



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Optimización y validación en entorno de laboratorio de
biomarcadores para la detección temprana de bacterias
viables en la red de distribución de agua potable

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Pérez Rodríguez, Gloria

Tutor/a: García Hernández, Jorge

Cotutor/a externo: MORENO TRIGOS, M^a YOLANDA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÀCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



Universitat Politècnica de València

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

Optimización y validación en entorno de laboratorio de biomarcadores para la detección temprana de bacterias viables en la red de distribución de agua potable

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Autora: Gloria Pérez Rodríguez

Tutor académico: Prof. D. Jorge García Hernández

Tutora: Dña. Yolanda Moreno Trigos

Curso académico: 2022

València, Julio de 2023

Optimization and validation in a laboratory environment of biomarkers for the early detection of viable bacteria in the drinking water distribution network

Abstract

Water is a vital resource for life; however, its quality is frequently compromised by the presence of contaminants, including pathogens. Ensuring the safety of drinking water supplies is critical, and it involves implementing proper disinfection treatments and continuously monitoring its biological stability to swiftly detect any potential contaminants. Nevertheless, conventional methods for detecting pathogenic microorganisms in drinking water, based on plate culturing, present limitations that reduce the effectiveness and efficiency of the analyses.

In this context, the current project aims to validate and optimize at a laboratory-level a method for bacterial detection based on the identification of specific biomarkers of viable bacteria, prior to developing a biosensor integrable into the water distribution network. To achieve this objective, available biomarkers were studied, and adenosine triphosphate (ATP) was selected as the most suitable for the project. Its production in *Escherichia coli* and *Legionella pneumophila* was evaluated using a commercial bioluminescence assay, along with its effectiveness compared to reference analysis technologies. Additionally, an optimized lysis treatment was developed to release intracellular ATP, enabling its subsequent application to the biosensor.

The presence of *E. coli* and *L. pneumophila* in inoculated water was successfully detected up to a concentration on the order of magnitude of 10^2 cells/mL, and when studying its relationship with the viable bacterial concentration obtained through epifluorescence, a positive correlation was established. The ATP extraction method that demonstrated the most favorable outcomes was boiling lysis, which extracted an average of 31,6 % of ATP in *E. coli* and 74,3 % of ATP in *L. pneumophila*. Therefore, ATP is proposed as a biomarker linked to bacterial presence for the development of an acoustic sensor capable of early bacterial detection in water.

This Final Degree Project aligns with the Sustainable Development Goals 3: Good Health and Well-being, 6: Clean Water and Sanitation, 12: Responsible Consumption and Production, and 13: Climate Action.

Key words: Biological alert • Bacterial viability • Adenosine triphosphate (ATP) • Bioluminescence • Biosensor

Author: Gloria Pérez Rodríguez.

Academic tutor: Prof. Mr. Jorge García Hernández.

Tutor: Ms. Yolanda Moreno Trigos.

València, July 2023

Optimización y validación en entorno de laboratorio de biomarcadores para la detección temprana de bacterias viables en la red de distribución de agua potable

Resumen

El agua es un recurso esencial para la vida, pero a menudo su calidad se ve comprometida por la presencia de contaminantes, entre ellos, los agentes patógenos. Para garantizar la seguridad de los suministros de agua potable es esencial llevar a cabo tratamientos adecuados para su desinfección, así como un seguimiento continuo de su estabilidad biológica que permita detectar con la mayor brevedad posible cualquier agente contaminante. Sin embargo, los métodos convencionales para la detección de microorganismos patógenos en el agua potable, basados en el cultivo en placa, presentan limitaciones que reducen la efectividad y eficiencia de los análisis.

En este contexto, el presente proyecto tiene como finalidad validar y optimizar a nivel de laboratorio un método de detección bacteriana que se base en la identificación de biomarcadores propios de bacterias viables, previo al desarrollo de un biosensor que pueda integrarse en la red de distribución de agua. Con el fin de alcanzar dicho objetivo, se estudiaron los biomarcadores disponibles y se eligió el adenosín trifosfato (ATP) como el más adecuado para el proyecto, evaluando su producción en *Escherichia coli* y *Legionella pneumophila* mediante un ensayo comercial de bioluminiscencia, y su efectividad frente a las tecnologías de análisis de referencia. Además, se desarrolló un tratamiento de lisis optimizado para liberar el ATP intracelular, permitiendo su posterior aplicación al biosensor.

Se consiguió detectar la presencia de *E. coli* y *L. pneumophila* en agua inoculada hasta una concentración del orden de magnitud de 10^2 células/mL, y al estudiar la correspondencia con la concentración bacteriana viable obtenida mediante epifluorescencia, se obtuvo una correlación positiva. El método de extracción de ATP que mejores resultados aportó fue la lisis por ebullición, consiguiendo extraer un promedio de 31,6 % de ATP en *E. coli* y un 74,3 % de ATP en *L. pneumophila*. Por tanto, se propone al ATP como biomarcador asociado a la presencia bacteriana el desarrollo de un sensor acústico que permita la detección temprana de bacterias en aguas.

Este Trabajo Final de Grado se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible 3: Salud y bienestar, 6: Agua limpia y saneamiento, 12: Producción y consumo responsables, y 13: Acción sobre el clima.

Palabras clave: Alerta biológica • Viabilidad bacteriana • Adenosín trifosfato (ATP) • Bioluminiscencia • Biosensor

Autora: Gloria Pérez Rodríguez.

Tutor académico: Prof. D. Jorge García Hernández.

Tutora: Dña. Yolanda Moreno Trigos.

València, Julio de 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a toda la gente de mi laboratorio por dar conmigo mis primeros pasos en el mundo de la investigación. A Yolanda, por guiarme y darme la libertad necesaria para la prueba y error que tanto nos ha hecho avanzar en este proyecto, y a Jorge, por tutorizarme. Gracias a Inma, por compartir toda tu experiencia en el mundo del ATP y por acompañarme durante tantas y tantas mediciones que hemos hecho, y a Laura y José Luis, por dedicar siempre tiempo de vuestra ajetreada mañana a resolver mis dudas. Gracias también a Carla, Alba, Dafne y Marta, por la compañía en el laboratorio y por siempre ofrecerme a ayudarme, y como no, a Lara, por toda la paciencia que has tenido conmigo desde que empecé en este laboratorio hace ya más de un año.

Quiero dar las gracias también a Belén, Sofía y Uxía; habéis sido una constante en mi vida desde el instituto y volver a Monforte siempre ha sido sinónimo de veros, ponernos al día y planificar la siguiente escapada juntas. Y hablando de constantes, gracias a Lara, porque hace cuatro años solo éramos una asturiana y una gallega muy perdidas entre valencianos y ahora te has convertido en un imprescindible para mí. Ya no cenamos todos los días juntas mientras nos contamos qué tal el día, pero Zipi y Zape siempre se vuelve a juntar (aunque sea en Madrid).

A los amigos que me ha dado la carrera, muchas gracias por estar ahí en los muchos momentos de agobio que hemos pasado, y por celebrar todos nuestros logros juntos. Estoy muy orgullosa de los biotecnólogos en los que nos hemos convertido. En especial, gracias a Claudia, Manuel, Adrián y Marc por hacerme sentir como en casa a 800 km de la mía; os espero en Bilbao con una milnueve bien fresquita.

Finalmente, a mi madre, mi padre y Pablo, daros las gracias se queda corto por todos los ánimos que me habéis dado y estar siempre a una llamada de distancia para sacarme una sonrisa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. LA PROBLEMÁTICA DEL AGUA.....	1
1.1.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	2
1.1.2. <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i>	2
1.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN AGUA POTABLE.....	3
1.2.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN CULTIVO.....	4
1.2.2. EXÁMENES MICROSCÓPICOS.....	5
1.2.3. MÉTODOS MOLECULARES.....	5
1.2.4. BIOSENSORES PARA EL RECONOCIMIENTO DE BIOMARCADORES BACTERIANOS.....	6
1.3. BIOMARCADORES PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS VIABLES EN AGUA.....	7
1.3.1. AZUL DE PRUSIA.....	7
1.3.2. RESAZURINA.....	8
1.3.3. TRIPTÓFANO.....	8
1.3.4. ADENOSÍN TRIFOSFATO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE PRODUCCIÓN DE ATP.....	12
3.1.1. DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD Y LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO.....	12
3.1.2. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ATP Y LOS EQUIVALENTES BACTERIANOS.....	13
3.1.3. ESTABILIDAD DEL ATP.....	15
3.2. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE LISIS CELULAR.....	16
3.2.1. LISIS POR TEMPERATURA.....	17
3.2.2. LISIS CON DTAB / TCA.....	17
3.2.3. LISIS CON BASE FUERTE.....	18
3.3. CASO PRÁCTICO: DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN AGUA DE RED.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE PRODUCCIÓN DE ATP.....	19
4.1.1. DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD Y LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO.....	19
4.1.2. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ATP Y EQUIVALENTES BACTERIANOS.....	20
4.1.3. ESTABILIDAD DEL ATP.....	24
4.2. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE LISIS CELULAR.....	25
4.2.1. ENSAYO CON <i>E. COLI</i>	25
4.2.2. ENSAYO CON <i>L. PNEUMOPHILA</i>	27
4.3. CASO PRÁCTICO: DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN AGUA DE RED.....	28
5. CONCLUSIONES.....	30
6. BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030 .	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PROPORCIÓN DE LA POBLACIÓN MUNDIAL EN 2022 CON SERVICIOS DE AGUA POTABLE GESTIONADOS DE FORMA SEGURA, (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS] Y FONDO DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA INFANCIA [UNICEF], 2023).	1
FIGURA 2. REDUCCIÓN DE AZUL DE PRUSIA A BLANCO DE PRUSIA EN PRESENCIA DE BACTERIAS VIABLES (CREADO CON BIORENDER.COM).	7
FIGURA 3. REDUCCIÓN DE RESAZURINA A RESOFURINA EN PRESENCIA DE BACTERIAS VIABLES (CREADO CON BIORENDER.COM).....	8
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DEL ESPECTRO DE EMISIÓN Y EXCITACIÓN DEL TRIPTÓFANO (SIMÕES Y DONG, 2018).....	9
FIGURA 5. REACCIÓN DE BIOLUMINISCENCIA DEL ADENOSÍN TRIFOSFATO (ATP) (CREADO CON BIORENDER.COM). 10	10
FIGURA 6. ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO SEGUIDO PARA EVALUAR LA RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSÍN TRIFOSFATO INTRACELULAR PRESENTE EN UNA MUESTRA Y LOS EQUIVALENTES BACTERIANOS (CREADO CON BIORENDER.COM).....	13
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROTOCOLO SEGUIDO PARA MEDIR LA CONCENTRACIÓN DE ATP CON EL KIT COMERCIAL QUENCH-GONE AQUEOUS. A) CALIBRACIÓN. B) EXTRACCIÓN DEL ATP INTRACELULAR DE LAS BACTERIAS PRESENTES EN LA MUESTRA C) MEDIDA DE LUMINISCENCIA (CREADO CON BIORENDER.COM). 14	14
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCEDIMIENTO SEGUIDO PARA COMPARAR LA EFICACIA DE EXTRACCIÓN DE ATP DE TRES MÉTODOS DE LISIS FRENTE A LA EXTRACCIÓN DE ATP CON EL REACTIVO LISANTE INCLUIDO EN EL KIT QGA (CREADO CON BIORENDER.COM).	16
FIGURA 9. REPRESENTACIÓN DE LA RECTA DE REGRESIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ATP ESTUDIADA, TRABAJANDO A ALTAS CONCENTRACIONES DE ATP, Y EL VALOR DE LUMINISCENCIA OBTENIDO PARA CADA CONCENTRACIÓN, EXPRESADO EN UNIDADES RELATIVAS DE LUZ (RLU).....	19
FIGURA 10. REPRESENTACIÓN DE LA RECTA DE REGRESIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ATP ESTUDIADA, TRABAJANDO A BAJAS CONCENTRACIONES DE ATP, Y EL VALOR DE LUMINISCENCIA OBTENIDO PARA CADA CONCENTRACIÓN, EXPRESADO EN UNIDADES RELATIVAS DE LUZ (RLU).....	20
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN DE LA RECTA DE REGRESIÓN ENTRE LOS DATOS OBTENIDOS DE EPIFLUORESCENCIA Y SU EQUIVALENCIA CON LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSÍN TRIFOSFATO Y CÉLULAS CON EL SISTEMA LUMINULTRA, TRABAJANDO CON <i>E. COLI</i>	22
FIGURA 12. REPRESENTACIÓN DE LA RECTA DE REGRESIÓN ENTRE LOS DATOS OBTENIDOS DE EPIFLUORESCENCIA Y SU EQUIVALENCIA CON LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSÍN TRIFOSFATO Y CÉLULAS CON EL SISTEMA LUMINULTRA, TRABAJANDO CON <i>L. PNEUMOPHILA</i>	23
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSÍN TRIFOSFATO A LO LARGO DEL TIEMPO.	24
FIGURA 14. EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSÍN TRIFOSFATO INTRACELULAR EN CÉLULAS NO VIABLES TRAS UN TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN CON LUZ ULTRAVIOLETA.	25
FIGURA 15. COMPARATIVA DE LA EXTRACCIÓN DE ATP CONSEGUIDA EN <i>E. COLI</i> Y <i>L. PNEUMOPHILA</i>	28

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPARATIVA DE LOS MÉTODOS MÁS COMUNES DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN AGUA.	4
TABLA 2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSÍN TRIFOSFATO INTRACELULAR (CATP) EN DILUCIONES SERIADAS DE <i>E. COLI</i> , MEDICIONES DE LUMINISCENCIA EN UNIDADES RELATIVAS DE LUZ (RLU) Y RECUENTO CELULAR EN CÉLULAS POR MILILITRO.	21
TABLA 3. RESULTADOS DEL ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSÍN TRIFOSFATO INTRACELULAR (CATP) EN DILUCIONES SERIADAS DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> , INCLUYENDO LAS MEDICIONES DE LUMINISCENCIA EN UNIDADES RELATIVAS DE LUZ (RLU) Y LOS CÁLCULOS DE CONCENTRACIÓN DE CATP Y RECUENTO CELULAR EN CÉLULAS POR MILILITRO.	22
TABLA 4. LUMINISCENCIA MEDIDA EN MUESTRAS INOCULADAS CON <i>E. COLI</i> A DIFERENTES TIEMPOS DE LISIS POR EBULLICIÓN.	26
TABLA 5. EVOLUCIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL ADENOSÍN TRIFOSFATO A TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE 100 °C.	26
TABLA 6. MEDIDAS DE CONCENTRACIÓN DE ADENOSÍN TRIFOSFATO REGISTRADAS EN EL ENSAYO DE LISIS EN <i>E. COLI</i> .	27
TABLA 7. MEDIDAS DE CONCENTRACIÓN ADENOSÍN TRIFOSFATO REGISTRADAS EN EL ENSAYO DE LISIS EN <i>L. PNEUMOPHILA</i>	27
TABLA 8. MEDIDAS DE CONCENTRACIÓN DE ADENOSÍN TRIFOSFATO REGISTRADAS EN LA MONITORIZACIÓN DE AGUA DE RED.	29

ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius

λ : Longitud de onda

%: Tanto por ciento

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ATP: Adenosín trifosfato

cATP: Adenosín trifosfato intracelular

cél: Célula

DTAB: Dedodeciltrimetilamonio

E. coli: *Escherichia coli*

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (European Centre for Disease Prevention and Control)

EMA: Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency)

HPC: Recuento de Placas Heterótrofas (Heterotrophic Plate Count)

L: Litro

L. pneumophila: *Legionella pneumophila*

LAMP

LOD: Límite de detección (Limit Of Detection)

LOQ: Límite de cuantificación (Limit Of Quantification)

mL: Mililitro

mm: Milímetro

NaOH: Hidróxido de sodio

nm: Nanómetro

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA: Agar de recuento de bacterias (Plate Count Agar)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

pg: Picogramo

PMA: Propidio monoazida

QGA: Quench-Gone Aqueous

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (quantitative Polymerase Chain Reaction)

RLU: Unidades Relativas de Luz (Relative Light Units)

TCA: Ácido tricloroacético

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UNICEF: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (United Nations Children's Fund)

UV: Ultravioleta

VBNC: Viable pero no cultivable (Viable but nonculturable)

μL: Microlitro

μL: Micrometro

W: Vatio

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA PROBLEMÁTICA DEL AGUA

El acceso al agua potable es fundamental para la Salud Pública y un derecho humano universal. Sin embargo, la disponibilidad de agua de calidad se está viendo amenazada a nivel global por la escasez de recursos hídricos, los efectos del cambio climático y la creciente contaminación. El crecimiento demográfico, junto con el incremento de las necesidades alimentarias y energéticas que éste conlleva, ha generado un aumento considerable en la demanda de agua, superando la capacidad de suministro y provocando una disminución en la disponibilidad de este recurso vital (Babuna et al., 2023). Además, la escasez de agua se está viendo agravada por el cambio climático, que ha acelerado el ciclo hidrológico y ha causado la aparición de eventos extremos, como sequías e inundaciones (Liang et al., 2023).

Esta problemática se ve reflejada en los datos actuales, que muestran que 2000 millones de personas en todo el mundo carecían de acceso a servicios de agua potable gestionados de manera segura en 2022, entendiendo como tal el agua potable de una fuente accesible para la población y libre de contaminación fecal y química prioritaria (Organización Mundial de la Salud [OMS] y Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia [UNICEF], 2023). Según los datos disponibles de 142 países, en 41 de ellos menos del 50 % de la población disponía de agua potable gestionada de manera segura, incluyendo 17 países donde la proporción era inferior a una de cada cuatro personas (Figura 1).

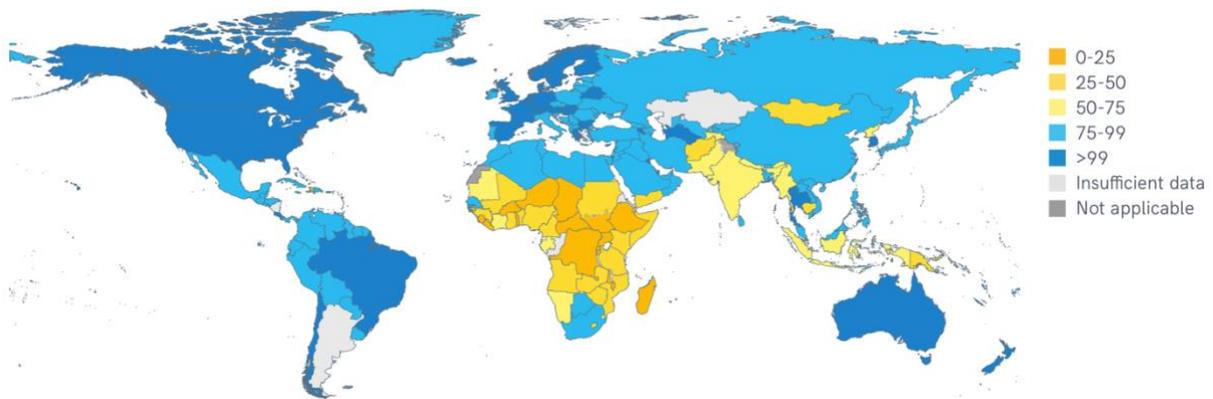


Figura 1. Proporción de la población mundial en 2022 con servicios de agua potable gestionados de forma segura, (Organización Mundial de la Salud [OMS] y Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia [UNICEF], 2023).

Pese a los esfuerzos gubernamentales por mejorar el acceso al agua potable en los países en vías de desarrollo y el reparto de los recursos disponibles, la salud pública se enfrenta al gran problema de la contaminación de los ya limitados recursos hídricos, que afecta también a los países más desarrollados. Estos eventos de contaminación se dan por vertidos e infiltraciones de sustancias químicas, biológicas

o radiactivas en el sistema de agua potable, así como deficiencias en el tratamiento del agua o en su distribución (Eliades et al., 2023).

En este contexto, la contaminación microbiológica constituye una cuestión especialmente relevante por su impacto directo en la propagación de enfermedades como el cólera, la disentería, la fiebre tifoidea y la hepatitis A. Por tanto, la detección temprana de patógenos en las fuentes de agua es fundamental para garantizar la seguridad hídrica y el desarrollo sostenible (OMS, 2017a).

1.1.1. ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa, mesófila y aerobia facultativa de la familia *Enterobacteriaceae*. Incluye principalmente cepas comensales que forman parte de la microbiota intestinal de animales homeotermos, encontrándose en la materia fecal y pudiendo verse al medio ambiente a través de efluentes de aguas residuales. En consecuencia, la presencia de *E. coli* en aguas ambientales se considera como una evidencia probable de contaminación fecal reciente (Patel et al., 2016).

Además de las cepas comensales, la especie *E. coli* también incluye cepas patógenas causantes de enfermedades intestinales y extraintestinales, como diarreas, infecciones del tracto urinario o meningitis (Kaper et al., 2004). Concretamente, las cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) han sido causantes de numerosos brotes de diarrea por su transmisión a través de alimentos y agua contaminada (Jang et al., 2017).

E. coli se incluye en las directivas Europeas como parámetro microbiológico para medir la calidad del agua junto a los enterococos, definiendo el requisito mínimo de calidad del agua como su ausencia en 100 mL de agua. El motivo de establecer requisitos mínimos de calidad para estos dos parámetros es su función indicadora, ya que la presencia en el agua de estos microorganismos indica una contaminación reciente con heces humanas o de animales de sangre caliente (OMS, 2017b). Por tanto, la detección temprana de *E. coli* en aguas resulta fundamental para la prevención de diarreas y otros problemas de salud asociados a la ingestión de agua contaminada.

1.1.2. LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Legionella pneumophila es una bacteria Gram-negativa perteneciente al género *Legionella*, compuesto por 58 especies. Es una bacteria aerobia facultativa, que puede resistir temperaturas de 50 °C durante varias horas, aunque no se multiplica a temperaturas por debajo de 20 °C (Cunha et al., 2016). A diferencia de *E. coli*, *L. pneumophila* es un patógeno oportunista, presente naturalmente en entornos

acuáticos, donde sobrevive como parásito intracelular de amebas o protozoos ciliados (Fields et al., 2002).

La infección por *L. pneumophila* se produce principalmente a través de la inhalación de aerosoles contaminados, que se generan por diversas fuentes de agua contaminada, como sistemas de agua potable, sistemas de enfriamiento de aire acondicionado, duchas o torres de enfriamiento. Aunque es menos común, también se puede transmitir por microaspiración de agua contaminada o por contacto directo con heridas quirúrgicas (Donohue et al., 2022). Una vez dentro del organismo humano, *L. pneumophila* inhibe la actividad bactericida de los fagocitos y convierte los fagosomas en un nicho para su replicación, evitando su fusión con los lisosomas y su acidificación. Tras haberse multiplicado, induce la apoptosis de las células huésped para poder liberarse y continuar el ciclo infeccioso (Fields et al., 2002).

L. pneumophila serogrupo 1 es la especie más virulenta y la principal causante de la legionelosis, que presenta dos manifestaciones clínicas, la enfermedad del legionario y la fiebre de Pontiac (Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades [ECDC], 2022). La enfermedad del legionario es la forma más grave de legionelosis, presentándose como una neumonía severa que afecta a los pulmones, mientras que la fiebre de Pontiac es una manifestación más leve, que no afecta a los pulmones y suele provocar fiebre moderada, malestar general, dolores musculares y articulares y fatiga (Hamilton et al., 2018).

Debido a su capacidad de persistir en sistemas de agua y su potencial para causar enfermedades respiratorias graves, es crucial tomar medidas de prevención y control para evitar la propagación de *L. pneumophila*. Esto implica implementar protocolos de monitoreo y desinfección de sistemas de agua, así como adoptar medidas de mantenimiento adecuadas en instalaciones como hoteles, hospitales, centros termales y otros lugares donde existe riesgo de proliferación de esta bacteria (Cunha et al., 2016).

1.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN AGUA POTABLE

El riesgo de infección por enfermedades transmitidas por el agua supone un problema mundial y, para asegurar un buen saneamiento y una correcta gestión de los recursos hídricos, se deben desarrollar métodos de análisis que permitan detectar la presencia de microorganismos patógenos. Actualmente, se dispone de una gran variedad de métodos de análisis, cada uno con sus propias ventajas e inconvenientes que los hacen adecuados para aplicaciones específicas (Tabla 1).

Tabla 1. Comparativa de los métodos más comunes de detección de microorganismos en agua.

	Métodos basados en cultivo	Exámenes microscópicos	Métodos moleculares	Biosensores
Posibilidad de detección	Microorganismos cultivables	Total de microorganismos, dependiendo de la metodología	Total de microorganismos, dependiendo de la selección de <i>primers</i>	Total de microorganismos, dependiendo de la selección de biomarcador
Sensibilidad	Media	Media	Alta	Media a alta
Especificidad	Media a alta	Media a alta	Alta	Media a alta
Tiempo de detección	Días a semanas	Minutos a horas	Minutos a días	Minutos
Resultados <i>in situ</i>	No	No	En algunos casos	Sí
Coste por cada ensayo	Bajo	Medio	Alto	Medio

1.2.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN CULTIVO

Los métodos de detección de microorganismos basados en cultivo son ampliamente utilizados a la hora de realizar una enumeración microbiana, e incluyen las láminas de inmersión, los métodos de crecimiento colorimétrico, los recuentos de células viables por dilución en serie y los recuentos en placa. Todos estos procedimientos proporcionan a los microorganismos los nutrientes y las condiciones necesarias para que formen colonias que posteriormente puedan ser visualizadas, contadas y, en algunos casos, identificadas. Su uso está muy extendido en los laboratorios de microbiología y suponen una técnica de bajo coste (Austin, 2017).

Para el estudio de la contaminación en aguas se emplea con frecuencia el Recuento de Placas Heterótrofas (HPC, por sus siglas en inglés), que mide los microorganismos heterótrofos presentes en la muestra, es decir, aquellos que requieren carbono orgánico o nitrógeno, así como oxígeno. No obstante, con esta técnica no se pueden detectar la mayoría de las bacterias nitrificantes – por ser autótrofas –, ni tampoco bacterias sulfato reductoras, protozoos o algas (Sloan et al., 2008). Además, los métodos basados en cultivo requieren incubar las placas y esperar a observar crecimiento, lo que retrasa la obtención de resultados y hace que el riesgo se identifique, en el mejor de los casos, 24 horas después de haber recogido la muestra (Bonnet et al., 2020).

A la hora de emplear este tipo de métodos se debe tener en cuenta que se está subestimando significativamente la población microbiológica de la muestra, ya que muchos de los microorganismos

no pueden ser cultivados *in vitro* (Clifford et al., 2012). En concreto, se estima que solo el 1 % de las bacterias totales encontradas mediante microscopía directa se enumeran mediante la técnica de HPC (Sloan et al., 2008), por lo que es recomendable corroborar los resultados negativos con otras metodologías que permitan detectar los microorganismos no cultivables.

1.2.2. EXÁMENES MICROSCÓPICOS

Los métodos de detección microscópica permiten una evaluación rápida y directa de la presencia de patógenos sin la necesidad de un cultivo previo, por lo que se utilizan para determinar la magnitud y diversidad microbiológica en la mayoría de las operaciones de tratamiento de aguas. Son métodos muy versátiles, ya que se pueden aplicar tanto a bacterias como a virus, algas y protozoos, y resultan más económicos que las técnicas de biología molecular.

Estos enfoques han evolucionado considerablemente, aprovechando los avances tecnológicos en óptica, técnicas de tinción y fluorescencia. En especial, destaca el uso de tinciones fluorescentes basadas en la integridad de la membrana celular en combinación con la microscopía de fluorescencia, ya que permiten distinguir las bacterias viables de las no viables (McGoverin et al., 2020). Ejemplo de ello es la utilización de una mezcla de STYO 9, un fluorocromo verde permeable a la membrana celular que penetra en todas las bacterias presentes en la muestra, y yoduro de propidio, un fluorocromo rojo de mayor tamaño e impermeable a la membrana, por lo que únicamente marca las bacterias con la membrana dañada, opacando la fluorescencia del fluorocromo verde. Mediante esta combinación, las bacterias no viables emiten fluorescencia roja, mientras que las bacterias viables emiten fluorescencia verde. (Robertson et al., 2019).

El principal inconveniente común a todos los métodos microscópicos es su límite de detección, que es superior al requerido para la mayoría de los análisis llevados a cabo en sistemas de agua tratada. En el caso de las técnicas fluorescentes basadas en la estabilidad de membrana, además, se ha visto que las estructuras huecas pero encapsuladas en membrana pueden ser identificadas erróneamente como células viables, provocando falsos resultados positivos (J. Liu et al., 2023).

1.2.3. MÉTODOS MOLECULARES

Los métodos moleculares de detección se basan en la identificación y análisis de ácidos nucleicos, principalmente, ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Ofrecen ventajas significativas en términos de sensibilidad, especificidad y rapidez en comparación con las técnicas tradicionales de cultivo y tinción, y permiten identificar microorganismos no cultivables (Sloan et al., 2008). Estos métodos se han utilizado en estudios previos en aguas para detectar exitosamente la

presencia de bacterias en zonas de baño y efluentes de aguas residuales (Walker *et al.*, 2017), así como en el estudio de comunidades microbianas de muestras de agua procedentes de estaciones depuradoras (Stamps *et al.*, 2018).

La gran limitación de estas técnicas es que son dependientes de la infraestructura, necesitando entornos de laboratorio controlados, personal capacitado y costes significativos (Sloan *et al.*, 2008). Dado que la tendencia en los últimos años se ha dirigido hacia el desarrollo de tecnologías que permitan la detección *in situ*, estudios recientes han planteado alternativas tales como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) (Zhao *et al.*, 2015) o la utilización de la tecnología de secuenciación por nanoporos (Urban *et al.*, 2021).

En cualquier caso, los métodos moleculares no permiten diferenciar entre bacterias viables y no viables, sobre todo en el caso de las técnicas basadas en ADN, por la alta estabilidad de esta molécula. Se han desarrollado técnicas para superar esta limitación mediante el uso de compuestos como el etidio monoazida o el propidio monoazida (PMA), que pueden penetrar en células con membrana comprometida, unirse al ADN e inhibir su amplificación (Nocker *et al.*, 2006). Sin embargo, esto supone un tratamiento previo de las muestras que impide la automatización del proceso y su aplicación *in situ*.

1.2.4. BIOSENSORES PARA EL RECONOCIMIENTO DE BIOMARCADORES BACTERIANOS

Los métodos de cultivo en placa, microscopía y secuenciación presentan varias limitaciones a la hora de realizar evaluaciones *in situ* y, como alternativa, en los últimos años se ha estudiado la posibilidad de aplicar los avances conseguidos en el campo de la sensórica a la detección de microorganismos. Con esta aproximación se busca desarrollar un sistema de monitorización continuo que proporcione resultados inmediatos y permita actuar frente a la contaminación microbiológica antes que los métodos convencionales.

Un biosensor es un dispositivo independiente e integrado que es capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica utilizando un elemento de reconocimiento biológico, que está en contacto directo con un transductor, cuya función es generar una señal físicamente cuantificable. Además del elemento de reconocimiento y el transductor, los biosensores deben contar con un tercer componente que permita amplificar y recoger las señales generadas, llamado detector (Maas *et al.*, 2017). Para aplicar esta tecnología a la detección de patógenos, se debe emplear como elemento de reconocimiento un biomarcador bacteriano que esté presente en todas las células y que sea característico de bacterias activas o viables.

Las ventajas de los biosensores frente a las técnicas convencionales de detección de microorganismos son la rapidez, ya que permite actuar antes de que la contaminación se extienda, la automatización, puesto que ahorra costes de materiales y personal, y la posibilidad de medir la calidad del agua de forma continua y en cualquier punto de la red de distribución facilitando la localización de la fuente de contaminación (Wang et al., 2021). Pese a ello, es un campo todavía nuevo y que requiere optimización para mejorar la sensibilidad, para lo que es crucial la elección de un biomarcador adecuado. Por tanto, el primero de los objetivos de este Trabajo Final de Grado será la búsqueda bibliográfica y selección de los biomarcadores disponibles para la detección de microorganismos en aguas, para su futura aplicación a un sistema de sensórica desarrollado como parte del proyecto SensoBac.

1.3. BIOMARCADORES PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS VIABLES EN AGUA

1.3.1. AZUL DE PRUSIA

El hexacianoferrato férrico, también conocido como azul de Prusia, es un pigmento azul oscuro producido por la oxidación de sales ferrosas de ferrocianuro y que se vuelve incoloro después de reducirse a blanco de Prusia (Figura 2). En presencia de bacterias vivas, el azul de Prusia se metaboliza y se reduce completamente a blanco de Prusia en menos de 10 horas (Ferrer-Vilanova et al., 2021) y, gracias a su intenso cambio de color, se puede emplear como indicador metabólico para la detección bacteriana. Se ha demostrado que puede detectar tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas a altas concentraciones (Ferrer-Vilanova et al., 2021). Además, Psotta et al. desarrollaron en 2023 un sensor potenciométrico portátil para la detección de *E. coli* basado en la reducción electroquímica del azul de Prusia a blanco de Prusia, consiguiendo un límite de detección de 10^3 células/mL. Sin embargo, ciertos derivados de este colorante pueden actuar como inhibidores del crecimiento bacteriano generando datos erróneos (He et al., 2023).

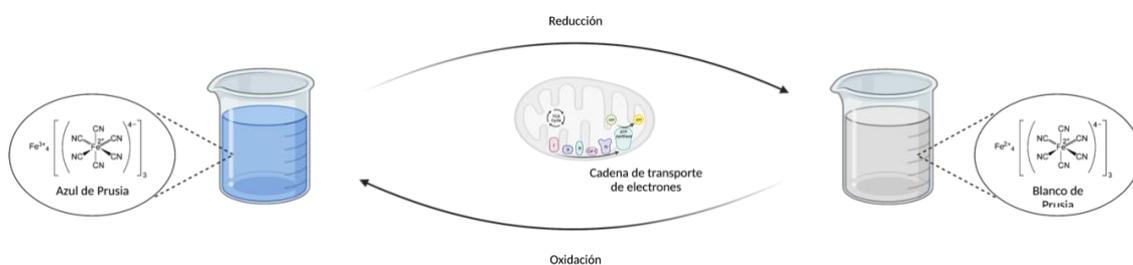


Figura 2. Reducción de azul de Prusia a blanco de Prusia en presencia de bacterias viables (Creado con BioRender.com).

1.3.2. RESAZURINA

La resazurina es un colorante soluble en agua, no tóxico y no fluorescente de color azul que puede ser metabolizado dentro de la célula bacteriana, reduciéndose así a resorufina, un compuesto rosa altamente fluorescente que se libera en el medio extracelular (Figura 3). La producción de resorufina es proporcional a la concentración bacteriana y a su actividad metabólica, por lo que permite la monitorización continua de las células en cultivo (Needs et al., 2021).

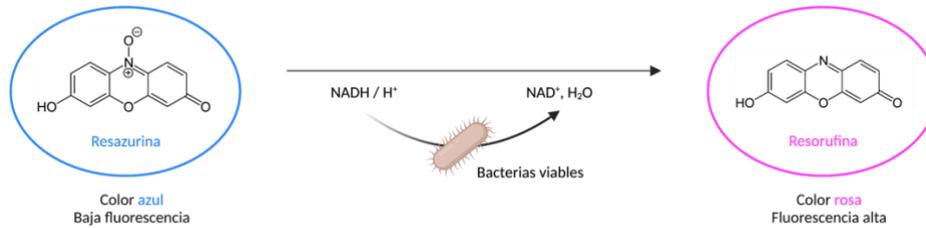


Figura 3. Reducción de resazurina a resorufina en presencia de bacterias viables (Creado con BioRender.com).

La producción de resorufina puede detectarse mediante espectrometría (resazurina: 600 nm; resorufina: 570 nm) o fluorimetría (λ de excitación: 530-560 nm / λ de emisión: 590 nm) (Labadie et al., 2021). Hsieh et al. (2018) desarrollaron un dispositivo microfluídico que utiliza un colorante comercial basado en resazurina para cuantificar células viables de *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, consiguiendo detectar concentraciones de entre 10^4 y 10^6 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL. En 2021, Needs et al. también utilizaron resazurina para cuantificar *E. coli* empleando matrices de conductos capilares, llegando a detectar concentraciones del orden de 10^3 UFC/mL.

Aun así, a la hora de emplear este compuesto como biomarcador, se debe tener en cuenta que la fluorescencia de resorufina depende de la temperatura, el pH e incluso la concentración inicial de resazurina. Además, en condiciones ácidas, la resorufina puede ser reducida químicamente a dihidroresorufina, un compuesto incoloro y no fluorescente (Labadie et al., 2021).

1.3.3. TRIPTÓFANO

El triptófano, o ácido 2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoico, es un aminoácido apolar y aromático formado por un anillo de indol, compuesto a su vez por un anillo de benceno y un anillo de pirrol, unido a la cadena principal del aminoácido. La presencia de este anillo aromático confiere la característica de fluorescencia al triptófano, siendo capaz de absorber luz ultravioleta (UV) (λ de excitación: 230-280 nm) y emitir luz visible a longitudes de onda más largas (λ de emisión: 330-360 nm) (Simões y Dong, 2018).

Este aminoácido presenta un papel estructural esencial en la síntesis proteica en bacterias, permitiendo la formación de enzimas, transportadores y otras moléculas implicadas en el metabolismo celular. Además, actúa como precursor de indoles, quinolinas y triptaminas, que son moléculas implicadas en la comunicación intercelular, y participa en la regulación de la expresión génica bacteriana. Se produce como resultado de la multiplicación celular y la actividad metabólica (Coble *et al.*, 2014) por lo que puede emplearse como indicador de la presencia de microorganismos metabólicamente activos. En concreto, los estudios más recientes se han centrado en el uso de medidas fluorescencia con longitudes de onda similares a las emitidas por el triptófano como marcador de la actividad microbiana (Figura 4).

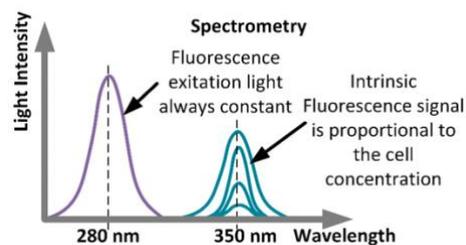


Figura 4. Representación del espectro de emisión y excitación del triptófano (Simões y Dong, 2018).

La intensidad emitida a 350 nm tras la excitación a 280 nm se ha empleado para enumerar *E. coli* en agua dulce superficial, demostrando una correlación logarítmica entre la intensidad de fluorescencia y *E. coli* en un rango de siete órdenes de magnitud (Baker *et al.*, 2015), y este método también se ha trasladado a sistemas de agua subterránea. Además, Du *et al.* (2022) han empleado la fluorescencia del triptófano para detectar la presencia de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* hasta una concentración de 10^5 células/mL. No obstante, la medida de triptófano todavía no ha resultado ser suficientemente específica en matrices complejas, presentando una sensibilidad de detección elevada.

1.3.4. ADENOSÍN TRIFOSFATO

El adenosín trifosfato (ATP) es un nucleótido formado por tres grupos fosfato, una base nitrogenada (adenina) y un azúcar de tipo ribosa. Se trata de una molécula fundamental para la actividad metabólica, encargada de almacenar y transportar la energía necesaria para los procesos celulares. Su detección es un indicador de la presencia de microorganismos vivos y activos, especialmente en un contexto donde no se espera la presencia de microorganismos como el agua potable (Bochdansky *et al.*, 2021).

En concreto, se ha establecido que el contenido medio de ATP dentro de una bacteria es de 0,001 pg de ATP (Gerba y Pepper, 2019), por lo que mediante la medición del ATP intracelular de una muestra

de agua se puede cuantificar la población bacteriana presente en ella. Además, las bacterias liberan ATP al medio extracelular en pequeñas concentraciones en situaciones de competencia o comunicación celular, y liberan toda el ATP presente en su interior cuando se debilitan o lisan. Por ello, la medición de ATP extracelular también se puede aplicar a la detección microbiana, pero aún no se ha podido establecer una relación clara entre la cantidad de ATP extracelular y la concentración de microorganismos (Mempin et al., 2013).

En cualquier caso, el ATP presente en una muestra se puede medir mediante una reacción enzimática, en presencia de la proteína luciferina y el enzima luciferasa. En esta reacción, la descomposición del ATP produce un destello de luz directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra (Figura 5). Cada molécula de ATP consumida en la reacción produce un fotón de luz, que se puede detectar empleando un luminómetro (Whalen et al., 2018). Esta técnica se ha utilizado para analizar la estabilidad biológica de aguas de grifo, aguas subterráneas, aguas de ríos y aguas residuales (Amalfitano et al., 2018).



Figura 5. Reacción de bioluminiscencia del adenosín trifosfato (ATP) (Creado con BioRender.com).

Para cuantificar la concentración de microorganismos en una muestra de agua, se debe incluir un paso de lisis celular que permita romper la membrana y extraer el ATP intracelular. A la hora de seleccionar un método de lisis adecuado se debe tener en cuenta que éste debe preservar la estabilidad de la molécula, no interferir con la reacción enzimática de la luciferasa y, además, poder ser incorporado posteriormente en un sistema de sensorica. De entre los métodos disponibles, los que han demostrado no interferir en la posterior de ATP en estudios previos han sido la lisis por ebullición (N. C. Yang et al., 2002) y la lisis empleando tensoactivos (Florez, 2020). En este último caso, el mayor porcentaje de extracción de ATP se consiguió mediante la combinación dedodeciltrimetilamonio (DTAB) al 2,5. % y ácido tricloroacético (TCA) al 5 %.

2. OBJETIVOS

La finalidad de este estudio es validar y optimizar, a nivel de laboratorio, un método de cuantificación bacteriana rápido basado en la detección de un biomarcador producido por bacterias viables. Este método de cuantificación debe ser adecuado para su posterior integración en un biosensor acoplable a la red de distribución de agua y que permita la detección *in situ* del biomarcador.

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- i. Identificación del biomarcador óptimo para la detección de bacterias en agua potable.
- ii. Evaluación de la síntesis de dicho biomarcador en *Escherichia coli* y *Legionella pneumophila*.
- iii. Estudio de la eficacia de la detección de *Escherichia coli* y *Legionella pneumophila* basada en biomarcadores frente a los análisis de referencia.
- iv. Desarrollo de un tratamiento de lisis optimizado para liberar el biomarcador intracelular que se pueda adaptar al sistema de sensórica.

Este Trabajo Final de Grado se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible 3: Salud y bienestar, 6: Agua limpia y saneamiento, 12: Producción y consumo responsables, y 13: Acción sobre el clima (Anexo 1).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ENSAYOS *IN VITRO* DE PRODUCCIÓN DE ATP

3.1.1. DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD Y LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO

Previo a las mediciones de ATP de muestras con microorganismos, se comprobó la validez del método mediante el estudio de la linealidad y límite de detección. La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad, dentro de un rango dado, para obtener una respuesta directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra analizada (Agencia Europea del Medicamento [EMA], 2006). Para su evaluación, la EMA recomienda trabajar con diluciones de una solución estándar del analito en cuestión, empleando un mínimo de cinco concentraciones, y estudiar la linealidad a través del cálculo de una línea de regresión mediante el método de los mínimos cuadrados.

El método de medida de ATP seleccionado fue el kit comercial Quench-Gone Aqueous (QGA ATP2G, MicroPlanet Laboratorios), basado en la reacción catalizada por el enzima luciferasa, en la que la descomposición del ATP produce un destello de luz directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra (Whalen et al., 2018). Para llevar a cabo la medición de la luz emitida se empleó el luminómetro PhotonMaster™ Luminometer (MicroPlanet Laboratorios, Barcelona), obteniendo el resultado en Unidades Relativas de Luz (RLU).

Se prepararon diluciones seriadas a partir de una concentración de 1000 pg/mL de HY-LITE® ATP Standard solution (MilliporeSigma, Alemania), hasta conseguir una concentración de 0,01 pg/mL de ATP. Para cada concentración se transfirieron 100 µL de disolución a un tubo de ensayo y, tras añadir 100 µL de enzima Luminasa (MicroPlanet Laboratorios, Barcelona) y homogeneizar la solución, se obtuvo el valor de luminiscencia en RLU.

Las medidas de ATP se realizaron por duplicado, y a partir de los resultados obtenidos se calculó la recta de regresión y el correspondiente coeficiente de correlación para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto. Con respecto al tipo de enzima empleado, para las cuatro concentraciones más altas se empleó el enzima Luminasa, pero para las siguientes concentraciones se empleó la versión más concentrada, Luminasa XL (MicroPlanet Laboratorios, Barcelona), que tiene una actividad 10 veces superior a la Luminasa y se recomienda para muestras con baja concentración de ATP.

El límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) se define como la cantidad de analito mínima que puede ser detectada con una certeza razonable para un determinado procedimiento analítico (McNaught y Wilkinson, 2019). Se calculó siguiendo la Ecuación 1, en la que x_L se refiere a la media de las medidas de blanco y s_{bi} , a la desviación estándar de estas. Para ello, se obtuvieron las RLU

correspondientes a diez medidas de blanco, utilizando para ello 100 µL de Luminasa XL y 100 µL de agua ultrapura, con grado de laboratorio.

$$\text{LOD} = x_L + 3 \cdot s_{bi} \quad \text{Ecuación 1}$$

Con respecto al límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés), se refiere a la cantidad de analito mínima que, además de ser detectada, puede ser cuantificada con una precisión razonable para cierto procedimiento analítico. Se calculó a partir de la media de las medidas de blanco, x_L , y su desviación estándar, s_{bi} (Ecuación 2).

$$\text{LOD} = x_L + 10 \cdot s_{bi} \quad \text{Ecuación 2}$$

3.1.2. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ATP Y LOS EQUIVALENTES BACTERIANOS

Una vez evaluada la linealidad del método y los límites de detección y cuantificación, los ensayos se repitieron con cultivos en fase exponencial de *E. coli* y *L. pneumophila* para comprobar la correspondencia entre la concentración de ATP y los equivalentes bacterianos (células). La concentración de células viables se comprobó con métodos culturales, y la presencia de viables (cultivables y no cultivables), con epifluorescencia (Figura 6). Para ello, se prepararon diluciones seriadas en agua ultrapura, para evitar interferencias con las mediciones de ATP, a partir de una muestra inoculada con una colonia procedente de un cultivo puro de *E. coli*, en primer lugar, y de *L. pneumophila*, en segundo lugar.

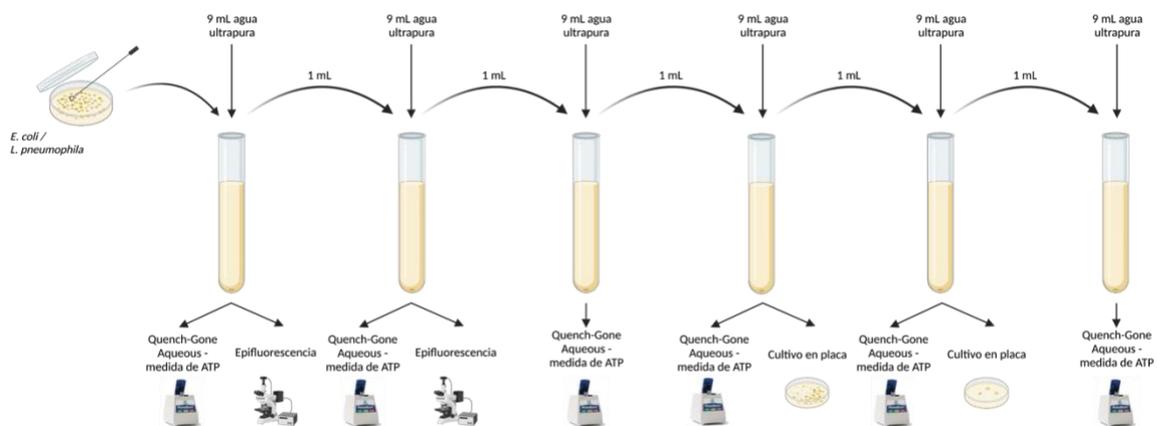


Figura 6. Esquema general del procedimiento seguido para evaluar la relación entre la concentración de adenosín trifosfato intracelular presente en una muestra y los equivalentes bacterianos (Creado con BioRender.com).

3.1.2.1. MEDIDA DE ATP

Las medidas de ATP se obtuvieron utilizando el kit comercial Quench-Gone Aqueous (QGA ATP2G, MicroPlanet Laboratorios). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se comenzó llevando a cabo una calibración estándar de ATP (Figura 7.A). A continuación, se hizo pasar la muestra por una jeringa de 50 mL con un filtro de 0,2 μm acoplado, reteniendo de este modo las bacterias presentes en la muestra en el filtro, mientras que los restos extracelulares – incluido el ATP extracelular – se descartaron. Acto seguido, se pasó 1 mL de solución lisante UltraLyse 7 (MicroPlanet Laboratorios, Barcelona) por la jeringa para extraer el ATP intracelular, que se recogió en un tubo de 9 mL de UltraLute (MicroPlanet Laboratorios, Barcelona) con el objetivo de diluir la solución lisante y evitar interferencias con la reacción posterior (Figura 7.B). Finalmente, se transfirieron 100 μL del tubo de UltraLute a un nuevo tubo de ensayo y, tras añadir 100 μL de Luminasa (MicroPlanet Laboratorios, Barcelona) y homogeneizar la solución, se midieron las RLU (Figura 7.C).

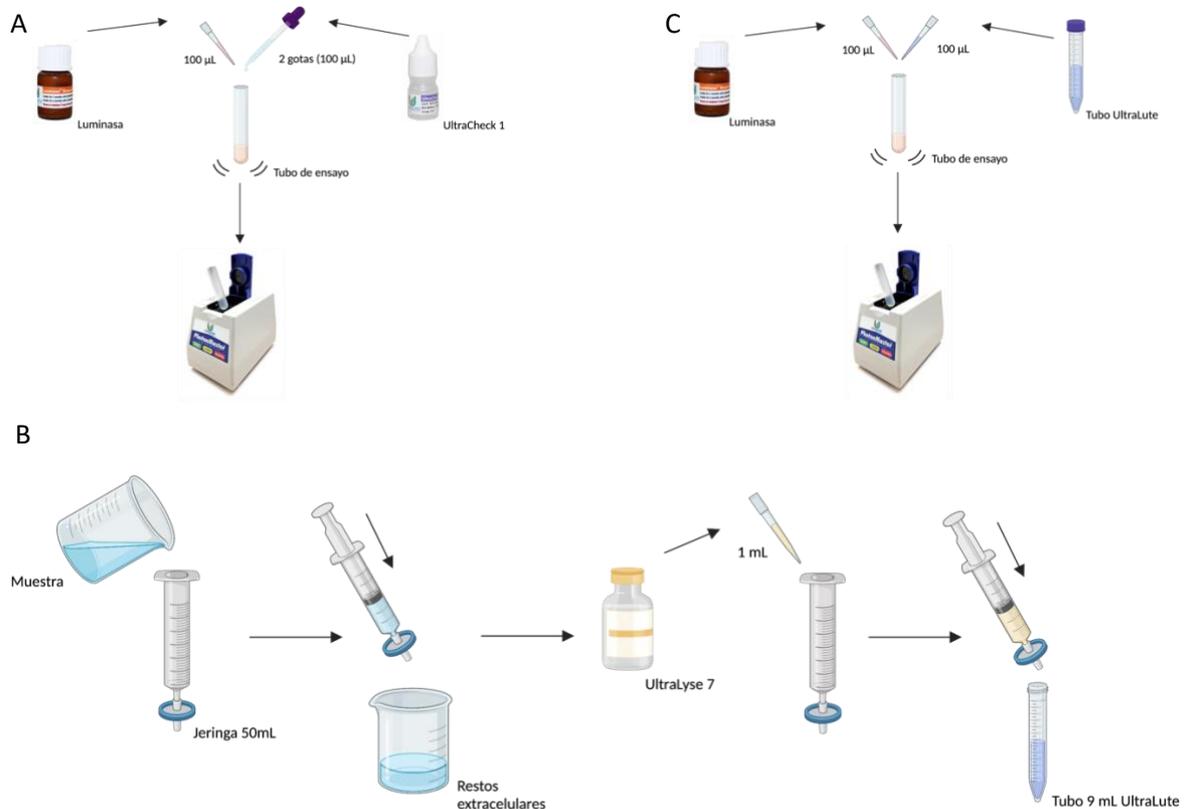


Figura 7. Representación esquemática del protocolo seguido para medir la concentración de ATP con el kit comercial Quench-Gone Aqueous. A) Calibración. B) Extracción del ATP intracelular de las bacterias presentes en la muestra C) Medida de luminiscencia (Creado con BioRender.com).

La concentración de ATP intracelular (cATP) se calculó a partir de los datos de RLU siguiendo la Ecuación 3, para posteriormente calcular la concentración bacteriana presente en la muestra (Ecuación 4)

teniendo en cuenta que el contenido medio de ATP de una bacteria es de 0,001 pg de ATP (Gerba y Pepper, 2019).

$$c_{\text{ATP}} \left(\frac{\text{pg ATP}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{RLU}_{\text{muestra}}}{\text{RLU}_{\text{calibración}}} \cdot \frac{\text{factor de dilución}}{\text{volumen de muestra (mL)}} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{concentración bacteriana} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = c_{\text{ATP}} \cdot \frac{1 \text{ célula}}{0,001 \text{ pg ATP}} \quad \text{Ecuación 4}$$

3.1.2.2. CULTIVO EN PLACA

Se seleccionaron los puntos de la curva de menor concentración y se sembraron 100 μL en Plate Count Agar (PCA, Scharlab, S.L., Barcelona) para el cultivo de *E. coli*, y 100 μL en *Legionella* BCYE Medium (Thermo Scientific, Alemania) para el cultivo de *L. pneumophila*. Las placas se incubaron a 37. $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas y se realizó el recuento en placa.

3.1.2.3. EPIFLUORESCENCIA

Para el examen microscópico de las muestras, se tomaron 250 μL de la suspensión bacteriana y se añadieron 0,8 μL de la mezcla de STYO 9 y yoduro de propidio adquirida en el LIVE/DEAD[®] BacLight Bacterial Viability Kit (Thermo Scientific, Alemania). Tras incubar los reactivos 15 minutos en agitación a temperatura ambiente, se depositaron 10 μL en un portaobjetos de adhesión con polisina (Thermo Scientific, Alemania) y se visualizó el resultado en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50.

Se contaron las bacterias viables – teñidas de verde – y las no viables – teñidas de rojo – presentes en cinco campos, y se calculó la concentración de la muestra (Ecuación 5).

$$\text{Concentración bacteriana viable} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \text{total de células} \cdot 3,1 \cdot 10^5 \quad \text{Ecuación 5}$$

3.1.3. ESTABILIDAD DEL ATP

Para evaluar el potencial del ATP como marcador de células, se llevó a cabo un estudio para examinar su estabilidad en el ambiente. Se utilizó una solución patrón de 1000 pg/mL de ATP, denominada HY-LiTE[®] ATP Standard Solution (MilliporeSigma, Alemania), que se mantuvo a temperatura ambiente, y para las mediciones se empleó el enzima Luminasa y el PhotonMasterTM Luminometer (MicroPlanet Laboratorios, Barcelona). Se realizaron medidas al inicio del ensayo, a los 30 minutos, 2 horas, 24 horas y 72 horas, cada una de ellas por duplicado.

Además, para corroborar la validez del ATP como biomarcador de, únicamente, células vivas o activas, se estudió la estabilidad del ATP intracelular en muestras no viables (bacterias tratadas con UV). Se

incubó *E. coli* en medio PCA 24 horas a 27 °C para inocular 10 mL de agua ultrapura de grado molecular. Tras diluir la muestra hasta una concentración de 1000 células/mL, la muestra se dividió en dos réplicas y, para cada una, se tomó una medida de ATP y se sembraron 100 µL en medio PCA. Para el tratamiento con UV, se situó el volumen restante de cada muestra en una placa Petri de 35 mm de diámetro para crear una lámina fina de agua, permitiendo una mejor eficacia del tratamiento de desinfección. Se aplicó un tratamiento de 2 horas de luz UV (254 nm, 50 W) y las placas se mantuvieron 24 horas en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad, tomando alícuotas a las 3 horas, 6 horas y 24 horas para medir la concentración de ATP y sembrar en placa.

3.2. ENSAYOS *IN VITRO* DE LISIS CELULAR

Se estudiaron diferentes tratamientos de lisis para extraer el ATP intracelular como alternativa a la solución lisante incluida en el kit QGA (UltraLyse 7), seleccionando para ello la lisis por temperatura, con un tensoactivo y con una base fuerte.

Tal y como se muestra en la Figura 8, se preparó una suspensión de células a partir de un cultivo puro resuspendido en 10 mL de agua ultrapura, realizando ensayos en paralelo de *E. coli* y *L. pneumophila*. De estos 10 mL, se tomaron alícuotas para ensayar los distintos tipos de lisis, con dos réplicas por cada uno. Además, se realizó un control positivo de la disolución inicial mediante epifluorescencia y cultivo en placa.

Los porcentajes de extracción de ATP se obtuvieron considerando el ATP extraído mediante UltraLyse 7 como el 100 % de extracción, y calculando el porcentaje relativo a éste para cada método de lisis.

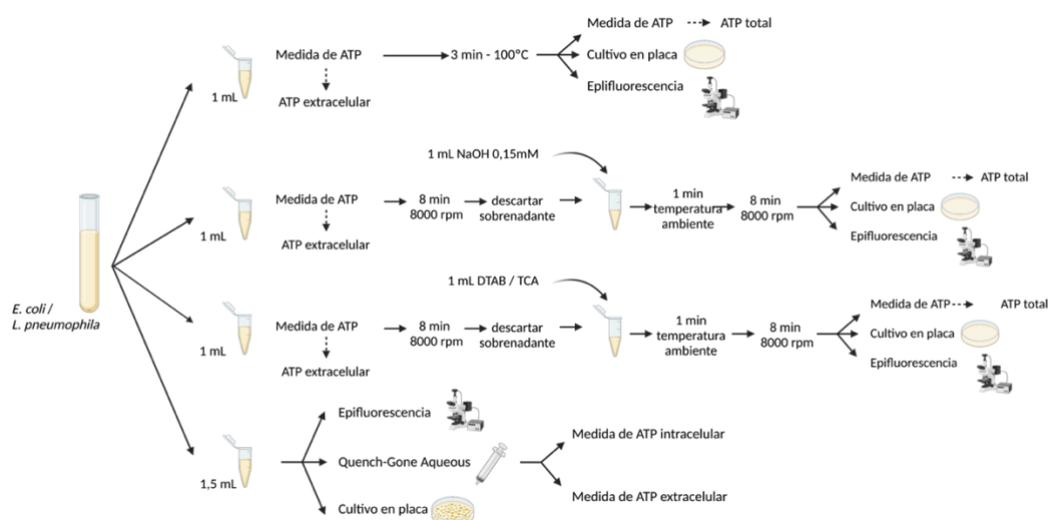


Figura 8. Representación esquemática del procedimiento seguido para comparar la eficacia de extracción de adenosín trifosfato de tres métodos de lisis frente a la extracción de ATP con el reactivo lisante incluido en el kit QGA (Creado con BioRender.com).

3.2.1. LISIS POR TEMPERATURA

Previo al ensayo comparativo de los métodos de lisis, se estudió el tiempo de ebullición óptimo para conseguir una buena extracción de ATP. Para ello, se prepararon 8 réplicas de 1 mL a partir de un cultivo puro de *E. coli* disuelto en agua ultrapura, y se compararon los resultados obtenidos al medir la luminiscencia sin llevar la solución a ebullición y tras 3, 5 y 8 minutos a 100 °C. Cada condición se estudió por duplicado.

A continuación, se comprobó que el ATP no se degradase por la exposición a altas temperaturas durante el tiempo del ensayo para evitar subestimar la concentración de ATP presente en la muestra original. Se prepararon 8 réplicas de 1 mL de la solución patrón HY-LiTE® ATP Standard Solution (MilliporeSigma, Alemania) y se comprobó la variación de la luminiscencia medida sin aplicar calor a la solución y tras someter la solución a 1, 3 y 5 minutos de tratamiento térmico a 100 °C.

Una vez se eligió el tiempo óptimo de tratamiento térmico y se comprobó la estabilidad del ATP a 100 °C durante ese tiempo, se llevó a cabo el ensayo en paralelo a la lisis con DTAB / TCA y la lisis con NaOH. La suspensión celular se calentó hasta los 100 °C en un termobloque, donde se mantuvo durante tres minutos para conseguir extraer el ATP. Antes de la lisis se tomó una medida de ATP para obtener la concentración de ATP extracelular presente en la muestra, y tras la lisis, la solución se enfrió para evitar desnaturalizar la luciferasa en el ensayo de bioluminiscencia y se volvió a medir la concentración de ATP, obteniendo así el valor de ATP total. El ATP intracelular se calculó como la diferencia entre el ATP total y el ATP extracelular. Además, se comprobó la ausencia de células viables mediante siembra en medio PCA y examen microscópico.

3.2.2. LISIS CON DTAB / TCA

Para ensayar la lisis con tensoactivos, se eligió como reactivo la combinación de DTAB y TCA al 2,5 % y 5 %, respectivamente, por ser los reactivos que permitieron un mayor porcentaje de extracción de ATP en estudios previos (Florez, 2020). Antes de añadir los reactivos, se concentraron las células por centrifugación durante 8 minutos a 8000 revoluciones por minuto (rpm), mientras que el ATP extracelular se recuperó en el sobrenadante. Tras medir la concentración de ATP extracelular, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL del reactivo lisante, incubando la solución 1 minuto a temperatura ambiente. Una vez lisadas las células, la solución se volvió a centrifugar 8 minutos a 8000 rpm, de forma que el ATP intracelular se recogió en el sobrenadante, mientras que los restos celulares se quedaron en el *pellet*, evitando interferencias con la medida de ATP intracelular posterior. Además de la medida de ATP intracelular, tras la lisis se sembraron 100 µL en placa, y se corroboró la ausencia de células viables mediante siembra en medio PCA y examen microscópico.

3.2.3. LISIS CON BASE FUERTE

Al igual que en la lisis empleando DTAB / TCA, las células se concentraron por centrifugación antes de realizar la medida de ATP extracelular y añadir el reactivo lisante, en este caso, hidróxido de sodio (NaOH) a concentración 0,15 mM. Después de incubar la solución lisante con las células durante 1 min y la posterior centrifugación, se midió el ATP intracelular recuperado en el sobrenadante. De nuevo, la ausencia de células viables se comprobó mediante siembra en placa y examen microscópico.

3.3. CASO PRÁCTICO: DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN AGUA DE RED

Para evaluar la aplicabilidad del método en un caso real, se realizó un seguimiento de la estabilidad biológica del agua de muestras de agua de red (Instituto Universitario de Ingeniería y Medio Ambiente, Universitat Politècnica de València). Se tomaron muestras al inicio de los ensayos de bioluminiscencia, y a partir de entonces, cada dos meses hasta la finalización del proyecto, tomando también una muestra al finalizar. Se midió la concentración de ATP de las muestras con el kit QGA (MicroPlanet Laboratorios), trabajando con un volumen de 50 mL.

Los resultados del ensayo que mostraron una alta concentración microbiana se continuaron estudiando mediante filtración e incubación en placa. Para ello, se trabajó en esterilidad para filtrar 1 L de muestra, utilizando una rampa de filtración y embudos con membranas de nitrocelulosa Millipore con tamaño de poro de 1,2 μm . Una vez filtrado todo el volumen, las membranas se transfirieron a placas Petri con medio PCA previamente preparadas y se incubaron a 37 °C durante 72 horas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ENSAYOS *IN VITRO* DE PRODUCCIÓN DE ATP

4.1.1. DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD Y LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO

El estudio de la linealidad del método de medida de ATP demostró que el valor de luminiscencia aumenta proporcionalmente conforme lo hace la concentración de ATP medida, ajustándose a un modelo lineal dentro del rango de concentraciones estudiado (0,01 pg/mL hasta 1000 pg/mL).

Los resultados se representaron en un gráfico de dispersión, en el que cada punto es el promedio de las dos réplicas, cuya desviación estándar se muestra en forma de barra de error vertical. Para el experimento a altas concentraciones de ATP, que se realizó empleando el enzima Luminasa, los valores se ajustan a un modelo lineal con un coeficiente de correlación de 0,9998 (Figura 9). Con respecto a los ensayos a concentraciones bajas de ATP, realizados con el enzima Luminasa XL, los valores se ajustan a una recta con un coeficiente de correlación de 0,9989 (Figura 10). En ambos casos, el coeficiente de correlación se acerca significativamente a 1, lo que evidencia una correlación positiva muy fuerte entre la concentración de ATP estudiada y la medida de luminiscencia obtenida. Por tanto, se considera que el método es válido para medir la cantidad de ATP presente en una disolución.

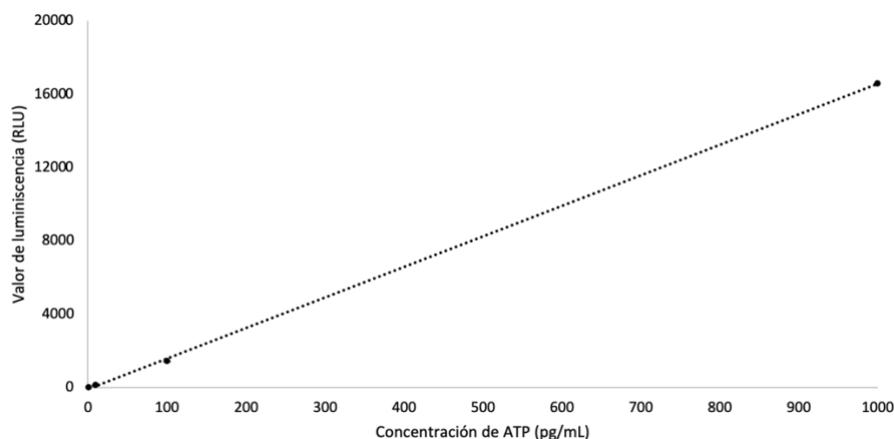


Figura 9. Representación de la recta de regresión entre la concentración de ATP estudiada, trabajando a altas concentraciones de ATP, y el valor de luminiscencia obtenido para cada concentración, expresado en Unidades Relativas de Luz (RLU).

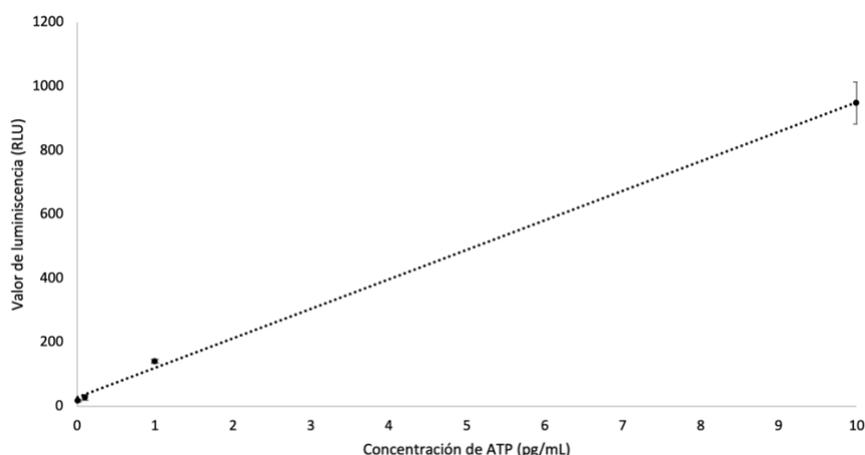


Figura 10. Representación de la recta de regresión entre la concentración de ATP estudiada, trabajando a bajas concentraciones de ATP, y el valor de luminiscencia obtenido para cada concentración, expresado en Unidades Relativas de Luz (RLU).

El límite de detección calculado a partir de las medidas de blanco y su desviación estándar fue de 0,197 pg de ATP, y el límite de cuantificación, de 0,35 pg de ATP. Por tanto, mediante este método se podría detectar la presencia de contaminación microbiológica a partir de 200 células, y se podrían cuantificar a partir de 350 células. Estos límites son inferiores a los obtenidos con otras técnicas basadas en la detección de biomarcadores de células viables, mejorando el límite de detección de 1000 células conseguido empleando azul de Prusia (Psotta et al., 2023), resazurina (Needs et al., 2021) y triptófano (Y. Liu et al., 2021). En comparación con otros tipos de ensayos desarrollados para realizar mediciones de ATP, la concentración de ATP que se consiguió medir fue inferior a la obtenida en otros estudios llevados a cabo en aguas de bebida con los kits LuminATE y RapiScreen Health, de 0,7 pg/mL y 0,3 pg/mL, respectivamente (Vang et al., 2014).

4.1.2. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ATP Y EQUIVALENTES BACTERIANOS

4.1.2.1. Ensayo con *E. coli*

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la concentración de ATP intracelular, obtenidos a partir de las medidas de luminiscencia normalizadas con respecto a la calibración con el estándar de ATP. Estos resultados fueron utilizados para estimar la concentración bacteriana presente en la muestra, logrando detectar la presencia de *E. coli* en concentraciones de 300 células/mL. Estudios previos han analizado la validez del ATP como biomarcador de bacterias viables al evaluar la relación entre la concentración de ATP presente en una muestra y la concentración de *E. coli*, consiguiendo detectar concentraciones del orden de 10^3 UFC/mL tanto en muestras alimentarias (Cao et al., 2023) como en muestras de agua

(Lee y Deininger, 2004). Por tanto, en este ensayo se han conseguido detectar concentraciones de un orden de magnitud inferior, lo que representa un avance significativo hacia el desarrollo de un sistema de alerta temprana para la detección de patógenos en agua de bebida.

Tabla 2. Determinación de la concentración de adenosín trifosfato intracelular (cATP) en diluciones seriadas de *E. coli*, mediciones de luminiscencia en Unidades Relativas de Luz (RLU) y recuento celular en células por mililitro.

Muestra	Enzima utilizado	Calibración (RLU)	cATP (RLU)	cATP (pg/mL)	Concentración (equivalentes bacterianos/mL)
Muestra original Réplica 1	Luminasa	19096	12423	963,79	9,64E+05
Muestra original Réplica 2	Luminasa	19096	12805	993,42	9,93E+05
Dilución 1:10 Réplica 1	Luminasa	19096	3553	240,08	2,40E+05
Dilución 1:10 Réplica 2	Luminasa	19096	1792	121,09	1,21E+05
Dilución 1:100 Réplica 1	Luminasa	19096	210	13,92	1,39E+04
Dilución 1:100 Réplica 2	Luminasa	19096	363	24,06	2,41E+04
Dilución 1:1000 Réplica 1	Luminasa XL	148968	367	3,12	3,12E+03
Dilución 1:1000 Réplica 2	Luminasa XL	148968	155	1,32	1,32E+03
Dilución 1:10000 Réplica 1	Luminasa XL	148968	53	0,36	3,56E+02
Dilución 1:10000 Réplica 2	Luminasa XL	148968	45	0,30	3,02E+02

Tras calcular la concentración bacteriana a partir de la concentración de ATP intracelular, se compararon los resultados con los obtenidos mediante epifluorescencia y recuento en placa. La Figura 11 muestra la relación entre la concentración bacteriana viable (cultivable y no cultivable) de las muestras analizadas, calculada a partir de los datos de epifluorescencia, y la concentración experimental, calculada a partir de la concentración de ATP intracelular. Se obtuvo una correlación positiva muy fuerte entre las dos variables estudiadas, con un coeficiente de correlación de 0,9945 al ajustar los resultados a un modelo lineal.

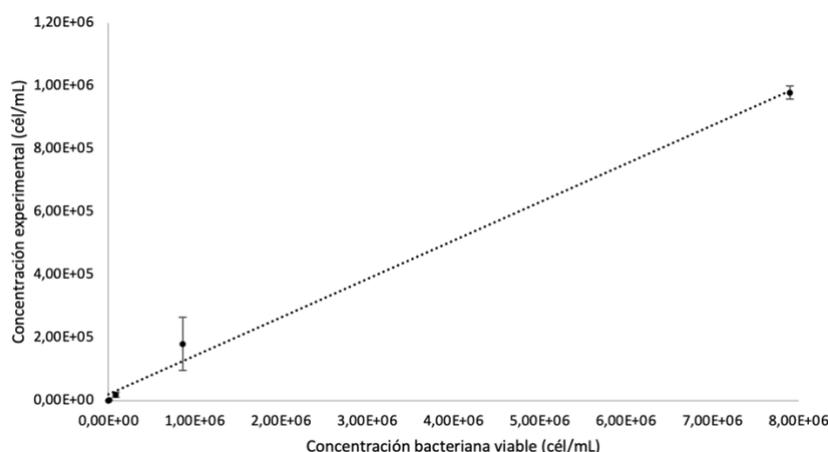


Figura 11. Representación de la recta de regresión entre los datos obtenidos de epifluorescencia y su equivalencia con la concentración de adenosín trifosfato y células con el sistema Luminultra, trabajando con *E. coli*.

Con respecto a los resultados obtenidos mediante la técnica de recuento en placa, se observó que la concentración estimada era, en promedio, un orden de magnitud inferior a la calculada mediante epifluorescencia y a través de la concentración de ATP intracelular. Estos datos concuerdan con estudios anteriores (J. Liu et al., 2023; Whalen et al., 2018), y se pueden explicar por la presencia de bacterias viables no cultivables en la muestra, que sí se detectan mediante los métodos de epifluorescencia y medición de ATP, pero son incapaces de formar colonias en medios de cultivo.

4.1.2.2. Ensayo con *L. pneumophila*

Los ensayos realizados con cultivos puros de *E. coli* fueron replicados con *L. pneumophila*, estimando la concentración bacteriana a partir de los resultados de concentración de ATP intracelular (Tabla 3). El límite de detección se mantuvo en el mismo orden de magnitud que en el ensayo con *E. coli*, llegando a detectar una concentración de 428 células/mililitro.

Tabla 3. Resultados del ensayo de determinación de la concentración de adenosín trifosfato intracelular (cATP) en diluciones seriadas de *L. pneumophila*, incluyendo las mediciones de luminiscencia en Unidades Relativas de Luz (RLU) y los cálculos de concentración de cATP y recuento celular en células por mililitro.

Muestra	Enzima utilizado	Calibración (RLU)	cATP (RLU)	cATP (pg/mL)	Concentración (equivalentes bacterianos/mL)
Muestra original Réplica 1	Luminasa	17993	1740	107,45	1,07E+05
Muestra original Réplica 2	Luminasa	17993	1765	108,99	1,09E+05

Dilución 1:10 Réplica 1	Luminasa	17993	222	15,42	1,54E+04
Dilución 1:10 Réplica 2	Luminasa	17993	241	16,74	1,67E+04
Dilución 1:100 Réplica 1	Luminasa XL	109130	168	1,92	1,92E+03
Dilución 1:100 Réplica 2	Luminasa XL	109130	189	2,16	2,16E+03
Dilución 1:1000 Réplica 1	Luminasa XL	109130	42	0,43	4,28E+02
Dilución 1:1000 Réplica 2	Luminasa XL	109130	61	0,62	6,21E+02

En este caso, la relación entre la concentración bacteriana viable (cultivable y no cultivable) y la concentración experimental se ajusta a un modelo lineal con un coeficiente de correlación de 0,9981 (Figura 12). De nuevo, los resultados del recuento en placa mostraron una subestimación de la población total de bacterias viables en la muestra, obteniendo concentraciones de un orden de magnitud inferior a las calculada mediante epifluorescencia y concentración de ATP intracelular.

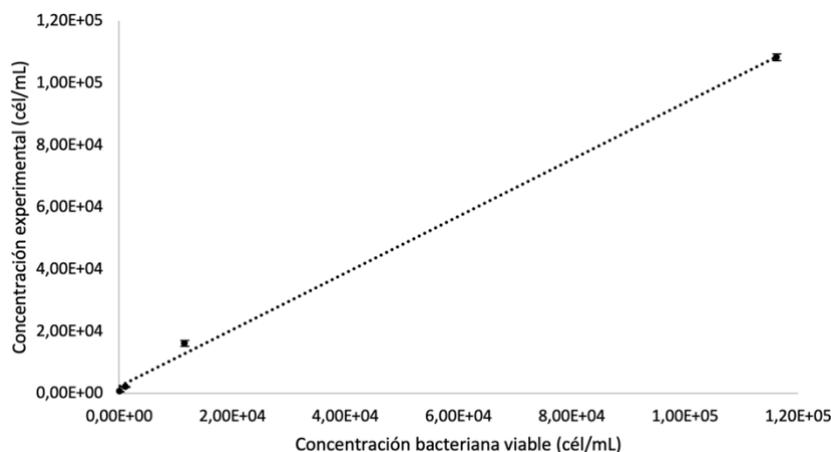


Figura 12. Representación de la recta de regresión entre los datos obtenidos de epifluorescencia y su equivalencia con la concentración de adenosín trifosfato y células con el sistema Luminutra, trabajando con *L. pneumophila*.

La sensibilidad conseguida en este ensayo fue superior a la obtenida en estudios previos con métodos moleculares, como la detección y cuantificación mediante qPCR del ARNr 16S, con la que el límite de detección es de 1000 células/mL (Boss et al., 2018). Recientemente se ha conseguido desarrollar un sistema de detección mediante inmunoensayo y medición mediante cronamperometría que muestra una respuesta lineal a la concentración bacteriana y permite detectar un rango de concentraciones de *L. pneumophila* entre 10^1 y 10^4 UFC/mL, con un LOD de 4 UFC/mL (Ezenarro et al., 2020), inferior al

conseguido en este ensayo. Sin embargo, los anticuerpos requeridos para el inmunoensayo presentan un precio elevado, aumentando el coste en comparación con la detección de ATP.

4.1.3. ESTABILIDAD DEL ATP

Para evaluar el potencial del ATP como marcador de células, se llevó a cabo un estudio para examinar su estabilidad en el ambiente. Mediante pruebas con patrones de ATP, se observó que su concentración no comienza a descender hasta transcurridas 72 horas (Figura 13). Por lo tanto, su presencia podría utilizarse como indicador de una posible contaminación, pero no permite asegurar que esta haya ocurrido de manera inmediata, pudiendo ser de hace más de dos días.

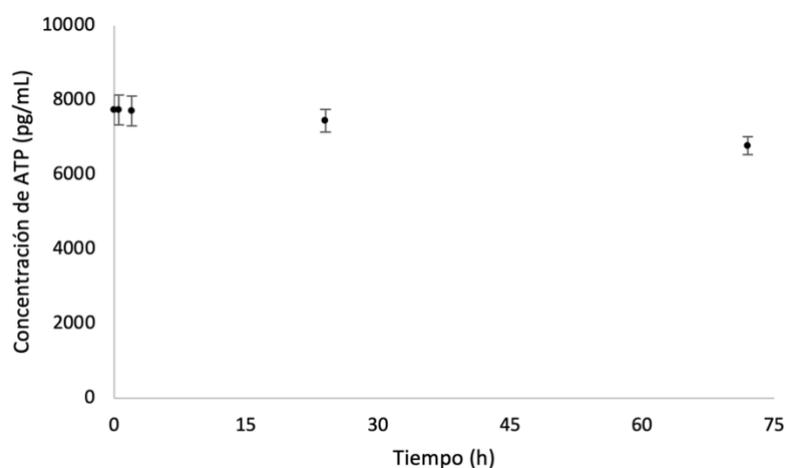


Figura 13. Representación de la evolución de la concentración de adenosín trifosfato a lo largo del tiempo.

En estudios previos se obtuvieron resultados similares, que muestran que el ATP es bastante estable cuando se diluye en agua ultrapura, independientemente de la temperatura y el tiempo, mientras que su vida media a 24 °C en muestras reales es de entre 4 y 5 días (Ochromowicz y Hoekstra, 2006). Esto puede explicarse por la presencia de enzimas de origen microbiológico, principalmente ATPasas, que catalizan la descomposición de ATP en ADP y un ion de fosfato libre.

Se comprobó también la estabilidad del ATP intracelular en muestras no viables con la intención de corroborar que únicamente se trata de un marcador de células vivas o activas. Para ello, se sometió un cultivo de *E. coli* a un tratamiento de desinfección por luz UV y se estudió la presencia de ATP intracelular con respecto al tiempo transcurrido desde el tratamiento. Los resultados, expresados como el promedio de la concentración de ATP intracelular de las dos réplicas biológicas frente al tiempo (Figura 14), muestran que el ATP de las bacterias no se degrada instantáneamente, pero que tras 24 horas su concentración es inferior al 30 % del ATP presente a tiempo 0.

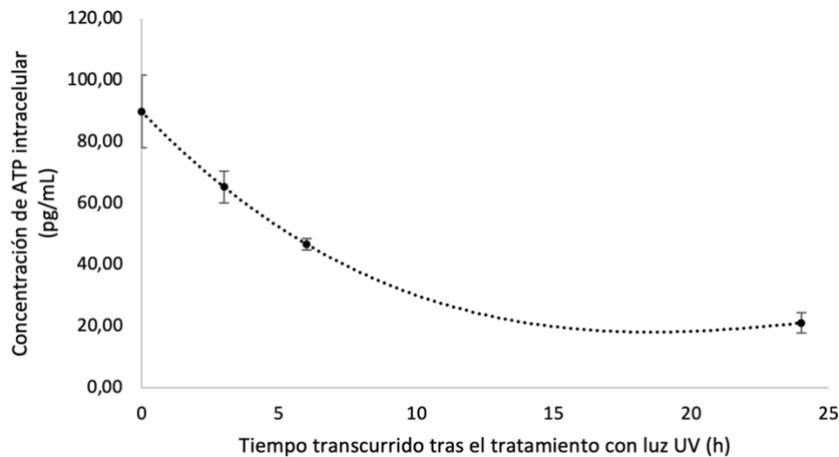


Figura 14. Evolución de la concentración de adenosín trifosfato intracelular en células no viables tras un tratamiento de desinfección con luz ultravioleta.

Estudios previos han demostrado que la radiación UV no tiene un efecto significativo en la estabilidad del ATP (C. Yang et al., 2020), por lo que el descenso de la concentración de ATP intracelular que se observa en este caso no se debe al efecto de la radiación sobre la propia molécula de ATP, sino más bien a su impacto en la viabilidad celular. Además, en base a estos resultados, el ATP se podría utilizar también para evaluar la eficacia de los tratamientos de desinfección con UV llevados a cabo en las plantas potabilizadoras de agua.

4.2. ENSAYOS *IN VITRO* DE LISIS CELULAR

Se estudiaron diferentes tratamientos de lisis para extraer el ATP intracelular como alternativa a la solución lisante incluida en el kit QGA (UltraLyse 7), seleccionando para ello la lisis por temperatura, con un tensoactivo y con una base fuerte. Las tres opciones demostraron preservar la estabilidad del ATP y podrían ser incorporadas posteriormente en un sistema de sensórica, pero la adición de un DTAB / TCA y NaOH a altas concentraciones mostró interferencias con la reacción enzimática de la luciferasa, por lo que las muestras tuvieron que ser diluidas antes de realizar las mediciones de ATP posteriores a la lisis.

4.2.1. ENSAYO CON *E. COLI*

El estudio previo para la optimización de la lisis mostró que el tiempo óptimo de tratamiento era de 3 minutos, ya que a este tiempo se obtuvieron los valores máximos de luminiscencia (Tabla 4). Además, se comprobó que la luminiscencia del ATP patrón no se vio afectada tras el tratamiento térmico de 3 minutos, y tampoco de 5 minutos (Tabla 5). Se espera obtener el mismo resultado cuando se trabaje

con ATP bacteriano, ya que la aplicación de altas temperaturas evita la degradación del ATP al desnaturalizar las ATPasas bacterianas.

Tabla 4. Luminiscencia medida en muestras inoculadas con *E. coli* a diferentes tiempos de lisis por ebullición.

Tiempo (min)	Medida luminiscencia (Unidades Relativas de Luz)		
	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
0	5502	4688	5095
3	11102	11609	11355,5
5	10762	11425	11093,5
8	9557	9635	9596

Tabla 5. Evolución de la estabilidad del adenosín trifosfato a tratamientos térmicos de 100 °C.

Tiempo (min)	Medida luminiscencia (Unidades Relativas de Luz)		
	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
0	1918	1954	1936
1	1991	1947	1969
3	1987	1973	1980
5	1961	1960	1960,5

Con respecto al ensayo de lisis, los resultados de las medidas de ATP antes y después de la lisis (Tabla 6) muestran que el método de lisis más eficaz fue la ebullición, con un promedio de extracción de ATP del 31,6 %, frente a un 2,8 % de extracción mediante el empleo de NaOH, y 3,3 % con DTAB/TCA. Los bajos porcentajes de extracción obtenidos con NaOH y DTAB/TCA son inferiores a los obtenidos en estudios previos, del 70 %, y probablemente se deba a la necesidad de diluir la muestra antes de tomar las medidas de ATP intracelular. Con respecto a la lisis por ebullición, aunque el resultado es inferior al esperado (N. C. Yang et al., 2002) ningún trabajo había comparado antes la ebullición con la lisis empleando el reactivo lisante de LuminUltra, desarrollado específicamente para extraer el ATP, sino que se consideraba como referencia la lisis por sonicación o empleando otros lisantes menos específicos.

Tabla 6. Medidas de concentración de adenosín trifosfato registradas en el ensayo de lisis en *E. coli*.

Método de lisis	ATP extracelular (pg/mL)	ATP intracelular (pg/mL)	ATP total (pg/mL)
Agente lisante incluido en el kit QGA	100,77	631,21	731,97
	107,92	777,19	885,11
Lisis por ebullición	130,85	231,44	362,29
	127,66	207,21	334,87
Lisis empleando NaOH	99,59	18,97	118,56
	109,75	19,74	129,49
Lisis con DTAB/TCA	99,59	24,94	124,53
	109,75	21,16	130,91

4.2.2. ENSAYO CON *L. PNEUMOPHILA*

En el caso de *L. pneumophila*, el método de lisis más eficaz también fue la ebullición, pero con porcentajes muy superiores a la lisis en *E. coli*. En concreto, el porcentaje de extracción promedio de ATP, calculado a partir de las medidas de concentración de ATP (Tabla 7), fue de un 74,3 %, significativamente superior al 8,92 % de extracción con NaOH y 7,64 % con DTAB / TCA.

Tabla 7. Medidas de concentración adenosín trifosfato registradas en el ensayo de lisis en *L. pneumophila*.

Método de lisis	ATP extracelular (pg/mL)	ATP intracelular (pg/mL)	ATP total (pg/mL)
Agente lisante incluido en el kit QGA	2649,85	1531,61	4181,46
	2571,84	2416,97	4988,81
Lisis por ebullición	3779,36	1176,59	4955,95
	3705,83	1736,76	5442,59
Lisis empleando NaOH	4114,38	168,03	4282,41
	4104,86	165,84	4270,70
Lisis con DTAB/TCA	3995,70	151,36	4147,06
	3650,02	130,30	3780,33

Comparando los porcentajes de extracción conseguidos en *E. coli* y *L. pneumophila* (Figura 15), se observa que en todos los casos la lisis fue más eficaz en *L. pneumophila*, contrario a los resultados esperados teniendo en cuenta las características microbiológicas de estas dos bacterias. Aunque ambas son bacterias Gram-negativas, la composición de la pared celular de *L. pneumophila* le confiere mayor estabilidad, y en general *L. pneumophila* es más resistente en ambiente que *E. coli*. Por tanto, las diferencias en la extracción de ATP no se pueden explicar por sus características morfológicas, pero se ha hipotetizado que podrían deberse al propio mecanismo de liberación del ATP. Además de su función

metabólica, el ATP actúa como molécula mensajera en procesos de comunicación intercelular y *quorum sensing*, y aunque estos mecanismos todavía no se han estudiado con la suficiente profundidad, podrían explicar por qué *L. pneumophila* es más eficaz en la liberación de ATP que *E. coli*.

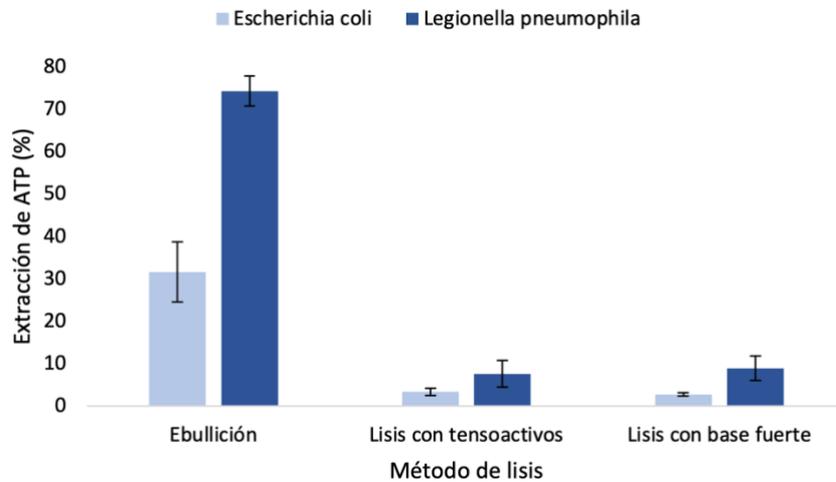


Figura 15. Comparativa de la extracción de ATP conseguida en *E. coli* y *L. pneumophila*.

En cualquier caso, los buenos resultados obtenidos en *L. pneumophila* permitirían acoplar la lisis por ebullición para la liberación del ATP intracelular en el sistema de sensórica que se desarrolle para la medición de la concentración de ATP. Además de medir la estabilidad microbiológica del agua de red, permitiría detectar la contaminación por *L. pneumophila* en zonas de riesgo, como sistemas de enfriamiento de aire acondicionado, duchas o torres de enfriamiento.

4.3. CASO PRÁCTICO: DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN AGUA DE RED

Los resultados de las mediciones de ATP en agua de red se muestran en la Tabla 8, donde se puede observar una línea base de concentración de ATP de 1 pg/mL, que se mantiene en todas las muestras excepto en la muestra del día 15 de junio. Este día se detectó una concentración de 11,85 pg/mL de ATP, haciendo sospechar de una posible contaminación microbiológica, por lo que se continuó con el protocolo de filtración e incubación.

Tabla 8. Medidas de concentración de adenosín trifosfato registradas en la monitorización de agua de red.

Fecha de toma de muestra	Calibración (RLU)	cATP (RLU)	cATP (pg/mL)
31/01/2023	20599	50	0,49
05/04/2023	19583	62	0,63
15/06/2023	133297	1580	11,85
10/07/2023	17993	161	1,79

La ausencia de crecimiento en medio PCA, confirmó que se trataría de microorganismos en forma viable pero no cultivable (VBNC). Estos resultados se pueden relacionar con la situación meteorológica de los días previos a la medición, en la que las fuertes tormentas pudieron provocar arrastres.

Se pudo comprobar la aplicabilidad de las mediciones de ATP a la hora de actuar como un sistema de alerta temprana, que permitió hacer medidas en un punto de la red y detectar picos de contaminación, incluso por parte de bacterias en estado VBNC.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que:

- i. El valor de luminiscencia aumenta proporcionalmente conforme lo hace la concentración de ATP, ajustándose a un modelo lineal dentro del rango de concentraciones estudiado de 0,01 pg/mL hasta 1000 pg/mL y permitiendo detectar la presencia de contaminación microbiológica a partir de 200 células, y la cuantificación a partir de 350 células.
- ii. La detección de *Escherichia coli* y *Legionella pneumophila* utilizando el ATP como biomarcador resulta efectiva y lo suficientemente sensible como para permitir una alerta temprana en la evaluación de la estabilidad biológica del agua.
- iii. La lisis bacteriana por ebullición permite extraer el ATP intracelular para su posterior medición, aunque con mayor eficacia en *L. pneumophila*, sin interferir con la reacción de bioluminiscencia.
- iv. La medida de ATP como indicador de proliferación bacteriana, acoplado a un proceso de lisis por ebullición previo de la muestra, se propone como base para el desarrollo de un sensor acústico como sistema de alerta temprana de contaminación en aguas.

Este estudio forma parte del proyecto Sensobac solicitado por la Universtat Politècnica de València (Exp. INNEST/2022/298), y en base a las conclusiones obtenidas, AWSensors está desarrollando un biosensor de detección acústica formado por una matriz de microsensores piezoeléctricos. Su aplicación en un entorno real se estudiará mediante la monitorización de la estabilidad del agua en una estación de tratamiento de agua potable.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALAN D. MCNAUGHT, & ANDREW WILKINSON. (2019). *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (V. Gold, Ed.; 2nd ed.). International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). <https://doi.org/10.1351/goldbook>
- AMALFITANO, S., LEVANTESI, C., GARRELLY, L., GIACOSA, D., BERSANI, F., & ROSSETTI, S. (2018). Water quality and total microbial load: A double-threshold identification procedure intended for space applications. *Frontiers in Microbiology*, 9(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02903>
- AUSTIN, B. (2017). The value of cultures to modern microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(10), 1247–1256. <https://doi.org/10.1007/S10482-017-0840-8/FIGURES/1>
- BABUNA, P., YANG, X., TULCAN, R. X. S., DEHUI, B., TAKASE, M., GUBA, B. Y., HAN, C., AWUDI, D. A., & LI, M. (2023). Modeling water inequality and water security: The role of water governance. *Journal of Environmental Management*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116815>
- BAKER, A., CUMBERLAND, S. A., BRADLEY, C., BUCKLEY, C., & BRIDGEMAN, J. (2015). To what extent can portable fluorescence spectroscopy be used in the real-time assessment of microbial water quality? *Science of the Total Environment*, 532, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.114>
- BOCHDANSKY, A. B., STOUFFER, A. N., & WASHINGTON, N. J. N. (2021). Adenosine triphosphate (ATP) as a metric of microbial biomass in aquatic systems: new simplified protocols, laboratory validation, and a reflection on data from the literature. *Limnology and Oceanography: Methods*, 19(2), 115–131. <https://doi.org/10.1002/lom3.10409>
- BONNET, M., LAGIER, J. C., RAOULT, D., & KHELAIFIA, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34, 100622. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2019.100622>
- BOSS, R., BAUMGARTNER, A., KROOS, S., BLATTNER, M., FRETZ, R., & MOOR, D. (2018). Rapid detection of viable *Legionella pneumophila* in tap water by a qPCR and RT-PCR-based method. *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 1216–1225. <https://doi.org/10.1111/jam.13932>
- CAO, C., WANG, M., ZHANG, D., YU, S., XIE, H., WANG, Q., YU, Z., & GAN, N. (2023). Portable ATP bioluminescence sensor with high specificity for live *Escherichia coli* O157:H7 strain synergistically enhanced by orientated phage-modified stir bar extraction and bio-proliferation. *Biosensors and Bioelectronics*, 220. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114852>

- CENTRO EUROPEO PARA LA PREVENCIÓN Y EL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES [ECDC]. (2022). *Legionnaires' disease - Annual epidemiological report for 2020*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2020>
- CLIFFORD, R. J., MILILLO, M., PRESTWOOD, J., QUINTERO, R., ZURAWSKI, D. V., KWAK, Y. I., WATERMAN, P. E., LESH, E. P., & MC GANN, P. (2012). Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PloS One*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048558>
- CUNHA, B. A., BURILLO, A., & BOUZA, E. (2016). Legionnaires' disease. *The Lancet*, 387(10016), 376–385. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60078-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60078-2)
- DONOHUE, M. J., MISTRY, J. H., TUCKER, N., & VESPER, S. J. (2022). Hot water plumbing in residences and office buildings have distinctive risk of Legionella pneumophila contamination. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 245. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114023>
- DU, R., YANG, D., & YIN, X. (2022). Rapid Detection of Three Common Bacteria Based on Fluorescence Spectroscopy. *Sensors*, 22(3). <https://doi.org/10.3390/s22031168>
- ELIADES, D. G., VRACHIMIS, S. G., MOGHADDAM, A., TZORTZIS, I., & POLYCARPOU, M. M. (2023). Contamination event diagnosis in drinking water networks: A review. *Annual Reviews in Control*, 55, 420–441. <https://doi.org/10.1016/j.arcontrol.2023.03.011>
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY [EMA]. (2006). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. <http://www.emea.eu.int>
- EZENARRO, J. J., PÁRRAGA-NIÑO, N., SABRIÀ, M., DEL CAMPO, F. J., MUÑOZ-PASCUAL, F. X., MAS, J., & URÍA, N. (2020). Rapid detection of legionella pneumophila in drinking water, based on filter immunoassay and chronoamperometric measurement. *Biosensors*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/bios10090102>
- FERRER-VILANOVA, A., ALONSO, Y., J EZENARRO, J., SANTIAGO, S., MUÑOZ-BERBEL, X., & GUIRADO, G. (2021). Electrochromogenic Detection of Live Bacteria Using Soluble and Insoluble Prussian Blue. *ACS Omega*, 6(46), 30989–30997. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03434>
- FIELDS, B. S., BENSON, R. F., & BESSER, R. E. (2002). Legionella and legionnaires' disease: 25 Years of investigation. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 15, Issue 3, pp. 506–526). <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>
- FLOREZ, L. C. (2020). *Desarrollo y evaluación de la performance de un método de medición de adenosín trifosfato (ATP) por bioluminiscencia*. Universidad Nacional de San Martín

- GERBA, C. P., & PEPPER, I. L. (2019). Drinking Water Treatment. In *Environmental and Pollution Science* (pp. 435–454). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814719-1.00024-0>
- HAMILTON, K. A., PRUSSIN, A. J., AHMED, W., & HAAS, C. N. (2018). Outbreaks of Legionnaires' Disease and Pontiac Fever 2006–2017. *Current Environmental Health Reports*, 5(2), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0201-4>
- HE, X., WU, H., WANG, Y., XIANG, Y., ZHANG, K., RAO, X., KANG, E., & XU, L. (2023). Bimodal Antimicrobial Surfaces of Phytic Acid–Prussian Blue Nanoparticles–Cationic Polymer Networks. *Advanced Science*, 10(16). <https://doi.org/10.1002/advs.202300354>
- HSIEH, K., ZEC, H. C., CHEN, L., KAUSHIK, A. M., MACH, K. E., LIAO, J. C., & WANG, T.-H. (2018). Simple and Precise Counting of Viable Bacteria by Resazurin-Amplified Picoarray Detection. *Analytical Chemistry*, 90(15), 9449–9456. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02096>
- JANG, J., HUR, H. G., SADOWSKY, M. J., BYAPPANAHALLI, M. N., YAN, T., & ISHII, S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- KAPER, J. B., NATARO, J. P., & MOBLEY, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- LABADIE, M., RANDRIANJATOVO-GBALOU, I., ZAIDI-AIT-SALEM, M., DOSSAT-LÉTISSE, V., FONTAGNÉ-FAUCHER, C., & MARCATO-ROMAIN, C. E. (2021). A dynamic resazurin microassay allowing accurate quantification of cells and suitable for acid-forming bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106172>
- LEE, J. Y., & DEININGER, R. A. (2004). Detection of E. coli in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. *Luminescence*, 19(1), 31–36. <https://doi.org/10.1002/bio.753>
- LIANG, H., ZHANG, D., WANG, W., YU, S., & NIMAI, S. (2023). Evaluating future water security in the upper Yangtze River Basin under a changing environment. *Science of the Total Environment*, 889. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164101>
- LIU, J., YANG, L., KJELLERUP, B. V., & XU, Z. (2023). Viable but nonculturable (VBNC) state, an underestimated and controversial microbial survival strategy. In *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.04.009>
- LIU, Y., YUAN, H., DING, D., DONG, H., WANG, Q., & ZHANG, D. (2021). Establishment of a Biosensor-based High-Throughput Screening Platform for Tryptophan Overproduction. *ACS Synthetic Biology*, 10(6), 1373–1383. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00647>

- MAAS, M. B., PEROLD, W. J., & DICKS, L. M. T. (2017). Biosensors for the detection of Escherichia coli. *Water SA*, 43(4), 707. <https://doi.org/10.4314/wsa.v43i4.17>
- MCGOVERIN, C., ROBERTSON, J., JONMOHAMADI, Y., SWIFT, S., & VANHOLSBEECK, F. (2020). Species Dependence of SYTO 9 Staining of Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.545419>
- MEMPIN, R., TRAN, H., CHEN, C., GONG, H., HO, K. K., & LU, S. (2013). Release of extracellular ATP by bacteria during growth. *BMC Microbiology*, 13(301). <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/301>
- NEEDS, S. H., OSBORN, H. M. I., & EDWARDS, A. D. (2021). Counting bacteria in microfluidic devices: Smartphone compatible 'dip-and-test' viable cell quantitation using resazurin amplified detection in microliter capillary arrays. *Journal of Microbiological Methods*, 187. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106199>
- NOCKER, A., CHEUNG, C.-Y., & CAMPER, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.015>
- OCHROMOWICZ, K., & HOEKSTRA, E. J. (2006). *ATP as an indicator of microbiological activity in tap water*. oai:publications.jrc.ec.europa.eu:JRC32609
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS]. (2017a). Microbial aspects. In *Guidelines for drinking-water quality* (4th ed., pp. 117–153).
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS]. (2017b). *World Health Organization recommendations on drinking water parameters*. <https://circabc.europa.eu/ui/group/1c566741-ee2f-41e7-a915-7bd88bae7c03/library/1e9b1225-ebfc-427d-84e7-91382901edfa/details?download=true>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS], & FONDO DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA INFANCIA [UNICEF]. (2023). *Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2022 - Special focus on gender*. <https://www.who.int/publications/m/item/progress-on-household-drinking-water--sanitation-and-hygiene-2000-2022---special-focus-on-gender>
- PATEL, I. R., GANGIREDLA, J., LACHER, D. W., MAMMEL, M. K., JACKSON, S. A., LAMPEL, K. A., & ELKINS, C. A. (2016). FDA Escherichia coli Identification (FDA-ECID) microarray: A pangenome molecular toolbox for serotyping, virulence profiling, molecular epidemiology, and phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(11), 3384–3394. <https://doi.org/10.1128/AEM.04077-15>

- PSOTTA, C., CHATURVEDI, V., GONZALEZ-MARTINEZ, J. F., SOTRES, J., & FALK, M. (2023). Portable Prussian Blue-Based Sensor for Bacterial Detection in Urine. *Sensors*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/s23010388>
- ROBERTSON, J., MCGOVERIN, C., VANHOLSBECK, F., & SWIFT, S. (2019). Optimisation of the protocol for the LIVE/DEAD®BacLight™ bacterial viability kit for rapid determination of bacterial load. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00801>
- SIMÕES, J., & DONG, T. (2018). Continuous and real-time detection of drinking-water pathogens with a low-cost fluorescent optofluidic sensor. *Sensors*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/s18072210>
- SLOAN, W. T., QUINCE, C., & CURTIS, T. P. (2008). The Uncountables. In K. Zengler (Ed.), *Accessing Uncultivated Microorganisms* (pp. 33–54). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555815509.ch3>
- URBAN, L., HOLZER, A., BARONAS, J. J., HALL, M. B., BRAEUNINGER-WEIMER, P., SCHERM, M. J., KUNZ, D. J., PERERA, S. N., MARTIN-HERRANZ, D. E., TIPPER, E. T., SALTER, S. J., & STAMMNITZ, M. R. (2021). Freshwater monitoring by nanopore sequencing. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.61504>
- VANG, Ó. K., CORFITZEN, C. B., SMITH, C., & ALBRECHTSEN, H. J. (2014). Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water. *Water Research* 64, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.015>
- WANG, J., HUANG, X., XIE, J., HAN, Y., HUANG, Y., & ZHANG, H. (2021). Exosomal analysis: Advances in biosensor technology. *Clinica Chimica Acta*, 518, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.03.026>
- WHALEN, P. A., TRACEY, D. R., & DUGUAY, J. (2018). Adenosine Triphosphate (ATP) measurement technology. In *Microbiological Sensors for the Drinking Water Industry* (pp. 137–154). IWA Publishing. https://doi.org/10.2166/9781780408699_0137
- YANG, C., SUN, W., & AO, X. (2020). Bacterial inactivation, DNA damage, and faster ATP degradation induced by ultraviolet disinfection. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 14(1). <https://doi.org/10.1007/s11783-019-1192-6>
- YANG, N. C., HO, W. M., CHEN, Y. H., & HU, M. L. (2002). A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP. *Analytical Biochemistry*, 306(2), 323–327. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5698>
- ZHAO, Y., CHEN, F., LI, Q., WANG, L., & FAN, C. (2015). Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chemical Reviews*, 115(22), 12491–12545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>

ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Objetivos de desarrollo sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.		X		
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento	X			
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.		X		
ODS 13. Acción por el clima.		X		
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Este Trabajo Final de Grado presenta un grado de relación alto con el ODS: Agua limpia y saneamiento. Dado que su objetivo final es el desarrollo de un método de detección temprana de la contaminación en aguas, contribuye a las metas 6.1: lograr el acceso universal y equitativo al agua potable a un precio asequible para todos, 6.3: mejorar la calidad del agua reduciendo la contaminación, y 6.5: implementar la gestión integrada de los recursos hídricos.

Además, la detección temprana de microorganismos patógenos en aguas permite reducir el riesgo de infección por enfermedades transmitidas por el agua, por lo que se alinea con la meta 3.9: reducir sustancialmente el número de muertes y enfermedades producidas por productos químicos peligrosos y la contaminación del aire, el agua y el suelo, del ODS 3: Salud y bienestar. También permite optimizar los recursos hídricos, por lo que da respuesta la meta 12.2: lograr la gestión sostenible y el uso eficiente de los recursos del ODS 12: Producción y consumo responsables.

Finalmente, se puede relacionar con la meta 13.3: mejorar la educación, sensibilización y la capacidad humana e institucional respecto de la mitigación del cambio climático, la adaptación a él, la reducción de sus efectos y la alerta temprana del ODS 13: Acción sobre el clima. En concreto, se enfoca a mejorar el aprovechamiento de los recursos hídricos disponibles, colaborando por tanto a mejorar la situación mundial de escasez de agua, que se está viendo agravada por los efectos del cambio climático.