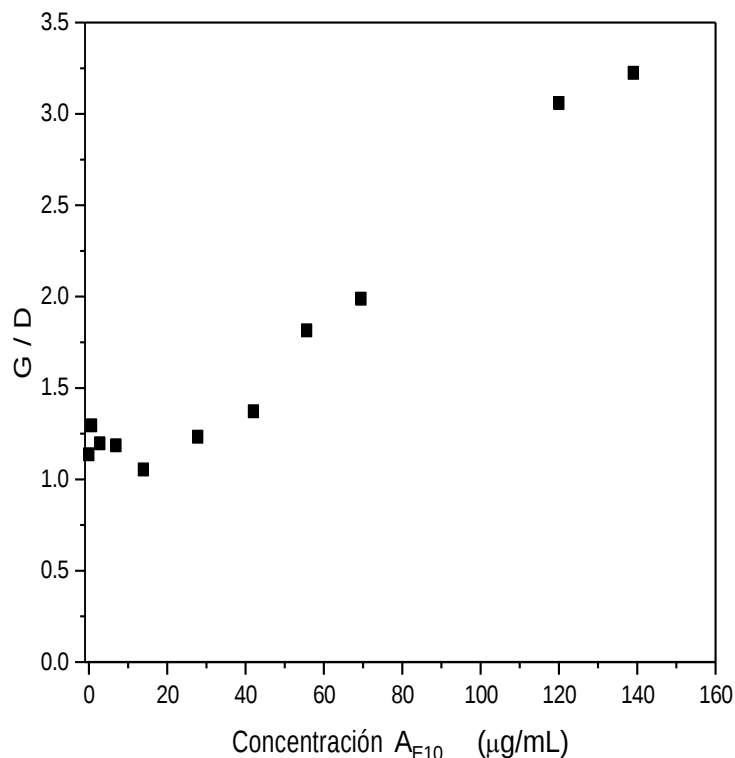


Figura 28. Variación de la intensidad relativa (G/D) en función de la concentración del A_{E10} .

7.4.6 Determinar la viabilidad de la nanopelícula del aptasensor para detectar *E. coli*

La nanopelícula construida e inmovilizada en láminas de oro, sin A_{E10} (control) y con aptámero MWCNT- A_{E10} . Como se muestra en la **Figura 29 a)**. Los electrodos se pusieron en contacto con suspensión de *E. coli* (10^3 UFC/mL) posteriormente, se lavaron con agua Milli-Q estéril para eliminar las bacterias de la superficie, como se observa en la **Figura 29 b)**. Después de lavarlos, los electrodos se incubaron 48 H en cajas de Petri con medio selectivo para *E. coli* (Eosina y Azul de Metileno). **Figura. 30.** Los resultados del crecimiento después de la incubación fueron los siguientes: se colocó el electrodo de Au-MWCNT a) sin aptámero, no hubo crecimiento típico de *E. coli*, mientras que en el medio donde se inoculó el electrodo Au-MWCNT- A_{E10} , con aptámero, si presentó un crecimiento de colonias verde brillante típicas de *E. coli* b), estas bacterias que están atrapadas por aptámero crecieron en el medio

selectivo y se analizaron posteriormente por SEM y espectrometría Raman. Este resultado nos indica que las bacterias que crecieron están viables, pueden reproducirse y que la biomembrana detecta células vivas. Resultados semejantes reportó Zelada-Guillen (2011) en la construcción del aptasensor para *Salmonella tify*.

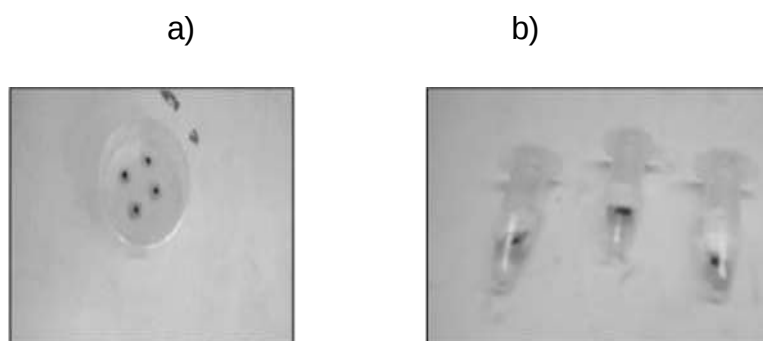


Figura 29. a) Electrodos de oro con NTC y NTC-A_{E10} y b) electrodos con agua estéril



Figura 30. Electrodo de oro con NTC-sin A_{E10} a) y Electrodo de oro con NTC-con A_{E10}

7.4.7 Selectividad de la nanobiopelícula por *E. coli*

Se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) para confirmar la adhesión de *E. coli* al aptámero de la nanobiopelícula. La **Figura 31**, a, b y c, muestra un conjunto de micrografías SEM de la superficie MWCNT-A_{E10} en presencia de *E. coli*, obtenidas con diferentes aumentos, ya que el sensor estuvo expuesto a una concentración bacteriana muy alta: 1×10^3 UFC/100 ml. La superficie de la nanobiopelícula se encuentra saturada, formando una película de bacterias muy compacta que se extiende por toda la superficie del sensor (**Figura 31 c**). El análisis SEM permitió examinar la bionanoestructura (**Figura 29**) modificada (MWCNT) sin aptámero.



En primer lugar, en la **Figura 31** a, se puede ver la distribución de MWCNT-A_{E10} en la superficie del electrodo y casi toda la superficie del electrodo está uniforme y completamente cubierta por MWCNT característicos y modificados con A_{E10} que fue demostrado en la sección de análisis Raman. Este punto es muy importante, ya que MWCNT-A_{E10} está bien distribuido y compacto, proporcionando una nanocapa para la interacción más eficiente para *E. coli* con la superficie modificada teniendo mayor superficie de contacto para la bacteria y con ello aumentar la sensibilidad del aptasensor.

La micrografía de alta resolución permite la identificación de bacterias individuales MNTC-A_{E10} y *E. coli* (de 1,5 μm a 2 μm de diámetro) en la superficie de la muestra (García-Aljaro *et al.*, 2010; Upadhyayula *et al.*, 2009) en la micrografía 29 a) se observa la presencia de MWCNT sin evidencia de *E. coli* en la superficie indicando que la bacteria no queda atrapada en los MWCNT, mientras que en la micrografía b) y c) hay evidencia de la presencia de *E. coli* en la superficie donde se encuentra modificada con MWCNT-A_{E10}, mostrando que la presencia de *E. coli* se debe a que el aptámero reconoce en la superficie a *E. coli* y se une a ella para inmovilizarla.

Esto indica que la presencia de *E. coli* no es por efecto de adhesión física a la superficie únicamente sino es el producto de una interacción con algún componente de la membrana como podrían ser la proteína de la superficie de la célula de *E. coli* como lo indicó el grupo de Kim *et al.* (2013) al utilizar aptámero marcado con fluorescencia para determinar su afinidad mediante la cuantificación de la señal fluorescente en imágenes de microscopio de fluorescencia. El aptámero E10 que fue seleccionado por el método SELEX, para *E. coli*, de acuerdo con Kim *et al.* (2014) esté aptámero presenta alta sensibilidad a nivel de picomoles y especificidad por diferentes cepas de *E. coli*, pero no se une a otras enterobacterias, como se demostró más adelantes mediante el análisis SEM, donde corroboramos la afinidad y especificidad de la nanobiopelícula por *E. coli*, utilizando como control negativo a *S. marcescens*, que es una enterobacteria, alejada filogenéticamente de *E. coli* pero se encuentra en el medioambiente. Los resultados se muestran en las micrografías de SEM que aparecen en la **Figura 31**, donde se muestra que en los electrodos que tienen inmovilizados el A_{E10} se encuentra atrapadas *E. coli*.



Aun después de lavar los electros con agua Milli-Q para analizar por SEM, mientras que los electrodos que se pusieron en contacto con *S. marcescens* no retuvieron en la matriz nanoestructurada MWCNT-AE₁₀ a la bacteria. Esto se debe a la especificidad de los aptámeros por *E. coli*, lo que no ocurre con otras enterobacterias como *S. marcescens*. De acuerdo con lo reportado por Kin *et al.*, 2014, el aptámero E10, tiene afinidad para *E. coli* (KCTC 2571) pero no para *Klebsiella pneumoniae* (KCTC 2208), *Citrobacter freundii* (KCTC 2006), *Enterobacter aerogenes* (KCTC 2190), y *Staphylococcus epidermidis* (KCTC 1917).

Este grupo de aptámeros reportados por Kim *et al.*, 2013 entre ellos (E10) son una herramienta para la construcción de aptásensores para monitoreo de agua contaminada o muestras de alimentos. La especificidad que presentan los aptámeros los hace una valiosísima alternativa a los anticuerpos que presentan una serie de desventajas como la de no ser reusables y ser más costosos entre otros.

Los electrodos modificados con MWCNT-AE₁₀ inmovilizados por enlace covalente, han sido usados para detectar bacterias como *E. coli* CECT 675 (Zelada-Guillén *et al.*, 2010), *S. typhi* (Zelada-Guillén *et al.*, 2009), en muestras de alimentos. Sin embargo, esta tecnología ha sido muy poco utilizada para fabricar biosensores y detectar *E. coli* en agua potable (Van Dorst *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2017).

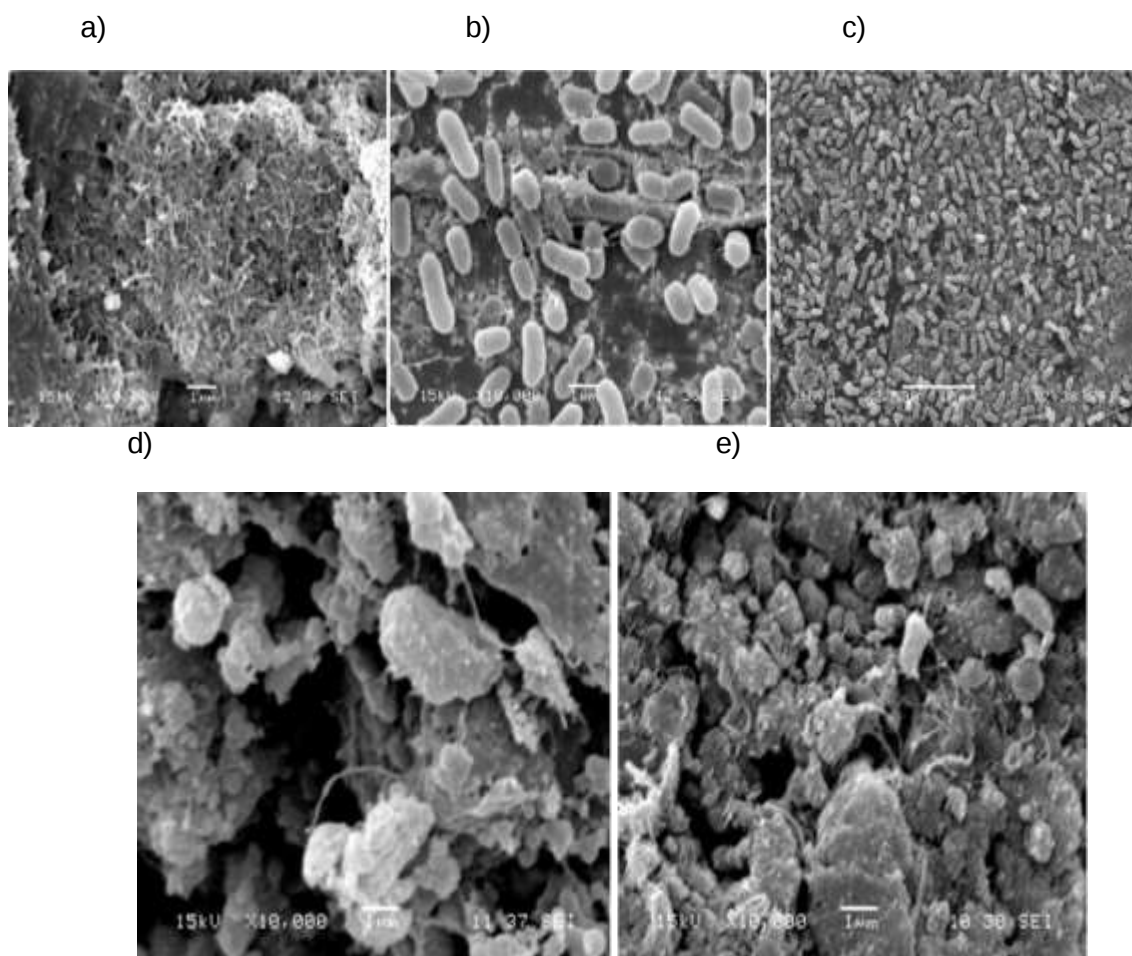


Figura 31. Micrografías SEM de electrodos de oro modificados con MWCNT sin aptámero expuestos a *E. coli* a) y d) a *S. marcescens*. Electrodo de oro modificado con MWCNT- funcionalizados con A (E10) en presencia de *E. coli* b), c) y e) en presencia de *S. marcescens*.

7.5 Prototipo con electros de oro

7.5.1 Principio del aptasensor

Con las modificaciones y adaptaciones al diseño del prototipo de aptasensor con electrodos de latón, se construyó un tercer prototipo con electrodos de oro, con lo cual se pretendía tener un aptasensor con alta sensibilidad, estabilidad de la biopelícula y durabilidad del electrodo modificado, así como construir un aptasensor de medición más sensible que permitiera detectar los cambios de concentraciones de *E. coli* de una UFC/100mL, considerando que las normas internacionales para agua potable son de cero UFC/100, (NOM -127- SSA1-2021; US Environmental Agency, 1990; Ministère de la Santé, 1996; World Health Organisation, 1994). Se construyó una biopelícula en la superficie del sensor altamente sensible, con afinidad por *E. coli*, llamando a este nuevo aptasensor NASEc (nanoaptasensor para *E. coli*).



La construcción se muestra en el esquema **Figura 32**, que se describe a continuación: Como primer paso se modificaron los electrodos de oro con MWCNT y AE10, siguiendo el protocolo para el electrodo de latón sección 4.3 en la **Figura 33**, se muestra una fotografía de los electrodos modificados y sin modificar listos para usarse. Después de la modificación de los electrodos de oro y la evaluación de la nanobiopelícula con espectrometría Raman sección 5.5 y AFM, sección 5.6 y demostrar que sí hay modificación en los MWCNT-COOH. En las micrografías de SEM sección 5. de la nanobiopelícula modificada y sin modificar, se demuestra que en la nanopelícula se retiene a *E. coli* y que es selectiva para *E. coli*. Como segundo paso de la construcción los electrodos modificados y sin modificar, formaron parte de dos sondas iguales con los dos electrodos diferentes, como se muestra en la **Figura 32 d**. Cada sonda tiene un electrodo de oro sin modificar (**Figura 32 a y 32 d**) y un electrodo de oro modificado con aptámeros CNT y AE10 (Au-MWCNT-AE10) en la **Figura 32, 1c, 1d**. Los electrodos se colocaron a una distancia fija de 3 mm entre sí y se conectaron a un medidor de conductividad comercial (Modelo H I98312), como en los prototipos de carbono y latón.

Con este diseño se puede medir la conductividad de una solución entre dos electrodos iguales, que es función de la concentración de iones detectada entre cada par de electrodos iguales y se puede obtener la conductividad entre los dos electrodos sin modificar (CAu) y los dos modificados. (CAu-MWCNT-AE10) (**Figura 32 1e, 1f**). Con este diseño se permitió conocer la conductividad de muestras con *E. coli* y sin ella, como se indicó en los experimentos donde se midió muestras con *E. coli*.

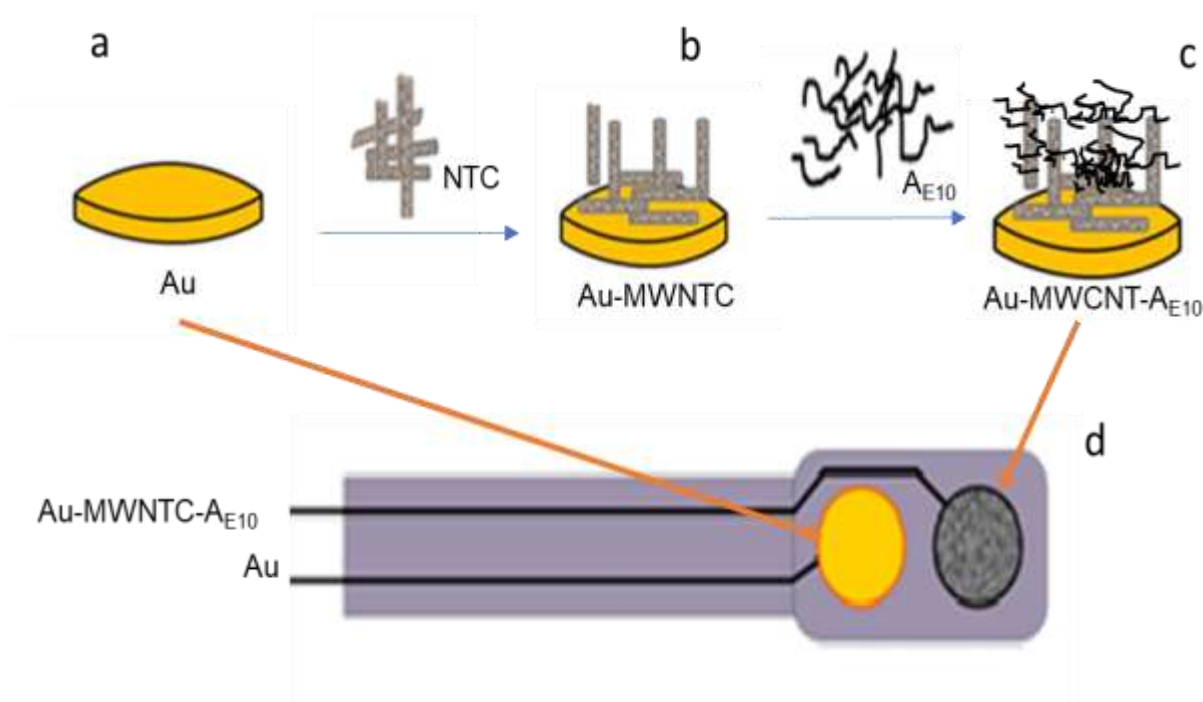


Figura 32. Esquema de la construcción de NASEC donde: a) electrodo de oro sin modificar, b) electrodo de oro con NTC, c) electrodo de oro con NTC y aptámero y d) electrodos terminados para ensamblarse.



Figura 33. Electrodos de oro modificados.

7.5.2 Calibración del aptasensor con KCl sin bacterias

Para este experimento se realizó la medición de la conductividad electrolítica sin bacterias, un procedimiento efectuado con un conductímetro para agua (H 198311) portátil, al cual se le adaptó un aptasensor con un conductímetro de laboratorio multiparamétrico pH/mV/C/CE/TDS/modelo (1255) Hanna instruments®, Inc., USA., usado como referencia.

El experimento consistió en preparar una serie de soluciones de KCl (1,2.5,3.5,5,6.5,7.5,8.5,10 mM) en agua Milli-Q, en el que se midió la conductividad de las muestras, con cada uno de los equipos. Primero, se midió con el conductímetro que tiene el aptasensor con los electrodos de oro (Au- Au) y después con el conductímetro de laboratorio con electrodos de platino.

Los resultados se graficaron, $C(\mu\text{S/cm})$ VS KCl (mM) y se muestra la curva de correlación entre los dos equipos, conductímetro H198311 con electrodos de Au y conductímetro multiparamétrico modelo Hanna 1255 con electrodos de platino, como se observa en la **Figura 34** las rectas tienen diferentes ecuaciones y valores de conductividad.

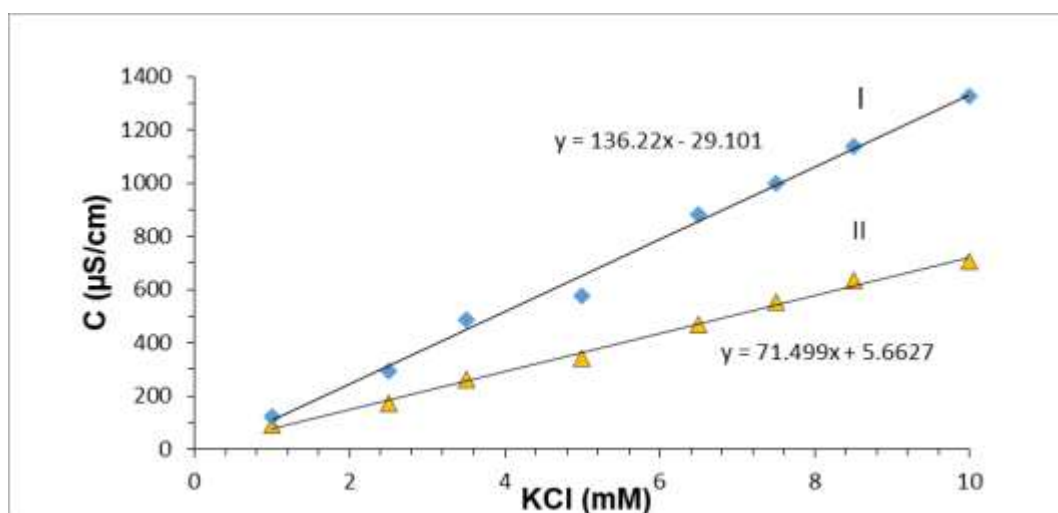


Figura 34. Conductividad de diferentes concentraciones de KCl medidas con un conductímetro de laboratorio estandarizado (I) y el aptasensor con electrodos de oro (II) y la correlación lineal entre ellos al medir la conductividad estandarizada.

En la gráfica de la **Figura 34** se puede observar que existe una linealidad entre las mediciones de conductividad con la celda de los electrodos de Au, la celda con los electrodos modificados con Au-MWCNT-AE10 y la celda con electrodos estandarizados de platino. Las ecuaciones de las rectas muestran las pendientes diferentes para estas celdas, por lo que los valores de conductividad van a variar dependiendo del diseño y modificación de los electrodos para cada una de ellas, debido a que no se puede calcular la constante de conductividad para la celda de Au-MWCNT-AE10. Se utilizó la calibración con las soluciones estándar de KCl de concentraciones conocidas, lo que permitió establecer el rango de conductividad en que funcionan las celdas.

Las modificaciones a los electrodos de Au con MWCNT permitieron incrementar la respuesta de conductividad en comparación con la conductividad medida con Au únicamente. Los valores de conductividad para bajas concentraciones de KCl (1-5 mM) medidos con electrodos modificados se acercaron más a los valores medidos con el conductímetro estandarizado de (600 $\mu\text{S}/\text{cm}$), (ver en la Figura 34). La linealidad del aptasensor permite medir muestras de agua que tienen una conductividad de 120 a 1329 $\mu\text{S}/\text{cm}$, que son un amplio rango para diferentes muestras de agua en el que se detecte la presencia de *E. coli* como indicador de calidad del agua potable. En el caso de la Ciudad de México, se tiene agua con conductividad que puede ir desde 210 hasta 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, tabla del anexo 3, por lo que este aptasensor puede ser usado en este rango de conductividad sin afectar la detección de *E. coli* sin un previo tratamiento de la muestra.

Existen métodos muy sensibles como el de PCR, que puede dar falsos negativos por la presencia alta de iones en muestras de agua, como en el caso de Iztapalapa, que logra inhibir la reacción (Mazari -Iriart *et al.*, 2000). Para este tipo de muestra se requiere un previo tratamiento de la muestra para aplicar estos métodos moleculares.

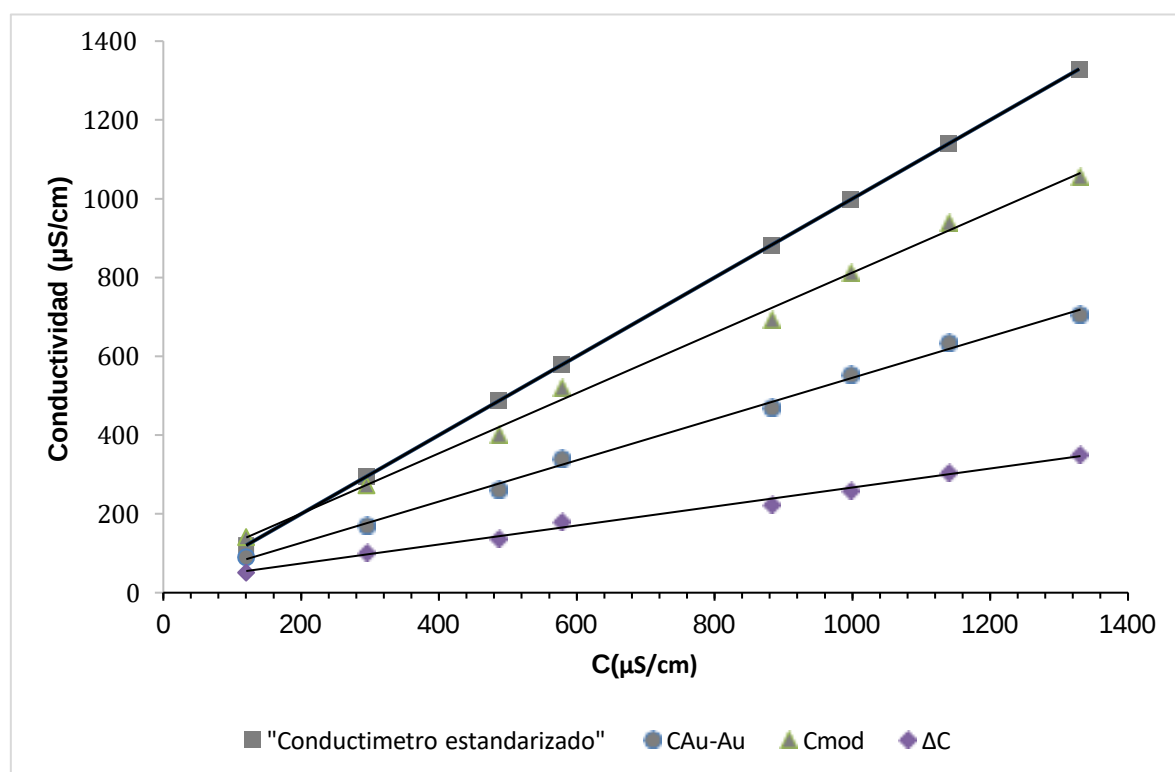


Figura 35. Linealidad estándar y conductividad determinada con el aptasensor en ausencia de *E. coli*.



7.5.3 Variación de la medición de la conductividad con el aptasensor con electrodos de oro sin *E. coli*

El tiempo de respuesta del aptasensor para oro fue determinado realizando una serie de mediciones de la conductividad de una solución de 2.5 mM de KCl en un intervalo de tiempo de 0 a 5 minutos. Los resultados para los electrodos de oro indican que a partir del minuto 2 la medición es estable y no hay cambio a partir de este tiempo, por lo que se establece el equilibrio entre las capas sólidas del biosensor y la fase líquida de la muestra, permitiendo tener lecturas estables.

En la **Figura 36** se presenta el perfil de la curva de conductividad contra tiempo, en la que podemos observar una tendencia estable a partir del minuto 0 a 5 cuando se mide la conductividad con el electrodo de oro, mientras que para las mediciones con el electrodo modificado con la biopelícula de MWCNT-AE₁₀, podemos observar que se tarda un minuto más en estabilizarse y penetrar el líquido, para dar una lectura estable, y a partir del minuto 2 se estabiliza pudiendo hacer las determinaciones a partir de este tiempo. Sin embargo, se seleccionó el minuto 3, que es un valor intermedio para medir las muestras con *E. coli* en la literatura.

Por último, se reportan pocos métodos para detectar *E. coli* en agua potable en menos de 3 minutos, y uno de ellos es el método reportado por (McCracken *et al.*, 2016), el cual consiste en detectar *E. coli* mediante anticuerpos específicos con un nivel de detección de 1000 UFC/100mL que es un valor muy alto para medir en muestras de agua potable para uso y consumo, mediante un método colorimétrico, captando la imagen en un teléfono celular.

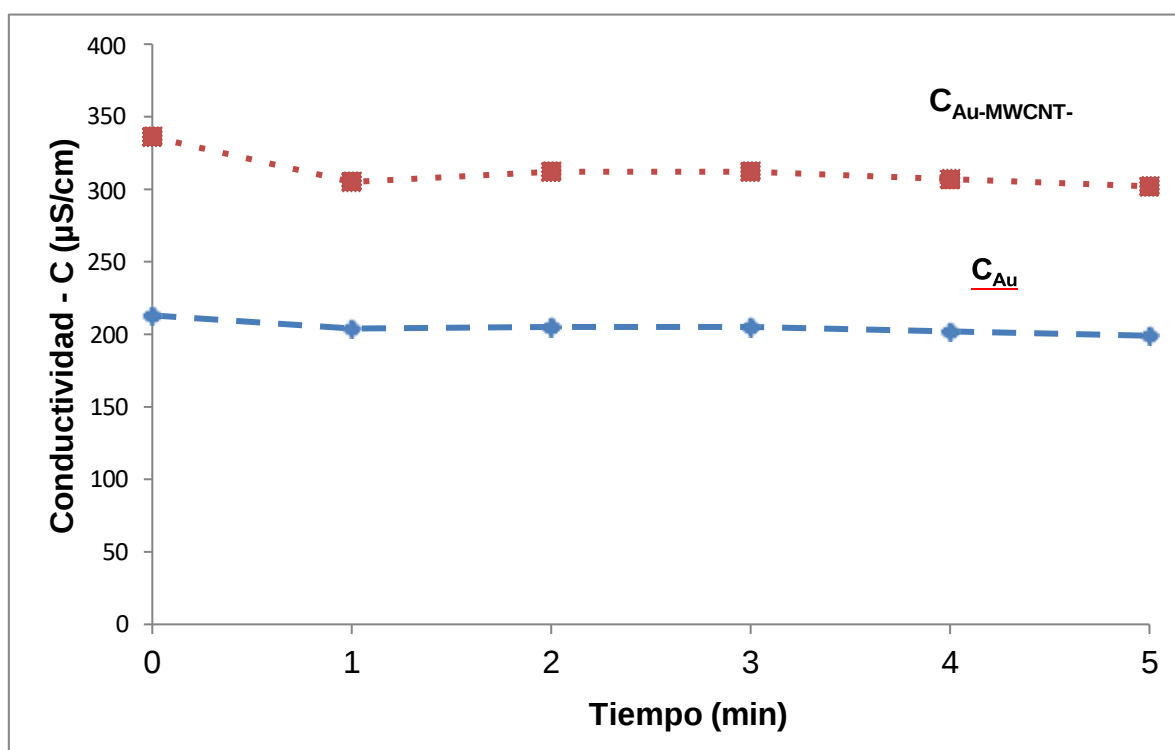


Figura 36. Estabilidad de las mediciones obtenidas durante los primeros 5 min con el aptasensor.

7.5.4 Detección de *E. coli* con el aptasensor con electrodos de oro

Para determinar la presencia de *E. coli* en muestras de agua con NASEc, se utilizó el aptasensor fijado al conductímetro como se explicó anteriormente. Cuando se encuentra presente, la bacteria tiene alta afinidad por la superficie del electrodo modificado Au-MWCNT-AE₁₀ Figura 37 a y se fija en esta superficie exclusivamente debido a la presencia de los aptámeros específicos para *E. coli*. Por otra parte, en los electrodos de Au-Au sin modificar no se pega la bacteria **Figura 37 a** y se demostró en un análisis de SEM del electrodo de oro sin modificar, después de estar en presencia de *E. coli*. La micrografía no se muestra, además, si bien los electrodos de oro se utilizan mucho en la fabricación de biosensores, por su facilidad para modificarse con grupos funcionales como grupos tiol (Podunavac *et al.*, 2023) y ser un metal noble no reacciona. Los iones migran hacia el electrodo por la corriente alterna **Figura 37 a y b**, dando una lectura sin bacteria Au-Au y una lectura con bacterias adheridas en el electrodo Au-MWCNT-AE₁₀—Au-MWCNT-AE₁₀. La diferencia entre dos lecturas proporciona el valor conocido como ΔC y se expresa matemáticamente en la siguiente ecuación:

$$\Delta C = (CAu-MWCNT-A_{E10}) - (CAu) \quad (3)$$

Se midió el cambio de la conductividad ΔC en las suspensiones bacterianas seriadas (1:100 mL), preparadas con solución de KCl 2.5 mM y *E. coli*, para concentraciones bajas de UFC/100 (0,1,2,3,4) como se explicó, en material y métodos. En la **Figura. 38**, se muestra la gráfica de la respuesta ΔC Vs UFC/100 mL, en donde se resumen los resultados de cuatro experimentos independientes. Las mediciones se realizaron después de tres minutos de haber sumergido el conductímetro con el aptasensor en la suspensión bacteriana a una temperatura de (23-24°C) las lecturas se realizaron por triplicado e inicialmente se midió el KCl sin inocular *E. coli*, después de esterilizar el KCl, esta muestra se tomó como control negativo, el valor de ΔC sin bacterias fue de $156 \pm 12 \mu S/cm$ esto es para cero UFC, para las muestras con 1 UFC/100 mL, fue de $121.5 \pm 10 \mu S/cm$, para el valor de 2 UFC/100 mL el valor de ΔC fue 113 ± 2 , y para 4 UFC/100 mL fue de 116 ± 5 . Los resultados graficados permiten observar una relación inversa entre el aumento de UFC /100 mL y la disminución del valor de ΔC . Este comportamiento indica la presencia de *E. coli* en la muestra.

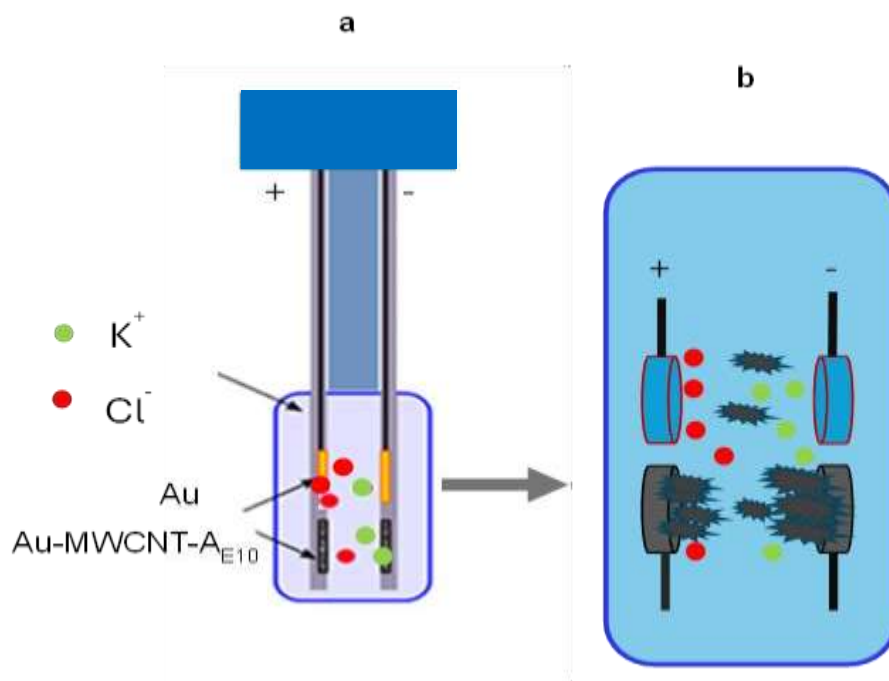


Figura 37. Representación esquemática de NASE_c y de la medición de la conductividad en presencia de bacterias.

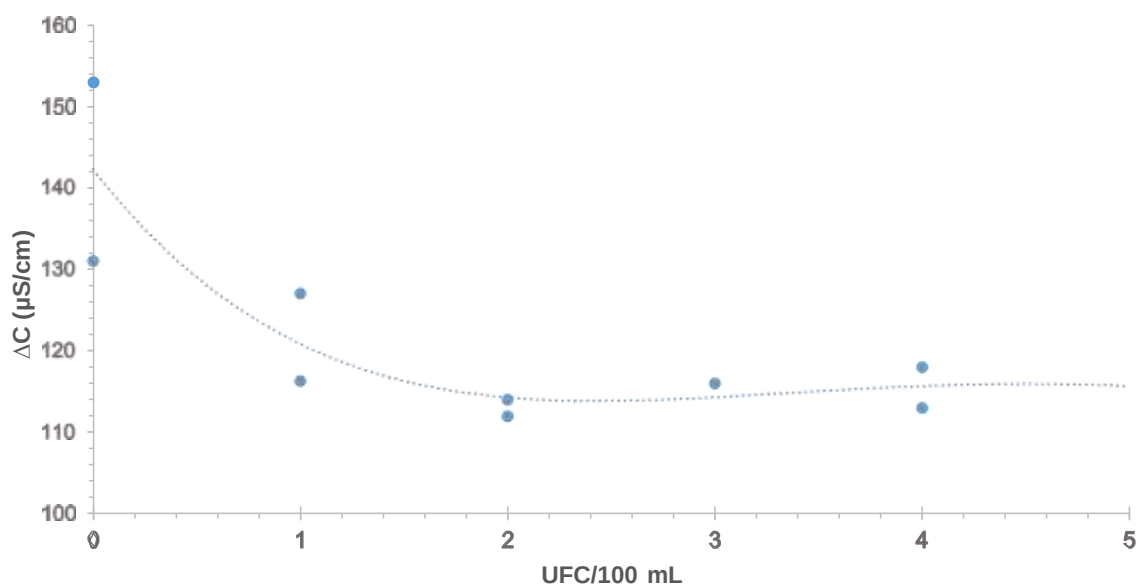


Figura 38. El cambio de ΔC en presencia de *E. coli* en KCl 2.5 mM.

El diseño del aptasensor permite que el material híbrido de aptámero-nanotubos de carbono de la superficie de electrodo de Au actúe como capa transductora y detectora de *E. coli*.



La interacción con el aptámero promueve un cambio conformacional al retener a la bacteria que se encuentra en la solución (Zelada-Guillen *et al.*, 2009), saturando la superficie del electrodo donde están los puntos de unión con el aptámero **Figura 37 b**. El cambio de ΔC se debe a que través de esta solución se hace circular una corriente eléctrica alternante provocando un cambio de conductividad electrolítica de la muestra que depende de la presencia de *E. coli* que se encuentre fija en electrodo bloqueando la superficie, como se muestra en el esquema de la **Figura 37 b** y disminuyendo el valor de ΔC . Existe una relación inversa entre la respuesta ΔC y la concentración de bacterias, que puede explicarse por la saturación progresiva de los sitios de unión disponibles en los MWCNT modificados con los aptámeros (AE10) que reconocen a *E. coli*, hasta llegar a la saturación.

El aptasensor puede detectar 1 UFC/100mL de *E. coli* en 3 min, esto puede considerarse como el límite mínimo de detección, permitiendo detectar fácil y rápidamente en la muestra, en comparación a los métodos clásicos y otros biosensores reportados. En la tabla 7 se presentan diferentes métodos desarrollos para la detección de *E. coli* en el agua potable. Algunos de los métodos citados son muy complejos, basados en sensores electroquímicos (Serra *et al.*, 2005), como los métodos citados de la línea 10 a la 13, que son espectroscópicos y miden la impedancia o bien enzimáticos, (Hesari *et al.*, 2016; Ionescu, 2017; Kuo *et al.*, 2010; Serra *et al.*, 2005).

Estos métodos, en general, requieren menos tiempo que el método clásico que requiere 48 H, pero la sensibilidad que presentan no es suficientemente alta para cumplir con la norma oficial mexicana para calidad microbiológica para agua potable. Estos métodos utilizan frecuentemente principios de nanociencia y nanotecnología para detectar *E. coli* como principio básico. A partir de la línea 13 (Kuo *et al.*, 2010) se presentan los métodos que tienen mayor sensibilidad y pueden detectar hasta una UFC/100 mL, pero en tiempo que puede variar de 9 H hasta 15 minutos, este último método fue reportado por Wutor *et.al.* (2007), y se basa en medir electroquímicamente el CPR por la hidrólisis enzimática β -D-galactosidasa sobre el CPRG, el cual fue previamente inmovilizado en electrodos de glasin carbón.



Este método está diseñado para aplicarse en laboratorio, porque se requiere de un equipo voltanométrico (BAS Epsilon) para las mediciones, mientras que el método reportado en este trabajo se aplica en campo y solo se requiere de un conductímetro con el aptasensor acoplado, el cual es de fácil manejo y más rápido (3 min).

7.5.5 Análisis Raman del electrodo de oro después de medir con *E. coli*

Los resultados de unión de *E. coli* a los aptámeros también se confirman con los espectros Raman obtenidos del análisis de la superficie modificada con NTC-AE₁₀ con y sin presencia de *E. coli*. Este espectro se presenta en la **Figura 39**, donde se pueden ver las bandas típicas de MWCNT y las bandas reportadas para *E. coli*. De acuerdo con la bibliografía, los picos MWCNT de la región 600-900 cm⁻¹ y 1200-1400 cm⁻¹ son para *E. coli* y las bandas (1350-1600) cm⁻¹ características para MWCNT carboxilados, concuerdan con lo reportado por Segungupa *et al.* (2006).

La espectroscopía Raman es una técnica que se basa en la dispersión inelástica de la luz de una fuente de excitación monocromática, que permite una detección selectiva y altamente sensible, que se ha usado para identificar bacterias como: *E. coli*, *S. tify* y algunos hongos (Maquelin *et al.*, 2003) y virus como el SARCov2 (Cui & Zhou, 2020). Esta técnica se utilizó para el análisis de la nanopelícula después de haber sido expuesto a una suspensión de *E. coli* de 103 UFC/100 ml con la finalidad de demostrar que las bacterias se quedan capturadas por el aptasensor en presencia de AE₁₀, como se confirmó por microscopía electrónica en el apartado anterior.

En la **Figura 39**, se muestra los espectros Raman típicos para la nanopelícula de nanotubos de carbono con AE₁₀ se puede observar los picos D y G de los MWCNT característicos. Una serie de picos nuevos que aparecen en un rango que va de la región de 400-1800 (cm⁻¹). En el análisis se sugieren bandas asociadas con el DNA (701 y 747), amida III (1262), de formación del CH de los lípidos de la membrana de *E. coli* (1437 cm⁻¹), triptófano (1540), relacionado con los grupos funcionales en la membrana. En la tabla 6 están resumidas las frecuencias de los compuestos.

La presencia de *E. coli* se explica por la unión a A_{E10} que está unido a los MWCNT carboxilados, mediante la reacción química de enlace covalente vía EDC/NHS. En la banda Amida I se observan un hombro en el lado de frecuencia más alta de la banda G MWCNT, como reportó Maquelin *et al.*, 2003 y Wu *et al.*, 2001, producto de la funcionalización con el aptámero.

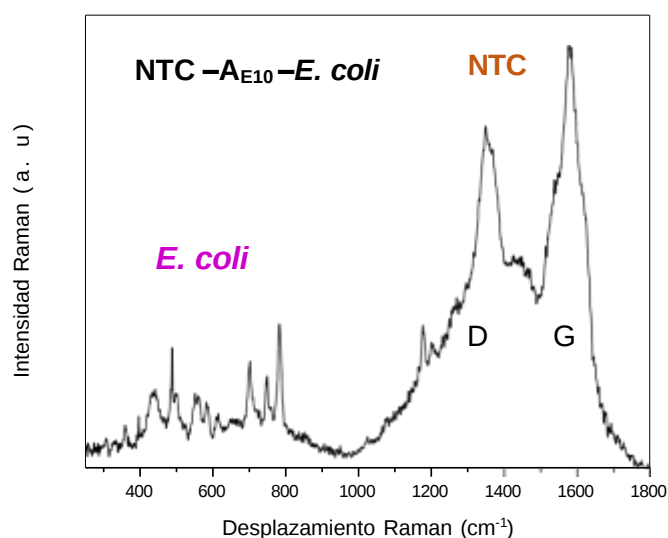


Figura 39. Espectro Raman de *E. coli* adsorbida en la nanobioestructura diseñada.

Tabla 6. Asignación de bandas de análisis Raman de electrodo de oro con *E. coli* adheridas sobre la película nanoestructurada y funcionalizada con A_{E10} .

Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	Asignación
437	Fenilalanina
488	Polisacaridos
500	S-S disulfito stretching banda
551	Polisacaridos, A, C
560	C-S
583	Trp, C, G
611	Phe
645	Tyr, C, G
701	ADN
747	ADN
783	ADN, O – P – O
1176	C – O estiramiento
1201	C – N estiramiento
1262	Amida III
1348	CNT - banda D
1437	CH ₂ /CH ₃ deformación
1540	Trp
1579	CNT - banda G
1619	C – C estiramiento, Amida I

7.5.6 Detección de *E. coli* con el aptasensor NASEc en muestras de agua comercial

En la **Figura 41** se muestran resultados obtenidos de muestras de agua purificada marca VENEC, inoculada con *E. coli*, en concentraciones de 6, 35, 250 UFC/100 mL. Estas muestras se midieron con el equipo NASEc, **Figura 40**. En esta gráfica se observan los valores de ΔC ; para valor de ΔC sin bacterias y después de esterilizar ($101 \mu\text{S/cm}$), el valor de ΔC va disminuyendo a medida que se va incrementando la cantidad de bacterias. Para el valor de 6 UFC, el valor de $\Delta C = 96.3 \mu\text{S/cm}$, seis unidades menos que para cero UFC/100 mL. Cuando se incrementó a 35 UFC/100 mL, el valor de conductividad se disminuyó a $93 \mu\text{S/cm}$ y cuando se incrementó a 250, UFC/100 mL el valor de conductividad disminuyó hasta $88 \mu\text{S/cm}$. Estos resultados demuestran que el aptasensor funciona con muestras de agua potable para detectar *E. coli* en tiempo real y a bajas concentraciones, estos resultados tienen un comportamiento que concuerda con los obtenidos con la detección de *E. coli* en KCl 2.5 mM. Esto quiere decir una disminución de la conductividad en presencia de *E. coli* y por lo tanto de ΔC .



Figura 40. Conductímetro H19811 con NASEc.

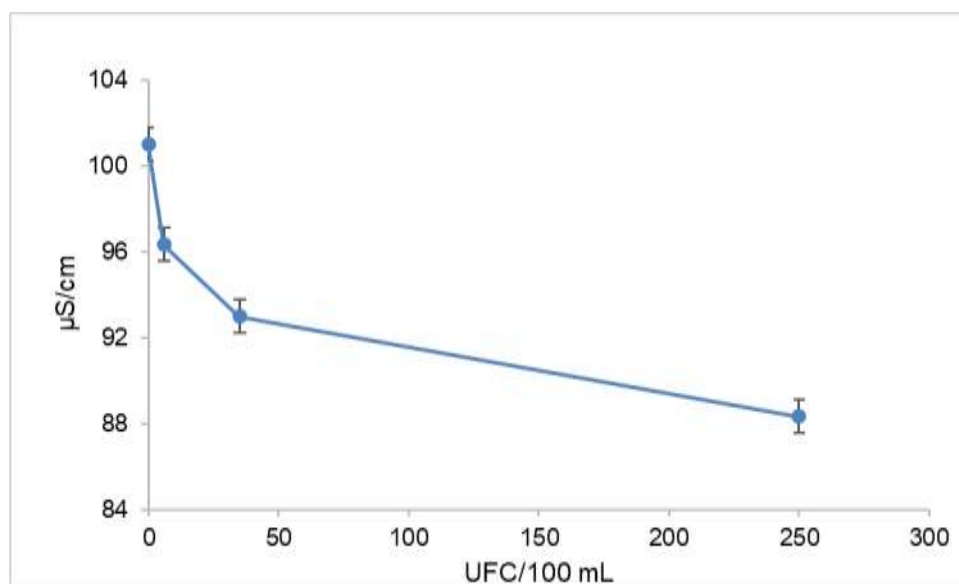


Figura 41. Valores de conductividad obtenidos con NASEc con diferentes concentraciones de *E. coli* en agua purificada marca VENEC.

7.5.7 Estabilidad del aptasensor

Considerando que la estabilidad es una característica asociada a la vida media del aptasensor y que pocas veces se toma en cuenta, es de suma importancia evaluarla. Sí se pretende que sea para una aplicación cotidiana y de uso doméstico. En este trabajo se evaluó la estabilidad de aptasensor, durante de 18 meses, **Figura 42**. En todos los casos, el aptasensor se probó con una solución de KCl 2.5 mM a 24 °C, sin presencia de *E. coli*. Los resultados se presentan en la **Figura 41**, para esta evaluación se midieron dos parámetros: CAu (I) y CAu-MWCNT-A_{E10} (II). El aptasensor NASEc, muestra una gran estabilidad y consistencia durante toda la prueba. Los valores de CAu fueron en promedio 189 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (ds = 22) y para CAu-MWCNT-A_{E10} fueron 322 $\mu\text{S / cm}$ (ds = 26) y se calculó el valor de ΔC .

Asimismo, la estabilidad de NASEc se puede atribuir a las características de los aptámeros, que presentan gran estabilidad de su estructura a temperatura ambiente, la capacidad de regeneración y otra muy importante es la de estar modificado en el extremo 3' (A_{E10}) NH₃, unido a los MWCNT-COOH, lo que le da estabilidad frente a las nucleasas que son enzimas que degradan los ácidos nucleicos.



Los conjugados MWCNT-AE₁₀ muestran una vida media prolongada por la naturaleza de los aptámeros, caso contrario a los anticuerpos, que son menos estables por su naturaleza proteica (Hayat & Marty, 2014), y esto hace que los inmunosensores no sean reusables, contrario a NASEc que se puede usarse varias veces sin perder la sensibilidad en la medición, solamente con enjuagar con agua estéril varias veces, como lo reportaron Chrouda *et al.*, 2022, con el aptasensor para detectar aflatoxinas.

Hay que tener en cuenta también que la robustez y estabilidad combinadas con la reutilización del sensor aquí reportado lo hace adecuado para un uso rentable a nivel comercial. Esta característica es importante para la fabricación de aptasensores a nivel de gran escala. Los resultados indican que el método es estable, sin ruido, robusto, que puede ser usado por más de un año de uso continuo y es reusable sin tener cambios importantes en las lecturas. Algunos autores señalan que la inmovilización realizada entre los MWCNT y el aptámero le confiere una estabilidad y protección a este último (Hayat & Marty, 2014). Se realizó una prueba de t, donde se puede ver que no existe diferencia significativa entre las mediciones antes y después de medir *E. coli* como se puede ver en la **Figura 42**, las mediciones con los electrodos Au-Au y Au-MWCNT- Au-MWCNT (1-7), se realizaron después de haber medido *E. coli*. Autores como Chrouda *et al.*, 2022 reportaron la estabilidad de un aptasensor de un mes y señalan que la actividad disminuyó 15% de la eficiencia de las mediciones del aptasensor.

Ellos reportan que lo conservaron a temperatura 4 °C en amortiguador de fosfatos, pH 7. Por otra parte, NASEc se conservó a temperatura ambiente y protegido de la humedad. Para realizar nuevas mediciones, solamente se volvió a sumergir en KCl 2.5 mM, para medir nuevamente la presencia de *E. coli*, otro trabajo donde midieron la estabilidad fue el realizado por Sari *et al.* (2023), los cuales construyeron un aptasensor electroquímico y realizaron experimentos de estabilidad acelerada a diferentes temperaturas 25, 40 y 50 °C durante 1, 15, 30 y 60 días. Esto autores miden la respuesta y se observan que se pierde 18% de la actividad. Este método se utiliza para evaluar la vida de anaquel en alimentos, pero en el campo de los biosensores resultó muy útil, como se demostró con NASEc.

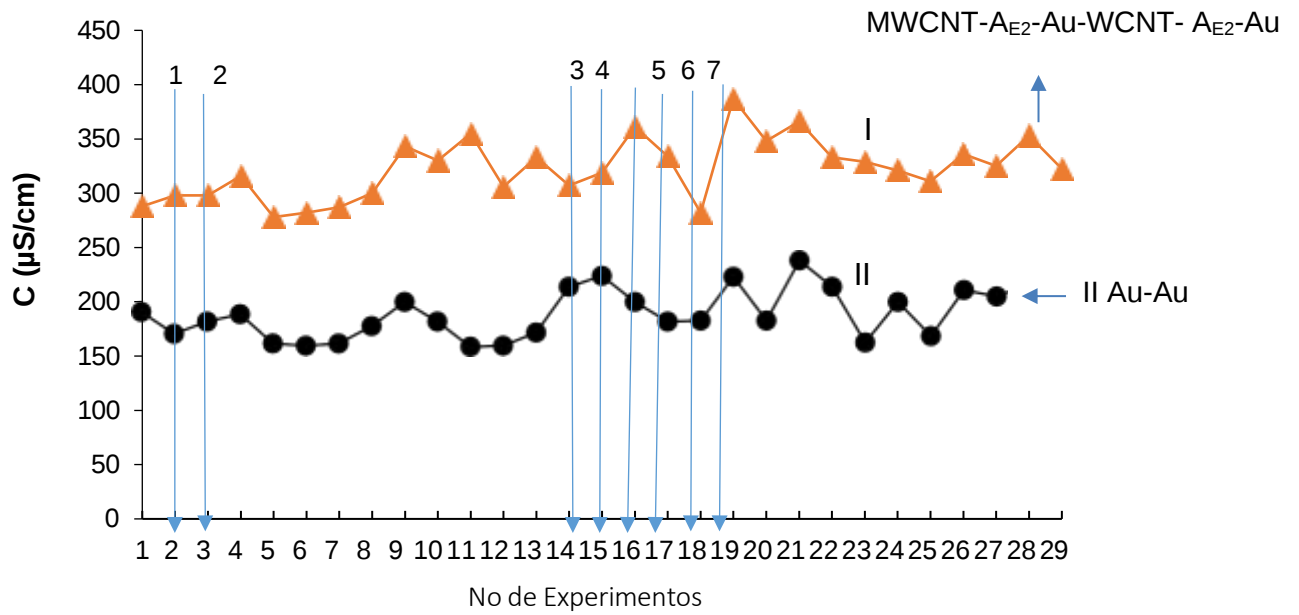


Figura 42. Prueba de estabilidad de NASEc.



8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El objetivo de este trabajo fue diseñar y construir un nanoaptasensor (NASE_c) para la detección de *E. coli* en agua potable. Esto se logró diseñando un dispositivo que se basa en mediciones de conductividad eléctrica entre un juego de electrodos de oro modificados y sin modificar. Los cambios realizados en los electrodos de oro fueron combinados con un aptámero específico (A_{E10}) para *E. coli* y MWCNT, lo que resultó en un complejo A_{E10}–MWCNT, que produjo una nanopelícula con alta sensibilidad para la detección de una UFC/100 mL para *E. coli*.

Por otra parte, se demostró mediante técnicas nanométricas y moleculares de espectroscopía UV-vis, Raman, AFM y SEM, la eficiencia de las modificaciones realizadas, lo que ofreció un control en la fabricación del aptasensor, garantizando la eficiencia en la detección de *E. coli* en las muestras analizadas en KCl 2.5 mM y en agua purificada.

Es importante señalar que la técnica de AFM sirvió para verificar, a nivel nanométrico, la diferencia en el diámetro de los MWCNT. Los MWCNT con el A_{E10}, presentaron un diámetro mayor que los MWCNT sin funcionalizar.

La técnica de espectroscopía Raman, permitió corroborar la modificación de la superficie de los electrodos oro con WMCNT-A_{E10}, mediante la obtención de bandas características para cada componente. También se analizó la superficie de los electrodos de oro después de detectar *E. coli*, confirmando su presencia en los electrodos de oro modificados, como lo demostraron los datos por SEM.

Por medio de SEM se evaluó también la especificidad de la biopelícula, al obtener micrografías donde se muestra la presencia de *E. coli*, en electrodo con MWCNT-A_{E10}, pero no así, en la misma biopelícula en presencia de *S. marcescens* que se utilizó como control negativo porque no la retiene la biopelícula (WCNT-A_{E10}), por ser específica para *E. coli*.

El diseño propuesto del aptasensor permite tener una relación lineal entre la conductividad registrada por el par de electrodos Au-Au y la correspondiente medición de la conductividad eléctrica realizada con el otro par de electrodos, que incluye tanto el par de electros Au-Au como Au-MWCNT-Au-MWCNT en soluciones de KCL con diferentes concentraciones con esto podemos decir que el aptasensor puede usarse en muestras de agua potable en un amplio rango de conductividad de (50 a 1300 μ S/cm), para detectar a *E. coli* en 3 min. El método de detección conductimétrico de NASE_c tiene muchas ventajas, incluido su bajo costo, simplicidad y tiempo de análisis corto.



En contraste con los métodos clásicos tradicionales, que requieren de 48 H para conocer el resultado de la presencia de *E. coli* y de 72 H para tipificarla, de la misma manera estos análisis se realizan por personas que tienen un entrenamiento previo y en laboratorios con equipo especializado y con altos costos operativos. NASEc resulto ser un dispositivo robusto por su estabilidad de 18 meses con estas ventajas. El diseño y fabricación de NASEc, abren la posibilidad de incorporar el aptasensor a un sensor multifuncional para la detección simultánea de indicadores microbiológicos de calidad del agua potable y de otros compuestos de importancia para la salud, como son los residuos clorados producto de desinfección y de otros elementos químicos que pueden causar daño a la salud de los consumidores. Con la fabricación de un multisensor doméstico, se tendría un dispositivo al alcance de la población en general para usarlo como herramienta que determine la calidad del agua, en los hogares, en la red de distribución y durante el proceso de potabilización, garantizando la seguridad de tener agua apta para consumo humano. Para posteriores trabajos se sugiere un monitoreo de muestras de agua de la red de distribución de zonas críticas o donde hay antecedentes de contaminación por *E. coli* como alcaldías Iztapalapa, Tláhuac y Xochimilco, que son zonas vulnerables geográficamente por ser zona lacustre y con alta densidad de población



9. BIBLIOGRAFÍA

- AFNOR (1996). Microbiological Analysis: Horizontal Methods. French Association for Standardization (AFNOR), Paris, French.
- Ahmed, W., Hodgers, L., Sidhu, J. P. S., & Toze, S. (2012). Fecal indicators and zoonotic pathogens in household drinking water taps fed from rainwater tanks in Southeast Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 219-226. <https://doi.org/10.1128/aem.06554-11>
- Ali, A., Koloor, S. S. R., Alshehri, A. H., & Arockiarajan, A. (2023). Carbon nanotube characteristics and enhancement effects on the mechanical features of polymer-based materials and structures – A review. *Journal of Materials Research and Technology*, 24, 6495-6521. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.04.072>
- APA (2009). Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. Washington, D.C. Aptusbiotech. Home. AptusBiotech. <http://www.aptusbiotech.com>
- Berg, J. D., & Fiksdal, L. (1988). Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone-beta-D-galactoside. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), 2118-2122. <https://doi.org/10.1128/aem.54.8.2118-2122.1988>
- Botes, M., De Kwaadsteniet, M., & Cloete, T. (2012). Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(1), 91-108. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6399-3>
- Bruno, J. G. (2014). Application of DNA aptamers and quantum dots to lateral flow test strips for detection of foodborne pathogens with improved sensitivity versus colloidal gold. *Pathogens*, 3(2), 341-355. <https://doi.org/10.3390/pathogens3020341>
- Chavali, R., Gunda, N. S. K., Naicker, S., & Mitra, S. K. (2014). Detection of *Escherichia coli* in potable water using personal glucose meters. *Analytical Methods*, 6(16), 6223. <https://doi.org/10.1039/c4ay01249f>
- Cheap Tubes Inc. (s. f.). *Functionalized carbon nanotubes*. CTI Materials. <https://www.ctimaterials.com/product-category/functionalized-carbon-nanotubes-for-research-commercial-applications/>
- Chrouda, A., Ayed, D., Zinoubi, K., Majdoub, H., & Jaffrezic-Renault, N. (2022). Highly stable and ultra-sensitive amperometric aptasensor based on pectin stabilized gold nanoparticles on graphene oxide modified GCE for the detection of aflatoxin M1. *Food Chemistry Advances*, 1, 100068. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100068>
- Cimafonte, M., Fulgione, A., Gaglione, R., Papaiani, M., Capparelli, R., Arciello, A., Censi, S. B., Borriello, G., Velotta, R., & Della Ventura, B. (2020). Screen printed based



- impedimetric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* in drinking water. *Sensors*, 20(1), 274. <https://doi.org/10.3390/s20010274>
- Cui, F., & Zhou, H. S. (2020). Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019. *Biosensors and Bioelectronics*, 165, 112349.
- Datsyuk, V., Kalyva, M., Papagelis, K., Parthenios, J., Tasis, D., Siokou, A., Kallitsis, I., & Galiotis, C. (2008). Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 46(6), 833-840. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2008.02.012>
- De Boer, E., & Beumer, R. (1999). Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 119-130. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00081-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00081-1)
- Dudak, F. C., & Boyacı, İ. H. (2007). Development of an immunosensor based on surface plasmon resonance for enumeration of *Escherichia coli* in water samples. *Food Research International*, 40(7), 803-807. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.011>
- Davis, B. D., Eisen, H. N., Dulbecco, R., & Ginsberg, H. S. (1996). *Tratado de microbiología*. Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J., & Allen, M. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88(S1), 106S-116S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x>
- Evtugyn, G., Porfireva, A., Ryabova, M. Y., & Hianik, T. (2008). Aptasensor for Thrombin based on carbon nanotubes-methylene blue composites. *Electroanalysis*, 20(21), 2310-2316. <https://doi.org/10.1002/elan.200804345>
- Fiksdal, L., & Tryland, I. (2008). Application of rapid enzyme assay techniques for monitoring of microbial water quality. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 289-294. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.004>
- Frahm, E., & Obst, U. (2003). Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 123-131. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(02\)00150-1](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00150-1)
- Gallastegui, A. G. (2009). Nuevas nanoestructuras basadas en nanotubos de carbono modificados con grupos funcionales para aplicaciones biomédicas (Doctoral dissertation, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea).
- García-Aljaro, C., Cella, L. N., Shirale, D. J., Park, M., Muñoz, F., Yates, M. V., & Mulchandani, A. (2010). Carbon nanotubes-based chemiresistive biosensors for detection of microorganisms. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), 1437-1441.



<https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.077>

- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400-1458. <https://doi.org/10.3390/s8031400>
- Guler, Z., & Sarac, A. S. (2016). Electrochemical impedance and spectroscopy study of the EDC/NHS activation of the carboxyl groups on poly(ϵ -caprolactone)/poly(m-anthranilic acid) nanofibers. *Express Polymer Letters*, 10(2), 96-110. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.11>
- Gunda, N. S. K., Dasgupta, S., & Mitra, S. K. (2017). DipTest: A litmus test for *E. coli* detection in water. *PLOS ONE*, 12(9), e0183234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183234>
- Gunda, N. S. K., Naicker, S., Shinde, S., Kimbahune, S., Shrivastava, S., & Mitra, S. K. (2014). Mobile Water Kit (MWK): a smartphone compatible low-cost water monitoring system for rapid detection of total coliform and *E. coli*. *Analytical Methods*, 6(16), 6236. <https://doi.org/10.1039/c4ay01245c>
- Hayat, A., & Marty, J. L. (2014). Aptamer based electrochemical sensors for emerging environmental pollutants. *Frontiers In Chemistry*, 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00041>
- Hermann, T., & Patel, D. J. (2000). Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*, 287(5454), 820-825. <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.820>
- Hesari, N., Alum, A., El-Zein, M., & Abbaszadegan, M. (2016). A biosensor platform for rapid detection of *E. coli* in drinking water. *Enzyme and Microbial Technology*, 83, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.11.007>
- Hübner, I., Steinmetz, I., Obst, U., Giebel, D., & Bitter-Suermann, D. (1992). Rapid determination of members of the family Enterobacteriaceae in drinking water by an immunological assay using a monoclonal antibody against enterobacterial common antigen. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 3187-3191. <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.3187-3191.1992>
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2020) Censo de Población y Vivienda México: INEGI.
- Ionescu, R. E. (2017). Biosensor Platforms for Rapid Detection of *E. coli* Bacteria. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/67392>
- Iqbal, S. M., Robinson, J., Deere, D., Saunders, J. R., Edwards, C., & Porter, J. (1997). Efficiency of the polymerase chain reaction amplification of the *uid* gene for detection of *Escherichia coli* in contaminated water. *Letters In Applied Microbiology*, 24(6),



498-502. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00160.x>

Jaffr  zic-Renault, N., & Dzyadevych, S. V. (2008). Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors*, 8(4), 2569-2588. <https://doi.org/10.3390/s8042569>

Jin, B., Wang, S., Lin, M., Jia, Y., Shu-Jing, Z., Cui, X., Gong, Y., Li, A., Xu, F., & Lu, T. J. (2017). Upconversion nanoparticles-based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 525-533. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.029>

Johnson, R. R., Johnson, A. T. C., & Klein, M. L. (2007). Probing the Structure of DNA-Carbon nanotube hybrids with molecular dynamics. *Nano Letters*, 8(1), 69-75. <https://doi.org/10.1021/nl071909j>

Kaur, H., Shorie, M., & Sabherwal, P. (2020a). Electrochemical aptasensor using boron-carbon nanorods decorated by nickel nanoparticles for detection of *E. coli* O157:H7. *Mikrochimica Acta*, 187(8). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04444-y>

Khang, J., Kim, D., Chung, K. W., & Lee, J. (2016a). Chemiluminescent aptasensor capable of rapidly quantifying *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta*, 147, 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.055>

Kim, Y. S., Song, M. Y., Jurng, J., & Kim, B. C. (2013). Isolation and characterization of DNA aptamers against *Escherichia coli* using a bacterial cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach. *Analytical Biochemistry*, 436(1), 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.014>

Kim, Y. S., Chung, J., Song, M. Y., Jurng, J., & Kim, B. C. (2014). Aptamer cocktails: Enhancement of sensing signals compared to single use of aptamers for detection of bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 195-198. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.003>

Kim, Y. S., Raston, N. H. A., & Gu, M. B. (2016). Aptamer-based nanobiosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 76. Koneman, E. W. (1997). Koneman Diagnostico Microbiol  gico: Texto y atlas en color. Ed. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.040> Koneman, E. W. (1997). Koneman Diagnostico Microbiol  gico: Texto y atlas en color. Ed. Medica Panamericana.

Kuo, J., Cheng, C., Huang, H., Tsao, C., & Chung, Y. (2009). A rapid method for the detection of representative coliforms in water samples: polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). *Journal of Industrial*



- Microbiology & Biotechnology*, 37(3), 237-244. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0666-0>
- Kurup, C., Tlili, C., Nurul, S., Zakaria, A., & Uddin, M. (2021). Recent trends in design and development of nanomaterial-based aptasensors. *Biointerface Research In Applied Chemistry*, 11(6), 14057-14077. <https://doi.org/10.33263/briac116.1405714077>
- Lazcka, O., Del Campo, F. J., & Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7), 1205-1217. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>
- Le, V. T., Ngo, C. L., Le, Q. T., Ngo, T. T., Nguyen, D. N., & Vu, M. T. (2013). Surfacemodification and functionalization of carbon nanotube with some organic compounds. *Advances in Natural Sciences Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 035017. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/035017>
- Li, Z., Wu, Z., & Li, K. (2009). The high dispersion of DNA–multiwalled carbon nanotubes and their properties. *Analytical Biochemistry*, 387(2), 267-270. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.043>
- Lipps, W. C., Braun-Howland, E. B., & Baxter, T. E. (2022). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater(tm)*. APHA Press.
- Loaiza, Ó. A., Campuzano, S., Pedrero, M., García, P., & Pingarrón, J. M. (2009). Ultrasensitive detection of coliforms by means of direct asymmetric PCR combined with disposable magnetic amperometric genosensors. *The Analyst*, 134(1), 34-37. <https://doi.org/10.1039/b815307h>
- Maheux, A. F., Boudreau, D. K., Bisson, M., Dion-Dupont, V., Bouchard, S., Nkuranga, M., Bergeron, M. G., & Rodriguez, M. J. (2014). Molecular method for detection of total coliforms in drinking water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(14), 4074-4084. <https://doi.org/10.1128/aem.00546-14>
- Mallya, A.N., Sowmya, P., Ramamurthy, P.C. (2014). Organic nanocomposite sensor for detection of *Escherichia coli*, in: 2014 IEEE 2nd International Conference on Emerging Electronics (ICEE). <https://doi.org/10.1109/ICEEelec.2014.7151202>
- Mazari, H.M., Saval, B. Torres-Beristein, J. Milcic, E. Vélazquez, L. Lloret, L. Rodríguez & E. Soto. (1996). Estudio sobre la calidad del agua en la Ciudad de México usando como indicadores microorganismos y compuestos orgánicos. Informe técnico final. *Secretaría del Medio Ambiente, Departamento del Distrito Federal*.
- Mazari-Hiriart, M., Tapia-Palacios, M. A., Zarco-Arista, A. E., & Espinosa-García, A. C. (2019). Challenges and opportunities on urban water quality in Mexico City. *Frontiers In Environmental Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00169>



- McCracken, K. E., Angus, S. V., Reynolds, K. A., & Yoon, J. Y. (2016). Multimodal imaging and lighting bias correction for improved μ PAD-based water quality monitoring via smartphones. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep27529>
- Meng, X., Wang, R., & Li, Y. (2017). Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta*, 162, 511-522. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.050>
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L., Ngo-Thi, N. A., Van Vreeswijk, T., Stämmler, M., Endtz, H. P., Bruining, H. A., Naumann, D., & Puppels, G. J. (2003). Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 324-329. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.1.324-329.2003>
- Montero, D. (2015). Transnacionales, gobierno corporativo y agua embotellada. El negocio del Siglo XXI, (1.^a ed.). Universidad Autónoma Metropolitana. <https://casadelibrosabiertos.uam.mx/gpd-transnacionales-gobierno-corporativo-y-agua-embotellada.html>
- Montes, s. (2009). Aplicaciones médicas de los Nanotubos de Carbono. Nanovacunas, administración de fármacos y terapias génicas.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-2021). Secretaría de Salud (SSA). 2021: Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. Ciudad de México.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994). Secretaria de Salud (SSA). 1995. Bienes y Servicios. Método para cuenta de Bacterias aerobias en placa.
- Ocaña, C., Palacios, M., & Del Valle, M. (2012). A Reusable impedimetric aptasensor for detection of thrombin employing a graphite-epoxy composite electrode. *Sensors*, 12(3), 3037-3048. <https://doi.org/10.3390/s120303037>
- Ospina, J. D. (2020). Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomedica*, 40(Supl 1), 148-165. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4765>
- Ozkan-Ariksoysal, D., Kayran, Y. U., Yilmaz, F. F., Ciucu, A. A., David, I. G., David, V., Hoşgör-Limoncu, M., & Ozsoz, M. (2017). DNA-wrapped multi-walled carbon nanotube modified electrochemical biosensor for the detection of *Escherichia coli* from real samples. *Talanta*, 166, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.005>
- Paniel, N., & Baudart, J. (2013). Colorimetric and electrochemical genosensors for the detection of *Escherichia coli* DNA without amplification in seawater. *Talanta*, 115,



133-142. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.050>

Pappert, G., Rieger, M., Niessner, R., & Seidel, M. (2009). Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of *E. coli*. *Microchimica Acta*, 168(1-2), 1-8.

Podunavac, I., Kukkar, M., Léguillier, V., Rizzotto, F., Pavlović, Z., Janjušević, L., Costache, V., Radonić, V., & Vidić, J. (2023). Low-cost goldleaf electrode as a platform for *Escherichia coli* immunodetection. *Talanta (Oxford)*, 259, 124557. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124557>

Ramírez, X. D. (2018, 16 agosto). México, el país del mundo que más agua embotellada consume. *Agua*. <https://www.iagua.es/blogs/xavi-duran-ramirez/mexico-pais-mundo-que-mas-agua-embotellada-consume>

Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, 44(5). <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., De-Roubin, M. R., & Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49(1), 31-54. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00351-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00351-7)

Rock, C., & Rivera, B. (2014). La calidad del agua, *E. coli* y su salud.

Sistemas de Agua de la Ciudad de México (SACMEX). Tercer Informe de Gobierno de la Ciudad de México, 2021. Recuperado de: <https://www.congresocdmx.gob.mx/archivos/finanzas/infografiamanejosustentabledelagua2022>.

Sari, A. K., Fadhilah, G. N., Irkham, I., Yusuf, M., Gaffar, S., & Hartati, Y. W. (2023). The stability study of electrochemical aptasensor to detect SARS-CoV-2 spike protein and its application for clinical samples of nasopharyngeal swab. *Indonesian Journal of Chemistry*, 23(2), 370. <https://doi.org/10.22146/ijc.77887>

Saxena, T., Kaushik, P., & Mohan, M. K. (2015). Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82(3), 249-264. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.015>

Sen, K., Sinclair, J. L., Boczek, L. A., & Rice, E. W. (2011). Development of a sensitive detection method for stressed *E. coli* O157:H7 in source and finished drinking water by culture-qPCR. *Environmental Science & Technology*, 45(6), 2250-2256. <https://doi.org/10.1021/es103365b>



- Serra, B., Morales, M. D., Zhang, J., Reviejo, A., Hall, E. H., & Pingarrón, J. M. (2005). In-a-day electrochemical detection of coliforms in drinking water using a tyrosinase composite biosensor. *Analytical Chemistry*, 77(24), 8115-8121. <https://doi.org/10.1021/ac051327r>
- So, H., Park, D., Jeon, E., Kim, Y., Kim, B. S., Lee, C., Choi, S. Y., Kim, S. C., Chang, H., & Lee, J. Y. (2008). Detection and titter estimation of *Escherichia coli* using aptamer-functionalized single-walled carbon-nanotube field-effect transistors. *Small*, 4(2), 197-201. <https://doi.org/10.1002/smll.200700664>
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., & Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends In Analytical Chemistry*, 27(2), 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.004>
- Strehlitz, B., Nikolaus, N., & Stoltenburg, R. (2008). Protein detection with aptamer biosensors. *Sensors*, 8(7), 4296-4307. <https://doi.org/10.3390/s8074296>
- Su, L., Zhang, P., Dang, Z., Wang, Y., & Zhong, R. (2015). Rapid detection of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by surface-enhanced Raman scattering. *Optoelectronics Letters*, 11(2), 157-160. <https://doi.org/10.1007/s11801-015-4216-x>
- Sun, H., & Zu, Y. (2015). A highlight of recent advances in aptamer Technology and Its Application. *Molecules*, 20(7), 11959-11980. <https://doi.org/10.3390/molecules200711959>
- Upadhyayula, V. K., Deng, S., Mitchell, M. C., & Smith, G. B. (2009). Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: A review. *Science of The Total Environment*, 408(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.027>
- Van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., & Robbens, J. (2010). Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), 1178-1194.
- Van Nevel, S., Koetzsch, S., Proctor, C. R., Besmer, M. D., Prest, E. I., Vrouwenvelder, J. S., Knezev, A., Boon, N., & Hammes, F. (2017). Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Research*, 113, 191-206. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.065>
- Van Poucke, S. O., & Nelis, H. J. (1995). Development of a sensitive chemiluminometric assay for the detection of beta-galactosidase in permeabilized coliform bacteria and comparison with fluorometry and colorimetry. *Applied And Environmental*



- Microbiology, 61(12), 4505-4509. <https://doi.org/10.1128/aem.61.12.4505-4509.1995>
- Varshney, M., & Li, Y. (2007). Interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle–antibody conjugates for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. *Biosensors And Bioelectronics*, 22(11), 2408-2414. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.030>
- Vasilescu, A., Hayat, A., Gáspár, S., & Marty, J. L. (2017). Advantages of carbon nanomaterials in electrochemical aptasensors for food analysis. *Electroanalysis*, 30(1), 2-19. <https://doi.org/10.1002/elan.201700578>
- Vidić, J., Manzano, M., Chang, C., & Jaffrézic-Renault, N. (2017). Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Veterinary Research*, 48(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0418-5>
- Wan, J., Ai, J., Zhang, Y., Geng, X., Gao, Q., & Cheng, Z. (2016). Signal-off impedimetric immunosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep19806>
- Water--Eph-Dw, D. (2016). Coliform bacteria in drinking water. Washington State Department of Health. <https://doh.wa.gov/community-and-environment/drinking-water/contaminants/coliformTotal>
- Watson, L., Maynard, P., Cullen, D. C., Sethi, R. S., Brettle, J., & Lowe, C. R. (1987). A microelectronic conductimetric biosensor. *Biosensors*, 3(2), 101-115. [https://doi.org/10.1016/s0265-928x\(87\)80003-2](https://doi.org/10.1016/s0265-928x(87)80003-2)
- WHO (1994) World Health Organization. Guinebra, Suiza
- Wu, G., Dai, Z., Tang, X., Lin, Z., Lo, P. K., Meyyappan, M., & Lai, K. W. C. (2017). Graphene field-effect transistors for the sensitive and selective detection of *Escherichia coli* using pyrene-tagged DNA Aptamer. *Advanced Healthcare Materials*, 6(19). <https://doi.org/10.1002/adhm.201700736>
- Wu, Q., Hamilton, T., Nelson, W. H., Elliott, S., Sperry, J. F., & Wu, M. T. (2001). UV Raman Spectral Intensities of *E. coli* and Other Bacteria Excited at 228.9, 244.0, and 248.2 nm. *Analytical Chemistry*, 73(14), 3432-3440. <https://doi.org/10.1021/ac001268b>
- Wu, S., Duan, N., Shi, Z., Fang, C., & Wang, Z. (2014). Simultaneous Aptasensor for Multiplex Pathogenic Bacteria Detection Based on Multicolor Upconversion Nanoparticles Labels. *Analytical Chemistry*, 86(6), 3100-3107. <https://doi.org/10.1021/ac404205c>
- Wu, W., Li, J., Pan, D., Jiang, L., Song, S., Rong, M., Li, Z., Gao, J., & Lü, J. (2014). Gold Nanoparticle-Based Enzyme-Linked Antibody-Aptamer Sandwich Assay for Detection of Salmonella Typhimurium. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(19),



16974-16981. <https://doi.org/10.1021/am5045828>

- Wu, W., Zhang, J., Zheng, M., Zhong, Y., Yang, J., Zhao, Y., Wu, W., Ye, W., Wen, J., Wang, Q., & Lu, J. (2012). An Aptamer-Based Biosensor for Colorimetric Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *PLOS ONE*, 7(11), e48999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048999>
- Wu, Y., Phillips, J. A., Liu, H., Yang, R., & Tan, W. (2008). Carbon Nanotubes Protect DNA Strands during Cellular Delivery. *ACS Nano*, 2(10), 2023-2028. <https://doi.org/10.1021/nn800325a>
- Wutor, V., Togo, C., Limson, J., & Pletschke, B. I. (2007). A novel biosensor for the detection and monitoring of β -d-galactosidase of faecal origin in water. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1512-1517. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.039>
- Xie, C., & Li, Y. (2003). Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques. *Journal of Applied Physics*, 93(5), 2982-2986. <https://doi.org/10.1063/1.1542654>
- Xu, M., Wang, R., & Li, Y. (2017). Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta*, 162, 511-522. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.050>
- Yang, N., Chen, X., Ren, T., Zhang, P., & Yang, D. (2015). Carbon nanotube-based biosensors. *Sensors And Actuators B: Chemical*, 207, 690-715. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.10.040>
- Zaccone, R., Crisafi, E., & Caruso, G. (1995). Evaluation of fecal pollution in coastal Italian waters by immunofluorescence. *Aquatic Microbial Ecology*, 9, 79-85. <https://doi.org/10.3354/ame009079>
- Zelada-Guillén, G. A., Bhosale, S. V., Riu, J., & Rius, F. X. (2010). Real-Time potentiometric detection of bacteria in complex samples. *Analytical Chemistry*, 82(22), 9254-9260. <https://doi.org/10.1021/ac101739b>
- Zelada-Guillén, G. A., Riu, J., Düzgün, A., & Rius, F. X. (2009). Immediate detection of living bacteria at ultralow concentrations using a carbon nanotube based potentiometric aptasensor. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(40), 7334-7337. <https://doi.org/10.1002/anie.200902090>
- Zelada-Guillén, G. A., Sebastián-Avila, J. L., Blondeau, P., Riu, J., & Rius, F. X. (2012). Label-free detection of *Staphylococcus aureus* in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers. *Biosensors And Bioelectronics*, 31(1), 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.10.021>



- Zhang, C., Lv, X., Han, X., Man, Y., Saeed, Y., Qing, H., & Deng, Y. (2015). Whole-cell based aptamer selection for selective capture of microorganisms using microfluidic devices. *Analytical Methods (Print)*, 7(15), 6339-6345.
<https://doi.org/10.1039/c5ay01016k>
- Zhang, Y., Zhu, L., He, P., Zi, F., Hu, X., & Wang, Q. (2019). Sensitive assay of *Escherichia coli* in food samples by microchip capillary electrophoresis based on specific aptamer binding strategy. *Talanta*, 197, 284-290.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.040>
- Zhao, Y., Wang, H., Jia, G., & Li, Z. (2018). Application of Aptamer-Based Biosensor for Rapid Detection of Pathogenic *Escherichia coli*. *Sensors*, 18(8), 2518.
<https://doi.org/10.3390/s18082518>
- Zuo, P., Li, X. J., Domínguez, D. C., & Ye, B. (2013). A PDMS/paper/glass hybrid microfluidic biochip integrated with aptamer-functionalized graphene oxide nano-biosensors for one-step multiplexed pathogen detection. *Lab On A Chip*, 13(19), 3921. <https://doi.org/10.1039/C3lc50654a>



ANEXOS

1. Artículo en prensa

El 2024-02-07 12:37, Prof. Katarzyna Wrobel escribió:

Dear Professor Nikola Batina

I have received the Referee's comments on the revised version of your manuscript and I am pleased to inform you that this work entitled "Fabrication of a highly sensitive nanoaptasensor for rapid and direct detection of Escherichia Coli (NASEc) in drinking water: Fabrication of a highly sensitive nanoaptasensor for rapid and direct detection of Escherichia Coli (NASEc) in drinking water" has been accepted for publication in the **Journal of the Mexican Chemical Society. The editorial team will contact you for proofreading.**

With kind regards,

Fabrication of a highly sensitive nanoaptasensor for rapid and direct detection of *Escherichia coli* (NASEc) in drinking water

Elia Velázquez ^{a,b,c}, Oscar Monroy Hermosillo ^a, Florina Ramírez Vives ^b, Michel Picquart ^d, Israel Morales-Reyes ^e, Paulina Hernández Garcés ^e, Antonio Abad Sánchez ^a, Eugenio Gómez Reyes ^f and Nikola Batina ^{*g}

^a Posgrado en Biotecnología (Ref. 001466), DCBS, UAM-L

^b Laboratorio de Tratamiento de Aguas y Microbiología Ambiental, Departamento de Biotecnología, DCBS, UAM-I, CDMX 09340, México

^c Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, Departamento de Química, DCBI UAM-I, CDMX 09340, México

^d Departamento de Física, DCBI, UAM-I, CDMX 09340, México

^e Departamento de Diseño Gráfico, CyAD, UAM-A, CDMX 02128, México

^f Ingeniería Hidrológica, Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, DCBI, UAM-A, CDMX 09340, México

^{*Corresponding autor at:} Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular, DCBI, UAM-I, Av. San Rafael Atlixco 189, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, CDMX 09340, México (N Batina). Tel.: +52 55 5804 4939.

E-mail address: bani@xanum.uam.mx

ABSTRACT

In this work, a novel nanoaptasensor (NASEc) for rapid and direct detection of *Escherichia coli* (*E. coli*) in drinking water was designed and constructed. The sensor is based on electrical conductivity measurements between a set of bare gold electrodes and a set of modified gold electrodes. The modified electrode set was covered with an aptamer layer (A_{EC}) to improve affinity for *E. coli* and better binding to the electrode surface. Using the modified nanostructured layer with multiwall carbon nanotubes (MWCNT), the high sensitivity of the sensor was achieved and allowed to detect

the presence of *E. coli* in quantities of a single colony forming units (CFU) per 100 mL. This sensitivity meets the relevant international drinking water quality standards. Each step in the process of the NASEc fabrication was verified and proved by different analytical techniques at a nanometric and molecular level: UV-vis and Raman Spectroscopy, AFM, and SEM. This portable, simple, and reusable nanoaptasensor with high selectivity and affinity offers faster detection (3 min) in the presence of *E. coli* compared to conventional colony forming units (CFU) counting-based methods (24 to 48 h). NASEc is designed for direct measurements without any pretreatment of samples and is helpful in potable water within a conductivity range of 50 to 1300 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Keywords: *E. coli*, aptamer, aptasensor, drinking water

Resumen

En este trabajo, se diseñó y construyó un nuevo nanoaptasensor (NASEc) para la detección rápida y directa de *Escherichia coli* (*E. coli*) en agua potable. El sensor se basa en mediciones de conductividad eléctrica entre un conjunto de electrodos de oro sin modificar y un conjunto de electrodos de oro modificado. El conjunto de electrodos modificado se cubrió con una capa de aptámero (A_{c10}) para mejorar la afinidad por *E. coli* y una mejor unión a la superficie del electrodo. Utilizando la capa nanoestructurada modificada con nanotubos de carbono de paredes múltiples (MNTC) se logró la alta sensibilidad del sensor y permitió detectar la presencia de *E. coli* en cantidades de una sola unidad formadora de colonias (UFC) por 100 ml. Esta sensibilidad cumple con los estándares internacionales pertinentes de calidad del agua potable. Cada paso en el proceso de fabricación de NASEc fue verificado y probado mediante diferentes técnicas analíticas a nivel nanométrico y molecular: espectroscopia UV-vis y Raman, AFM y SEM. Este nanoaptasensor portátil, simple y reutilizable con alta selectividad y afinidad ofrece una detección más rápida (3 min) en presencia de *E. coli* en comparación con los métodos convencionales basados en el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (24 a 48 h). NASEc está diseñado para mediciones directas sin ningún tratamiento previo de muestras y es útil en agua potable dentro de un rango de conductividad de 50 a 1300 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Palabras claves: *E. coli*, aptámero, aptasensor, agua potable

2. Patente obtenida

**ECONOMÍA**
SECRETARÍA DE ECONOMÍA

**IMPI**
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

TÍTULO DE PATENTE No. 387612

Titular(es):	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Domicilio:	Prolongación Canal de Miramontes No. 3855, Colonia Ex-Hacienda San Juan de Dios, 14387, Delegación Tlalpan, Ciudad de México, MÉXICO
Denominación:	BIOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> Y DISPOSITIVO QUE LO COMPRENDE.
Clasificación:	CIP: C12Q1/68; C02F1/00; C12Q1/04 CPC: C12Q1/68; C12Q1/04; C02F2103/00; C02F2209/00
Inventor(es):	EUGENIO GÓMEZ REYES; ÓSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO; NIKOLA BATINA SKELEDZIJA; DONACIANO JIMÉNEZ VÁZQUEZ; ANTONIO RODRIGO ABAD SÁNCHEZ; ROBERTO MARTÍN CONSTANTINO TOTO; DELIA PATRICIA MONTERO CONTRERAS; FELIPE OMAR TAPIA SILVA; FLORINA RAMÍREZ VIVES; ELIA VELÁZQUEZ MEJÍA; ISRAEL MORALES REYES; PAULINA HERNÁNDEZ GARCÉS; ARTURO SOLÍS GARCÍA; JESÚS ANTONIO HERNÁNDEZ CADENA

SOLICITUD

Número:	Fecha de Presentación:	Hora:
MX/a/2016/016823	16 de Diciembre de 2016	13:41

Vigencia: Veinte años
Fecha de Vencimiento: 16 de diciembre de 2036
Fecha de Expedición: 25 de octubre de 2021

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2ª fracción V, 6ª fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 8ª fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3ª fracción V inciso a), sub inciso ii), 4ª y 12ª fracciones I y II del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5ª fracción V inciso a), sub inciso i), 16 fracciones I y II y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3ª y 5ª fracción I y antepenúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válida de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autenticidad, se podrá comprobar en www.gob.mx/impdi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1ª fracción III, 2ª fracción VI, 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:
EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO|50001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACIÓN
TRIBUTARIA|56|MX/2021/104012|MX/a/2016/016823|Título de patente normal|1220|RRGO|Paq(s)
1|y0U9Pa+6q8Mcas2n99JLwZ2eM+

Sello Digital:
BUVVRv1+0bqJIEH9SLegqe+Odt4E9VTZ7UJB8I++7CvUrUeQXST4Lp5d9waY/BH7nXQ1H58lpOouMQzMeB3
HX95AAzdNnd440v59NjwqKRJqUGowQwaQvAhusS2mqv6DmkCP7+Bgnefn9Yc5q9p64gpr+9MSYFcu4n
VDn00MURdy@Wu8anMboR9nWwq5GHMejWLCaIX+Ro9KFcZ5mhXxUJ7ur9MRA28700dMXdExyOtmWW98RjJst
QXEnr0wLcE3EdeWm8|YimTG78GKf+GPePaK9gSV4JXAqJcp4FTFOcTuQFSTurEODw+


MX/2021/104012
www.gob.mx/impdi

Arenal No. 550, Pueblo Santa María Tepepan, Ciudad de México, C.P. 16020. CDMX.
Creatividad para el Bienestar



3.Tabla A Datos de conductividad de muestras de agua potable de algunos puntos de la CDMX.

Tabla A. Conductividad eléctrica de diferentes muestras de agua:

Muestra de agua	Equipo y Conductividad			
	(sonda con electrodo de grafito comercial) μS/cm			
	H198312	H198311	H198308-PWT	H198309- UPW
Agua potable Bonafón garrafón de 20 L (Comercial)	320	306	-	-
San Fernando Del. Magdalena Contreras (R.D.) ^a	210	167	170.7	-
Agua potable Ciel botella de 600ml (Comercial)	300	253	-	-
Agua comercial Bonafón botella de 600 ml (Comercial)	250	205	-	-
Agua potable Del. Iztapalapa (R.D.) ^a	1820	1531	-	-
Agua destilada garrafón VENEC (laboratorio)	360	270	0.1 -0.2	0.630

Red de distribución



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00789

Matrícula: 2141800858

Detección en Línea de la
Calidad Microbiológica del
Agua potable.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas
del día 16 del mes de octubre del año 2024 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES
DRA. ELIZABETH HERNANDEZ PEREZ
DRA. REFUGIO RODRIGUEZ VAZQUEZ
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de
Secretario el último, se reunieron a la presentación de la
Disertación Pública cuya denominación aparece al margen,
para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: ELIA VELAZQUEZ MEJIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento
de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma
Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la
interesada el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Elia Velazquez Mejia

ELIA VELAZQUEZ MEJIA
ALUMNA

REVISÓ

Rosalía Serrano de la Paz
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

José Luis Gómez Olivares
DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

Florina Ramírez Vives
DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES

VOCAL

Elizabeth Hernández Pérez
DRA. ELIZABETH HERNANDEZ PEREZ

VOCAL

Refugio Rodríguez Vázquez
DRA. REFUGIO RODRIGUEZ VAZQUEZ

SECRETARIO

Pablo Gustavo Damian Matzumura
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA