

Chapter 14.2. DESARROLLO DE UN APTASENSOR PARA DETERMINAR LA CALIDAD DEL AGUA POTABLE EN TIEMPO REAL

Elia K. Velazquez (1); Israel Morales Reyes (2); Oscar Monroy Hermosillo (1); Nikola Batina* (2)

(1) CBS, Depto de Biotecnología UAM-I, México D.F, México.

(2) CBI, Depto de Química, Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular UAM-I, México D.F, México.

ABSTRACT

Nowadays, the microbiological methods for the water quality evaluation require minimum 48 hours and special laboratory installations. They are not suitable for use in homes or in the field. Therefore exists a clear necessity to develop a portable device which will be able to measure quality of water, especially by means of microbiological characterization, directly, in real time and with high precision.

In this work we present results of the preliminary development of a biosensor which satisfies the mentioned needs in terms of detection of contamination by bacteria *E.coli*. The biosensor is based on the measurement of electrolytic conductivity of water samples and it detects *E.coli* due to the specific affinity between carbon nanotube (CNT) electrodes modified by different aptamers (E1, E2 and E10) and the mentioned bacteria. Here, we present the basic principles of such aptasensor, and determination of *E.coli* in 23×10^5 UFC/ml tap water samples.

The obtained results shows that electrolytic conductivity of water samples in presence of *E.coli* decay approximately for 33% (0.36 mS/cm to 0.24 mS/cm). We found this difference sufficient enough to be a base for development of new type of aptasensor. In addition to the decay of the electrolytic conductivity we also visually confirmed a preferential adsorption (accumulation) of the *E.coli* over the modified aptamer-CNT surface by SEM, which clearly shows high affinity of bacteria for such modified sensor surface. Optimization, calibration and further development of the present aptasensor are in the progress.

RESUMEN

Actualmente, los métodos que se usan en México para determinar la calidad microbiológica del agua (NMP y filtración por membrana, NOM 127) están basadas en métodos estandarizados internacionalmente (APHA) que requieren de por lo menos 48 horas de incubación para detectar bacterias fecales y de 2 a 3 días para tipificarlas. Estos métodos no están al alcance del consumidor de agua potable, por lo que se propone proporcionar una tecnología que le permita determinar la calidad microbiológica del agua que consume.

*Author for correspondence: bani@xanum.uam.mx

El objetivo de este trabajo es desarrollar un biosensor que permita conocer la calidad microbiológica del agua en tiempo real mediante la nanobiotecnología, empleando aptámeros específicos (E1, E2 y E10) y nanotubos de carbono (NTC) para medir el efecto que tienen las bacterias (*Escherichia coli*) sobre la conductividad electrolítica del agua.

En electrodos de grafito modificados con NTC se observó el efecto de la inmovilización de los aptámeros por enlace químico sobre su superficie para la detección de bacterias *E. coli* suspendidas en agua. Con tiempos de contacto de 5 min se midió la conductividad de los electrodos modificados con y sin aptámeros (E-NTC y E-NTC-A) en una suspensión de *E.coli* (23×10^5 UFC/mL) y agua de la red de Iztapalapa (ARI). Los resultados muestran que hay una disminución en la conductividad electrolítica del ARI al comparar el blanco (0.36 mS/cm, agua sin bacterias), la suspensión bacteriana con y sin aptámeros (0.31 mS/cm y 0.24 mS/cm, respectivamente). Los resultados sugieren una mayor presencia de bacterias atrapadas en el electrodo modificado con aptámeros que sin ellos. Para corroborar esta suposición se tomaron micrografías en todos los experimentos con microscopio electrónico de barrido (SEM). La optimización del aptasensor se encuentra en proceso para incrementar la sensibilidad, calibración y selectividad.

Keywords: Aptasensor, aptamers, carbon nanotubes

Introducción

El agua para uso y consumo humano debe de estar libre de patógenos, razón por lo cual se han desarrollado métodos de control de calidad microbiológica del agua (APHA, 1995). Dado que la presencia de patógenos en el agua proviene principalmente de contaminación fecal, se han utilizados como indicadores a los microorganismos fecales, coliformes totales, *estreptococos fecales* y *Clostridium perfringens* (AWWA, 1999). En México la calidad microbiológica del agua, está normada por la NOM - 127-SSA1-1994, la cual está basada en métodos estandarizados internacionales (APHA, 1995) que a su vez se basan en métodos dependientes de cultivo, medios selectivos y en pruebas bioquímicas, que requieren incubarse por 48 hrs. Otros métodos son los moleculares: la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) desarrollado por Bej *et al.* (1991), que no requieren de incubación, pero se requiere de un concentrado de la muestra y de su extracción de DNA; recientemente la técnica de PCR en tiempo real ha revolucionado el diagnóstico de microorganismos permitiendo su cuantificación con alta sensibilidad (Lazcka *et al.*, 2007; García-Aljaro *et al.*, 2010). Otro método utilizado se basa en el uso de anticuerpos como el Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés), el cual ha permitido acortar el tiempo de análisis mas no una detección en tiempo real (Leonard *et al.*, 2003). Frente a estos procedimientos analíticos que requieren de equipo especializado y personal calificado los biosensores tienen el potencial de detectar en tiempo real, con alta sensibilidad,

facilitando su automatización e integración a otros sistemas de medición. En los últimos años se ha desarrollado la tecnología de biosensores para la detección de microorganismos patógenos o indicadores de calidad en alimentos y agua, (Lazcka *et al.* 2007) utilizando nanomateriales como: NMP (nanopartículas de metal), NTC (nanotubos de carbono); en combinación de aptámeros (del latín *aptus* que significa “fijar” y del griego *meros* que significa “partícula”) como elementos de reconocimiento, (Yang *et al.* 2011). Los aptámeros son moléculas funcionales derivadas de los ácidos nucleídos (ssDNA, RNA) con una estructura tridimensional específica que permite unirse con alta afinidad a la molécula blanco u objetivo y que son diseñados con base en el método de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX por sus siglas en inglés), Wu *et al.* (2012).

Debido a sus características físicas y que son excelentes conductores de electricidad, los NTC de alta resistencia se han utilizado para la fabricación de aptasensores modificando la superficie del electrodo y amplificando la señal eléctrica. García-Aljaro *et al.* (2010), desarrollaron un aptasensor para detectar a *Salmonella typhi*, inmovilizando el aptámero a los NTC y midiendo una señal electroquímica, logrando una sensibilidad de 5 UFC/mL en 20 min. En otros trabajos como el de Zelada-Guillén *et al.* (2013) desarrollaron un aptasensor para la determinación rápida y sensible de *E.coli* y *Salmonella typhi* obteniendo una sensibilidad de 6 UFC/mL en leche y 26 CFU/mL en jugo de manzana.

En la literatura no existen trabajos sobre desarrollo de aptasensores basados en la medición de conductividad electrolítica y la determinación de la presencia de *E.coli* en tiempo real. Por lo tanto el objetivo de este trabajo es desarrollar un biosensor que permita conocer la calidad microbiológica del agua de una forma rápida y sencilla, con un dispositivo portátil para trabajo en campo. Para esto se deben evitar los métodos microbiológicos donde se requiere de un pretratamiento e incubación de las muestras de agua para detectar la presencia de microorganismos. En su lugar, queremos desarrollar un biosensor novedoso con principios de nanotecnología mediante el uso de NTC y de aptámeros desarrollados con técnicas de biotecnología para la detección de microorganismos, dotando a los usuarios de los servicios de distribución del agua (red, pipa o pozo) con un instrumento que les permita determinar la calidad microbiológica del agua en el momento que lo deseen.

Materiales y Métodos

Microorganismos: Cepa de *E.coli* aislada de agua potable en el laboratorio de microbiología ambiental y tratamiento de aguas, UAM-I.

Aptámeros: específicos para proteínas de membrana exterior de *E.coli* (Kim *et al.* 2014), se mandaron sintetizar en Sigma Inc.

Environmental Biotechnology and Engineering – 2014

Las secuencias de los aptámeros son las siguientes: 5'GCAATGGTACGGTTTGTCTTG CTGGCGCATCCACTGAGCGCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTA3' (aptámero E1) 5'GCAATGGTACGGTACTTCCGTTGCACTGTGCGGCCGAGCTGCCCCCTGGTTTGT GAATACCCTGGGCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA3' (aptámero 10) 5'GCA ATG GTACGGTACTTCCCCATGAGTGTTGTGAAATGTTGGGACACTAGGTGGCATAGAG CCGCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA3' (aptámero 2).

Medios de cultivo

Medio de Conservación y propagación para *E. coli*: Medio Luria (LB) sólido en tubo inclinado para stock de trabajo conservadas a 4°C y medio líquido LB para propagar y medio Eosina y azul de metileno (Bioxon) para la cuenta en placa de *E. coli*.

Preparación de la suspensión bacteriana. Se tomó un volumen de 1 mL del cultivo de *E. coli* y se centrifugó a 12000 g por 15 min y el sobrenadante se descartó y el pellet fue resuspendido en un mililitro de solución salina 0.85% estéril, posteriormente se midió la densidad óptica de la suspensión a 540 nm en un espectrómetro UV-VIS Hach. Cuenta en placa: se realizaron diluciones seriadas 1:10, se inóculo y se cuantificó en placa en el medio azul de metileno y eosina de acuerdo al método de cuenta en placa (EPA, 1995).

Funcionalización de NTC. Se realizó mediante un tratamiento con una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico en una relación 3:1 y sonificando por 2 h, posteriormente se centrifugó a 12 000 g por 20 min y se lavó dos veces con agua bidestilada de acuerdo al protocolo propuesto por Evtugyn *et al.* (2008).

Fabricación de electrodo de grafito. Un microelectrodo de grafito de 5mm de diámetro fue utilizado para el desarrollo del aptasensor, el electrodo fue limpiado en acetona por sonicación durante 10 min, seguido por 10 min en agua bidestilada, posteriormente se secó a temperatura ambiente durante 5 min.

Fabricación del aptasensor. La suspensión de nanotubos de carbono fue preparado pesando 20 mg de NTC y suspendiendo en SDS (dodecilsulfato sódico) y seguido por 15 min de sonicación en un baño de agua. La suspensión fue centrifugada a 12000 g por 30 min y lavada dos veces con agua bidestilada. La superficie del electrodo se modificó con la suspensión de nanotubos de carbono, aplicando 15 µl.

Inmovilización de aptámeros en NTC. Adsorción Física. Se realizó mediante la adsorción directa del aptámero a la superficie nanoestructurada del electrodo de carbono, de acuerdo al protocolo de Ocaña (2011).

Medición electroquímica. La medición de la conductividad electrolítica se realizó utilizando un conductímetro (Modelo H I98312, Hanna Instruments Inc., USA).

Resultados y Discusión

Construcción del aptasensor

Se desarrolló un primer prototipo de aptasensor para la detección de *E.coli*, el cual consistió en dos electrodos de grafito de 5 mm de diámetro posicionados a una distancia determinada a través de los cuales se hace circular una corriente eléctrica alternante (Figura 1) donde la conductividad electrolítica depende de la concentración de iones presente en el espacio entre los dos electrodos, la presencia de un mayor número de iones aumenta la conductividad, además la presencia de especies orgánicas o material biológico no es registrada por su difusión lenta. Sin embargo, en caso de una afinidad especial entre la superficie de los electrodos y material orgánico en la solución, permite el registro de este tipo de especie. Este es el principio básico de diseño del sensor: la interacción de aptámeros fijados en superficie de electrodo y la presencia de *E.coli* en solución.

En la figura.2, se muestra el desarrollo de la metodología para la fabricación del biosensor. En la primera etapa el electrodo de grafito es recubierto con NTC con una capa delgada (aprox 1 mm) y homogénea que incrementan de manera notable la superficie del electrodo y presentan numerosos sitios para poder inmovilizar a los aptámeros. Con esto se logra tener una superficie cubierta casi por completo de aptámeros con lo que se incrementa la posibilidad de que *E.coli* sea detectada en la superficie.

Previamente, los NTC fueron funcionalizados en una mezcla de ácidos que permiten que los aptámeros se anclen a los NTC de manera eficiente (Figura 4). Posteriormente se dejaron los electrodos sumergidos en una mezcla de aptámeros (E1, E2 y E10), durante 12h, para inmovilizarlos a los nanotubos.

El principio de esta técnica es la adsorción física directa de aptámero en la superficie del electrodo a través de interacciones débiles con los sitios activos del sustrato, en este caso el grafito recubierto con NTC. La adsorción física es el método más simple de inmovilización en superficies debido a que no requiere reactivos especiales ni utilización de aptámeros funcionalizados. Las principales desventajas que presentaron: posibilidad de desorción del aptámero de la superficie y adsorción inespecífica en la superficie de electrodo por parte de la molécula blanco.

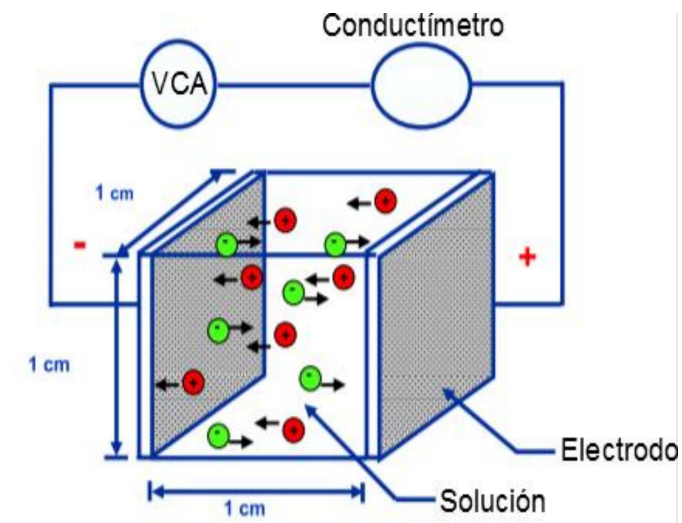


FIGURA 1. Esquema de un medidor de conductividad electrolítica

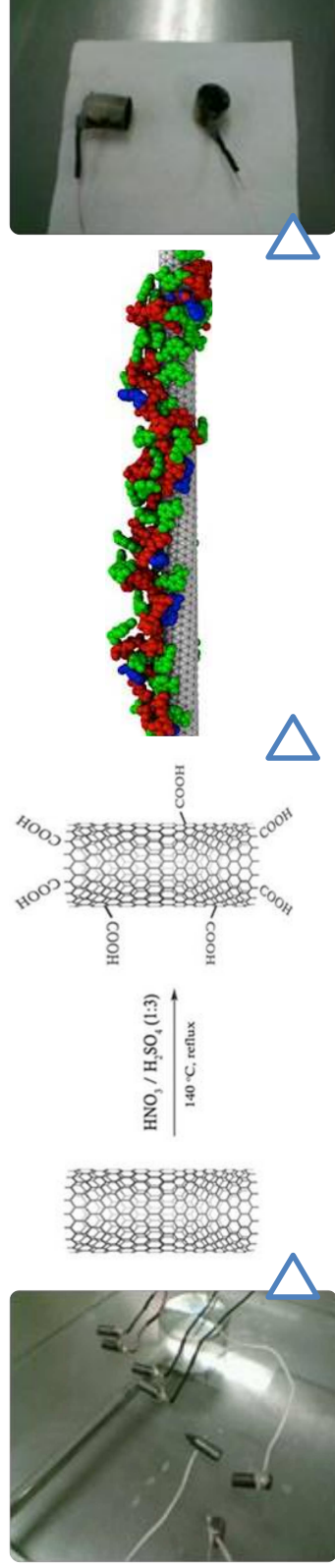


FIGURA 2. Proceso de fabricación general del aptasensor

Determinación de *E. coli*

Para verificar el funcionamiento del aptasensor construido se utilizaron diferentes pruebas con soluciones modelo como: agua de la llave con y sin adición de suspensiones de *E. coli* con diferentes concentraciones.



FIGURA 3. Proceso de medición con aptasensor

El aptasensor basado en NTC como parte del traductor y los aptámeros como elemento de reconocimiento, es capaz de detectar *E. coli* en tiempo real. Los aptámeros usados son específicos para este microorganismo. La respuesta del aptasensor fue medida en una suspensión bacteriana de 23×10^5 UFC/mL, dando una respuesta de 0.31 mS/cm, como se muestra en la tabla 1. Este resultado es un ejemplo de los varios obtenidos para las diferentes condiciones de los experimentos, en caso particular se utilizaron electrodos de 5 mm de diámetro con distancia entre electrodos de 3 mm.

TABLA1. Detección de *E. coli* mediante electrodos de grafito modificados con NTC y áptámeros

Electrodo	Conductividad (mS/cm)	
	Agua de la llave (Iztapalapa)	Agua de la llave + <i>E. coli</i> 23×10^5 UFC/mL
Grafito + NTC	0.36	0.31
Grafito + NTC + Aptamero	-	0.24

Con el propósito de verificar la interacción de la bacteria *E.coli* y los aptámeros previamente fijados, se hizo un análisis por microscopia de barrido. Los resultados presentados en las micrografías a, b y c en la figura 3 claramente muestran un electrodo limpio de grafito y la bacteria *E.coli* adsorbida sobre la película de nanotubos respectivamente. Estos resultados muestran de manera clara la eficiencia del aptasensor y sustenta los cambios de conductividad electrolítica presentados en la tabla 1.

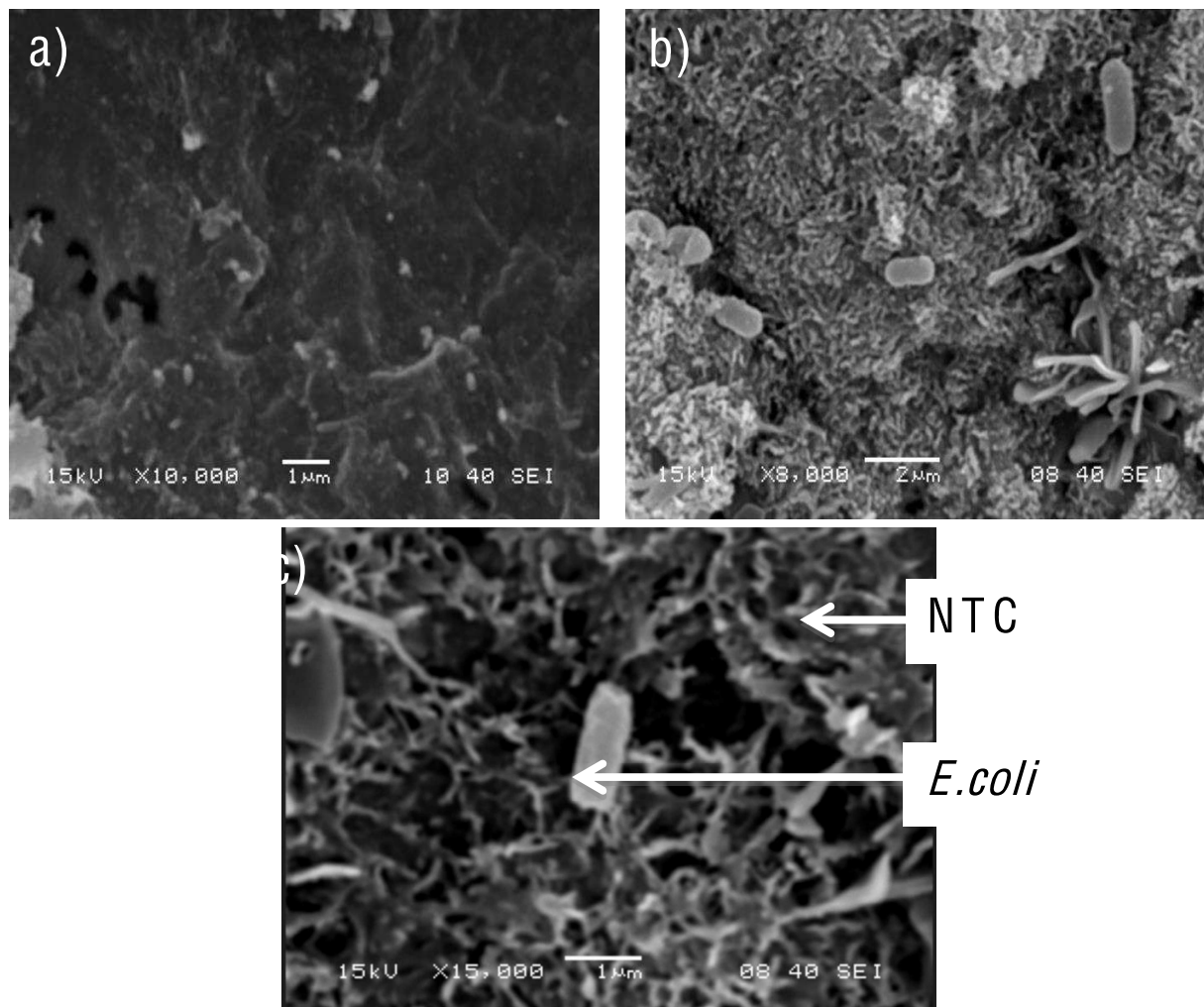


FIGURA 4. Micrografía de sustrato (grafito) sin evidencia de *E.coli* (a), (b) y (c), la superficie de electrodo de grafito con NTC y aptámeros con algunas células de *E.coli* tamaño (2x0.5 μm).

Los resultados obtenidos enseñan claramente que se construyó un aptasensor que funcionalmente identifica *E. coli* en agua; sin embargo, la optimización en términos de

determinar bajas concentraciones entre 1 y 10 CFU se necesita desarrollar. El trabajo está en proceso de mejorar sensibilidad, especificidad y calibración detallada de este aptasensor.

Conclusión

Se desarrolló un aptasensor capaz de detectar *E.coli* en niveles de 23×10^5 UFC/mL de forma rápida, y sencilla; utilizando un electrodo de grafito modificando la superficie con NTC y aptámero. Es importante señalar que estamos en la etapa de optimización de las concentraciones de aptámero y tiempo de regeneración y de aumentar la sensibilidad del aptasensor así como determinar su vida útil.

Bibliografía

- AWWA, American Water Works Association. (1999). *Water Quality and Treatment. A Handbook of Community Water Supplies*. McGraw-Hill, Inc. New York. 4a.ed.1194 pp.
- APHA, American Public Health Association American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, D.C.22 Ed.
- Bej, A.K.,J.L.Haff ,R.M.Atlas.(1991). Detection of Escherichia and Shigella spp.in water by using the Polymerase Chain Reaction and Gene Probes for uid.*App.Environ.Microbiol.*57,4,1013-1017.
- Evtugyn G.,Porfireva A.,Ryabova M.,Hianik T., (2008). Aptasensor for Thrombin Based on Carbon Nanotubes-Methylene Blue Composites. *Electroanalysis*.21,2310-2316.
- García-Aljaro C.,Cella N.L.,Shirele J. D.,Park M.,Muñoz F.J.,Yates V.M.,Mulchandani. (2010). A.Carbon nanotubes-based chemiresistive biosensors for detection of microorganisms. *Biosensors and Bioelectronics*.26, 1437-1441.
- Kim S.K.,Chung J.,Song M.Y.,Jung J.,Byoung.(2014). Aptamer cocktails: Enhancement of sensing signals compared to single use of aptamers for detection of bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*.54, 195-198.
- Lazcka O., Del Campo F. Muñoz X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Rew*, 22, 1205-1217.
- NOM-127-SSA1-1994 *Norma oficial mexicana*, Salud ambiental agua para uso y consumo humano. límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Ocaña-Tejeda (2011). Aptasensores impedimétricos para la detección de trombina. *Tesis de Maestría*, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona, España.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th. Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 1995.
- Wu W., Li M., Wang Y., Ouyang H., Wang L., Li C., Cao Y., Qing-he M. and Lu J.,(2012)b. Aptasensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Nanoscale Research Letters*.7:658-665.
- Yang L., Zhang X.,Ye M.,Jiang J., Yang R., Fu T., Chen Y., Wang K., Liu Ch., Tan W., (2011).Aptamer-conjugated nanomaterials and Their applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63,1361-1370.
- Zelada-Guillén GA.,Blondeau P.,Rius X.,Riu J.(2013) .Carbonotube-based aptasensors for the rapid and ultrasensitive detection of bacteria. *Methods* 63,233-238.

Lista de Autores:

MC. ***Elia K. Velázquez***, Candidato a presentar.

UAM-I, CBS, Depto de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco 189, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F.

Tel.: 58044907

E-mail: velazquezkarina@ hotmail.com

Dr. Profesor Nikola Batina

UAM-I, CBI, Depto de Química, Lab. de Nanotecnología e Ingeniería Molecular , Av. San Rafael Atlixco 189, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F.

Tel.: 58044939

E-mail: bani@xanum.uam.mx

M.C. Israel Morales Reyes

UAM-I, CBI, Lab. de Nanotecnología e Ingeniería Molecular , Av. San Rafael Atlixco 189, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F.

Tel.: 58044939

E-mail: israel79@hotmail.com

Dr. Profesor Oscar Monroy-Hermosillo, Autor para correspondencia.

UAM-I, CBS, Depto de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco 189, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F.

Tel.: 58046408

E-mail: monroy@xanum.uam.mx

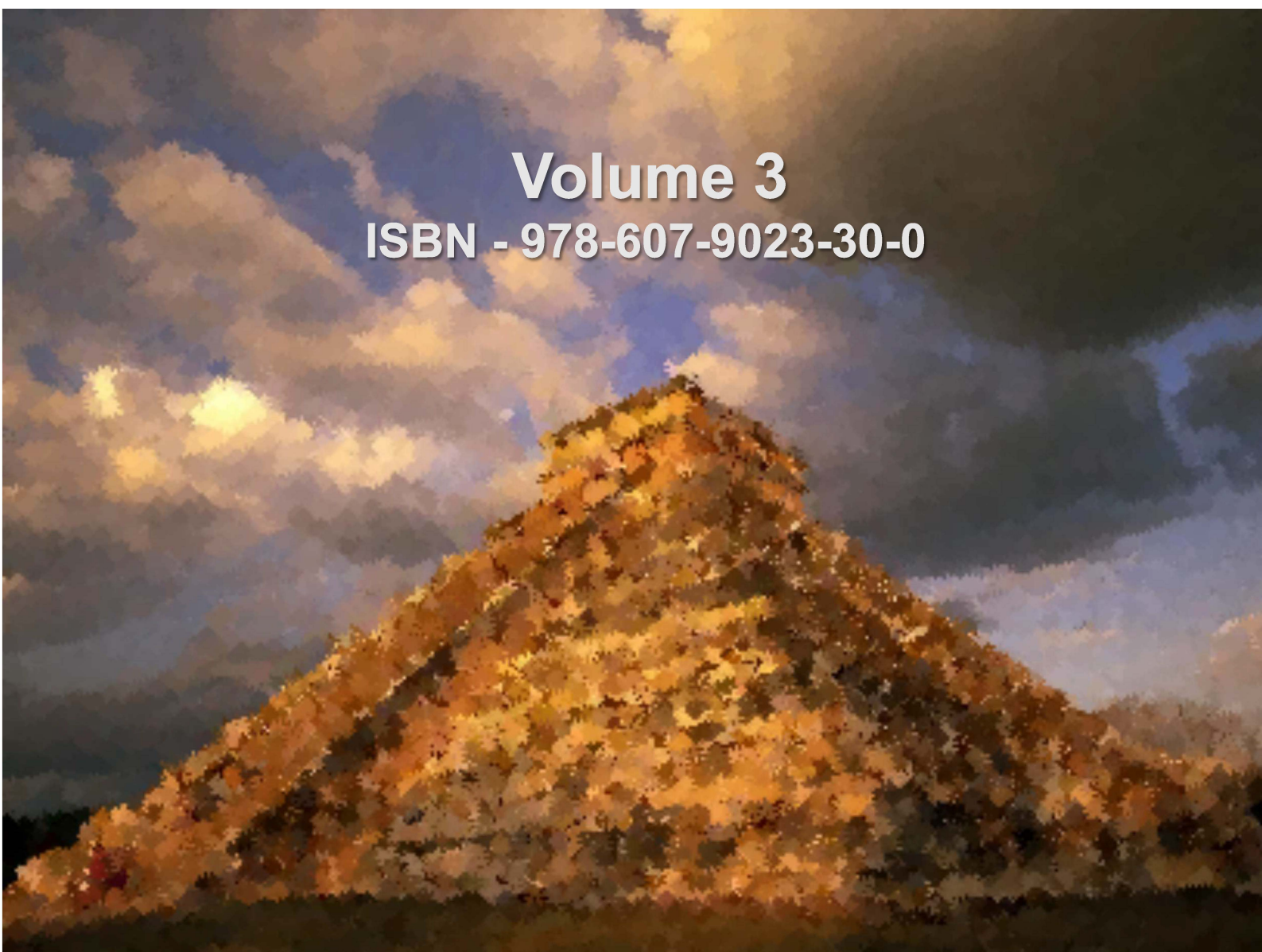
Agradecimientos

Los autores agradecen a: MC. Antonio Abad por la ayuda con el diseño del dispositivo; Dr. José Sepúlveda y MC. Cristina Acosta por la ayuda con las micrografías SEM; SECITI del GDF por el financiamiento del proyecto SECITI054/2013 “Sensor doméstico de sensibilidad de agua”; al CONACyT por la beca de Doctorado (EKVM).

Environmental Biotechnology and Engineering - 2014

Volume 3

ISBN - 978-607-9023-30-0



**Poggi-Varaldo, H.M.; Bretón-Deval, L.M.;
Camacho-Pérez, B.; Escamilla-Alvarado, C.;
Escobedo-Acuña, G.; Hernández-Flores, G.;
Muñoz-Páez, K.M.; Romero-Cedillo, L.;
Sastre-Conde, I.; Macarie, H.; Solorza-Feria, O.;
Ríos-Leal, E.; Esparza-García, F.**

**Poggi-Varaldo, H.M.; Bretón-Deval, L.M.;
Camacho-Pérez, B.; Escamilla-Alvarado, C.; Escobedo-
Acuña, G.;
Hernández-Flores, G.; Muñoz-Páez, K.M.; Romero-
Cedillo, L.;
Sastre-Conde, I.; Macarie, H.; Solorza-Feria, O.; Ríos-
Leal, E.; Esparza-García, F.**

***“Environmental Biotechnology and
Engineering – 2014”
Volume 3***

ISBN - 978-607-9023-30-0



México D.F., México, 2014

Are property and responsibility of Authors.

All or any part of this publication may be reproduced or transmitted, by any means, electronic or mechanical (Including photocopying, recording or any recovery system and storage), and must be included with the corresponding citation of this compendious and their authors.

Environmental Biotechnology and Engineering – 2014

Editors

Héctor Poggi Varaldo, Beni Camacho Pérez, and others.

D.R. © This Edition Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Cinvestav

2014

Publisher

Bonumedia

Amores 1166-4

Col. Del Valle

Del. Benito Juarez

CP 03100

CD version

400 copies

ISBN Vol. 3: 978-607-9023-30-0

ISBN Complete: 978-607-9023-27-0

Printed in Mexico

November 28th 2014

Content

	Page
How to cite an article/chapter of this book	<i>iii</i>
Preface	<i>iv</i>
Section 1. Renewable and Alternative Energies and Biorefineries	1
Section 2. Sustainability and Environmental System Analysis	254
Section 3. Risk Assessment and Environmental Impact	374
Section 4. Air Pollution and Climate Change	434
Section 5. Aquifer Remediation	475
Section 6. Soil and Sediment Remediation	539
Section 7. Wastewater Treatment	700
Section 8. Solid Waste Management and Treatment	914
Section 9. Hazardous Waste Management and Treatment	994
Section 10. Environmental Toxicology	1060
Section 11. Microbial Ecology	1092
Section 12. Molecular Biology Applications to Environmental Problems	1249
Section 13. Control and Modelling of Environmental Processes	1320
Section 14. Environmental Chemistry	1410
Section 15. Environmental Health	1440
Section 16. Environmental Nanotechnology	1458
Section 17. Miscellaneous	1491

Content of Volume 3

	Page
How to cite an article/chapter of this book	<i>iii</i>
Preface	<i>iv</i>
Section 10. Environmental Toxicology	1060
Section 11. Microbial Ecology	1092
Section 12. Molecular Biology Applications to Environmental Problems	1249
Section 13. Control and Modelling of Environmental Processes	1320
Section 14. Environmental Chemistry	1410
Section 15. Environmental Health	1440
Section 16. Environmental Nanotechnology	1458
Section 17. Miscellaneous	1491

How to cite an article of this book

For example, the chapter by **Oscar H. Ortiz-Méndez**, Leopoldo J. Ríos-González; José A. Rodríguez-de la Garza; German Aroca-Arcaya, entitled “**CHAPTER 1.1. ETHANOL PRODUCTION FROM ENZYMATIC HYDROLYSATES OF *Agave lechuguilla* PRETREATED BY AUTOHYDROLYSIS**” published in the pages 5 to 13 of this book, should be cited as follows:

Ortiz-Mendez, O.H.; Rios-Gonzalez, L.J.; Rodríguez-de la Garza, J.A.; Aroca-Arcaya, G. (2014). Chapter 1.1. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of *Agave lechuguilla* pretreated by autohydrolysis. *In*: Poggi-Varaldo, H.M.; Bretón-Deval, L.M.; Camacho-Pérez, B.; Escamilla-Alvarado, C.; Escobedo-Acuña, G.; Hernández-Flores, G.; Muñoz-Páez, K.M.; Romero-Cedillo, L.; Sastre-Conde, I.; Macarie, H.; Solorza-Feria, O.; Ríos-Leal, E.; Esparza-García, F. (Editors): *Environmental Biotechnology and Engineering – 2014*, Volume 1, pages 5-13. Ed. Cinvestav, Mexico D.F., Mexico.