

**SUPERVIVENCIA Y POTENCIAL MULTIPLICACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* EN UNA  
LAGUNA PAMPEANA UTILIZADA CON FINES RECREATIVOS**

Trabajo Final de Grado

de la alumna



Junín, 14 de agosto de 2024

**SUPERVIVENCIA Y POTENCIAL MULTIPLICACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* EN UNA  
LAGUNA PAMPEANA UTILIZADA CON FINES RECREATIVOS**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

**ANTONELLA ROCIO VIALE**

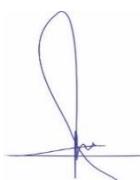
Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador/a**



Guillermina Nuozzi

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador/a**



María Romina Schiaffino

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador/a**

(Nombre y Apellido)  
**Co-Director/a**

(Nombre y Apellido)  
**Director/a**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Junín, 14 de agosto de 2024

## RESUMEN

La presencia de *Escherichia coli* en el agua se ha considerado durante mucho tiempo como un indicador de contaminación fecal adecuado para evaluar la calidad microbiológica de la misma. Sin embargo, estudios recientes han informado que algunas cepas específicas de *E. coli* pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo, y potencialmente reproducirse en ambientes extraintestinales (e.g. agua, suelo, sedimentos). Consecuentemente, el uso de *E. coli* como bioindicador de contaminación fecal en los últimos años se ha vuelto controvertido, argumentándose que la confiabilidad de esta bacteria como especie indicadora está comprometida por su persistencia y ocurrencia en la naturaleza. La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, pero algunas han adquirido mecanismos que las convierten en patogénicas para los humanos, pudiendo causar enfermedades intestinales y extraintestinales. Las cepas de *E. coli* productoras de toxina shiga (STEC) son consideradas un patógeno emergente, asociado con casos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). Estas cepas patógenas pueden transmitirse a través de aguas de uso recreativo, lo que plantea un riesgo significativo para la salud pública. El objetivo de este trabajo fue estudiar la supervivencia y potencial proliferación de *E. coli* en aguas naturales provenientes de una laguna pampeana utilizada con fines recreativos (deportes acuáticos), mediante experimentos en microcosmos en condiciones controladas.

Este trabajo consistió en evaluar una cepa de *E. coli* no patógena (NP) y una cepa patógena STEC (*stx<sub>1</sub>/stx<sub>2</sub>*) (P), previamente aisladas de cuerpos acuáticos de la región pampeana, durante 133 días mediante microcosmos con agua de laguna (previamente filtrada y autoclavada) y microcosmos con medio LB como control positivo de crecimiento. La cuantificación de *E. coli* en los microcosmos se llevó a cabo mediante distintas técnicas, como recuentos en placas cromogénicas, densidad óptica DO<sub>600</sub> y citometría de flujo. Además, se realizó la caracterización genética de las cepas mediante métodos moleculares.

Los resultados revelaron que la cepa P sobrevivió entre 30 y 84 días en agua de laguna, mientras que la cepa NP mostró una supervivencia entre 84 y 133 días. Asimismo, se observó que ambas cepas no solo sobrevivieron en el agua de la laguna, sino que también se multiplicaron. La citometría de flujo y la densidad óptica DO<sub>600</sub> demostraron ser métodos complementarios, pero no fueron ideales para cuantificar la abundancia de *E. coli* debido a su falta de selectividad. Por otra parte, los métodos moleculares proporcionaron detalles sobre el genoma de las cepas, como factores de virulencia y confirmaron su género y especie.

Palabras clave: *Escherichia coli*, contaminación fecal, supervivencia, laguna pampeana

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora, Romi, por permitirme ser parte de este proyecto y abrirme las puertas del Laboratorio de Limnología. Por el acompañamiento y aliento en los momentos difíciles. Gracias por todos los conocimientos compartidos y calidez humana.

A mi co-directora, Guille, por su compromiso y disposición para enseñarme con paciencia, respondiendo a cada una de mis preguntas y brindándome valiosos consejos. Gracias por ser mi guía y mentora en la realización de esta tesis, que de otro modo no hubiera sido posible.

A los integrantes del laboratorio, Mara y Pía, por sus consejos tanto en la planificación del experimento como en el desarrollo de la vida científica. A Rodri y Vivi, quienes ofrecieron su ayuda desinteresada y siempre estuvieron presentes en todo el experimento, les agradezco por hacer que este proceso fuera más fácil.

A la UNNOBA, por ofrecerme una formación académica de calidad y ofrecerme numerosas oportunidades. A los profesores de la carrera, por su dedicación y por transmitir su amor por la genética y la ciencia a lo largo de estos años.

A mis amigos de la facultad, Nico, Maxi, Cande, Mari e Iri, les agradezco por ser mi familia universitaria durante este tiempo. Por compartir viajes, informes de laboratorio, interminables clases teóricas, nervios antes de los exámenes y muchos festejos. Especialmente, a Nico, Maxi y Mari, quienes siempre me brindaron su apoyo incondicional, ayudándome a no rendirme en los momentos de dificultad. Son personas que todos desearían tener en su vida, por su alegría, entusiasmo y resiliencia. Estoy segura de que serán excelentes profesionales y lograrán todo lo que se propongan.

A mis amigas de toda la vida, Agus y Luli, por su paciencia durante mi ausencia, siempre apoyándome y empujándome hacia adelante.

A cada uno de mis tíos, primos y abuelos, por su apoyo a la distancia. En especial, a mi tío Dante, quien me acompañó y apoyó en la decisión de estudiar una carrera. Agradezco por cada comida casera compartida, por las risas y picardías, y por enseñarme la frase: "honor y gloria" que te caracteriza. Aunque no pudo estar presente físicamente al concluir este trabajo, siempre estará en mi corazón.

A mi familia, mi mamá Liliana, mi papá Juan y mis hermanos, Chiara y Bruno, a quienes les dedico este trabajo final de grado con todo mi amor. Gracias por su apoyo incondicional, que ha sido una constante en mi vida. Por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia, y son esos principios que me han guiado en cada paso de este camino. Agradezco profundamente los sacrificios que hicieron para que pudiera estudiar, así como las palabras de aliento en los momentos de duda. Su amor y apoyo fueron mi mayor motivación, y siempre llevaré en mi corazón todo lo que han hecho por mí.

## ABREVIATURAS

<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>P:</b> <i>E. coli</i> patógena
<b>ANOVA MR:</b> Análisis de varianza de medidas repetidas	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>APHA:</b> American Public Health Association	<b>PI:</b> Yoduro de Propidio
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>PRS:</b> Fósforo reactivo soluble
<b>CDOM:</b> Materia orgánica cromofórica disuelta	<b>PSLC:</b> Peso seco libre de cenizas
<b>Chl-a:</b> Clorofila	<b>PT:</b> Fósforo total
<b>CITNOBA:</b> Centro de Innovación y Transferencia del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires	<b>RAM:</b> Resistencia a los antimicrobianos
<b>DAEC:</b> <i>E. coli</i> de adherencia difusa	<b>REC:</b> Recuento rápido de coliformes/ <i>E. coli</i>
<b>DEC:</b> <i>E. coli</i> diarreigénica	<b>SBS:</b> <i>Sequencing By Synthesis</i>
<b>DO:</b> Densidad óptica	<b>SD:</b> Eliminación de dobletes
<b>EAEC:</b> <i>E. coli</i> enteroagregativo	<b>SEPEC:</b> <i>E. coli</i> causante de sepsis
<b>EAEC-stx:</b> <i>E. coli</i> shigatoxigénico/ enteroagregativo	<b>SGC:</b> Secuenciación del genoma completo
<b>EIEC:</b> <i>E. coli</i> enteroinvasivo	<b>SS:</b> Sólidos en suspensión
<b>ENOS:</b> Fenómeno El Niño – Oscilación Sur	<b>SSC:</b> <i>Side Scatter</i>
<b>EPEC:</b> <i>E. coli</i> enteropatógeno	<b>ST MLST:</b> Secuenciotipos obtenidos mediante la tipificación multilocus de secuencias
<b>ETEC:</b> <i>E. coli</i> enterotoxigénico	<b>STEC:</b> <i>E. coli</i> shigatoxigénico o productora de toxina Shiga
<b>ExPEC:</b> <i>E. coli</i> extraintestinal	<b>SUH:</b> Síndrome urémico hemolítico
<b>FIB:</b> <i>Fecal indicator bacteria</i>	<b>TO:</b> Naranja de Tiazol
<b>fliC:</b> Flagelina	<b>TSI:</b> Índice de Estado Trófico
<b>FSC:</b> <i>Forward Scatter</i>	<b>UFC:</b> Unidades formadoras de colonias
<b>GABA:</b> Gamma-aminobutirato	<b>UNNOBA:</b> Universidad Nacional del Noroeste de la Pcia. de Buenos Aires
<b>LB:</b> Caldo nutritivo Luria-Bertani	<b>UPEC:</b> <i>E. coli</i> uropatógena
<b>LPS:</b> Lipopolisacáridos	<b>VBNC:</b> Bacteria viable pero no cultivable
<b>MLST:</b> Tipificación multilocus de secuencias	<b>VTEC:</b> <i>E. coli</i> productora de verotoxina
<b>NGS:</b> <i>Next Generation Sequencing</i>	<b>WGS:</b> <i>Whole genome sequencing</i>
<b>NMEC:</b> <i>E. coli</i> asociada a meningitis neonatal	<b>wzm &amp; wzt:</b> Genes que codifican para el transportador de casete de unión a ATP para la biosíntesis de O-polisacáridos
<b>NMP:</b> Número más probable	<b>wzx:</b> Gen que codifica para la flipasa del antígeno O
<b>NP:</b> <i>E. coli</i> no patógena	<b>wzy:</b> Gen que codifica para la polimerasa de antígeno O
<b>NTK:</b> Nitrógeno total Kjeldahl	
<b>NTU:</b> Unidad nefelométrica de turbidez	
<b>OD:</b> oxígeno disuelto	

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. <i>Escherichia coli</i> y otras bacterias en sistemas acuáticos .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Patogenicidad y transmisión de <i>E. coli</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Persistencia de <i>E. coli</i> en ambientes naturales .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Antecedentes de supervivencia de <i>E. coli</i> en ambientes acuáticos .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. Métodos de detección y cuantificación de bacterias.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.1. Cultivos cromogénicos.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.2. Secuenciación del genoma completo (SGC).....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.3. Citometría de flujo.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6. Ecosistemas acuáticos superficiales de la Región Pampeana.....</b>	<b>17</b>
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Objetivo general .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Área de estudio .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Obtención de muestras y medición de variables ambientales.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3. Acondicionamiento del agua recolectada.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4. Cultivo de cepas previamente aisladas y secuenciadas .....</b>	<b>24</b>
<b>4.4.1. Concentración inicial de cepas .....</b>	<b>25</b>
<b>4.5. Experimentos en microcosmos.....</b>	<b>25</b>
<b>4.5.1. Placas de cultivo .....</b>	<b>27</b>
<b>4.5.2. Medición de la densidad óptica .....</b>	<b>28</b>
<b>4.5.3. Viabilidad de las cepas mediante citometría de flujo .....</b>	<b>28</b>
<b>4.6. Análisis estadístico.....</b>	<b>29</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1. Descripción de parámetros ambientales en el agua de laguna al inicio y finalización del ensayo .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2. Análisis microbiológico .....</b>	<b>32</b>
<b>5.3. Análisis de secuenciación del genoma completo (SGC) .....</b>	<b>33</b>
<b>5.4. Concentración inicial .....</b>	<b>34</b>
<b>5.5. Supervivencia de las cepas NP y P en los ensayos de microcosmos .....</b>	<b>35</b>
<b>5.5.1. Supervivencia de las cepas NP y P en agua de laguna .....</b>	<b>36</b>
<b>5.5.2. Supervivencia de las cepas NP y P en medio LB.....</b>	<b>37</b>

<b>5.6. Estimación del crecimiento celular (DO 600 nm) de las cepas NP y P en los ensayos de microcosmos .....</b>	<b>39</b>
<b>5.7. Viabilidad de las cepas NP y P en los ensayos de microcosmos mediante citometría de flujo .....</b>	<b>41</b>
<b>5.7.1. Viabilidad de las cepas NP y P en agua de laguna.....</b>	<b>41</b>
<b>5.7.2. Viabilidad de las cepas NP y P en medio LB .....</b>	<b>43</b>
<b>5.7.3. Correlación entre los recuentos en placa Petrifilm 24 hs<sup>TM</sup> y los recuentos de células mediante la citometría de flujo .....</b>	<b>45</b>
<b>5.8. Determinación de variables físico-químicas en los ensayos de microcosmos.....</b>	<b>46</b>
<b>5.9. Análisis de las variables físico-químicas en relación a la abundancia de las cepas de <i>E. coli</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>5.9.1. Análisis de las variables físico-químicas en relación a la abundancia de las cepas de <i>E. coli</i> en agua de laguna .....</b>	<b>47</b>
<b>5.9.2. Análisis de las variables físico-químicas en relación a la abundancia de las cepas de <i>E. coli</i> en medio LB .....</b>	<b>49</b>
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
<b>6.1. Caracterización genética de las cepas.....</b>	<b>51</b>
<b>6.2. Supervivencia de cepas de <i>E. coli</i> NP y P en los ensayos de microcosmos.....</b>	<b>54</b>
<b>6.2.1. Placas de cultivo .....</b>	<b>54</b>
<b>6.2.2. Absorbancia.....</b>	<b>57</b>
<b>6.2.3. Citometría de flujo.....</b>	<b>58</b>
<b>6.2.4. Supervivencia de cepas <i>E. coli</i> comerciales y ambientales en microcosmos.....</b>	<b>60</b>
<b>6.3. Análisis de la concentración de nutrientes en los microcosmos con agua de laguna .....</b>	<b>61</b>
<b>6.4. Análisis de las variables físico-químicas en los ensayos de microcosmos .....</b>	<b>62</b>
<b>6.4.1. pH .....</b>	<b>62</b>
<b>6.4.2. Conductividad.....</b>	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Escherichia coli* y otras bacterias en sistemas acuáticos

Las bacterias son ubicuas en la naturaleza y habitan un amplio abanico de ambientes en el planeta, inclusive en sistemas acuáticos, constituyendo la comunidad biológica conocida como bacteriplancton. El mismo juega un papel fundamental en la regulación de los ciclos biogeoquímicos y conforma, junto con el resto de los microorganismos, el denominado bucle microbiano (*microbial loop*), a través del cual el carbono orgánico disuelto retorna a los niveles tróficos superiores y se articula con el resto de la cadena alimentaria (Azam et al., 1983). Dentro de la columna de agua se pueden encontrar bacterias que son imprescindibles para el desarrollo de la vida, así como también especies consideradas contaminantes biológicos de los cuerpos de agua. Dentro de este último grupo, se pueden encontrar especies potencialmente patógenas para el ser humano (e.g., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Yersinia* sp., *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas* sp., entre otras), muchas de las cuales pertenecen al filo Pseudomonadota y, en particular, a la clase Gammaproteobacteria (Fernandez et al., 2007; Tracogna et al., 2013; Cantet et al., 2013; Nuozzi et al., 2021; Sagua et al., 2021). Dentro de esta clase se encuentran las bacterias pertenecientes al género *Escherichia*, y en particular la especie *Escherichia coli* está ampliamente distribuida en la naturaleza (Miliwebsky et al., 2019).

*E. coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo que coloniza habitualmente la flora intestinal humana y de animales endotérmicos (WHO, 2012; Bianchi et al., 2014; Miliwebsky et al., 2019). Esta especie es la más abundante dentro del grupo de bacterias coliformes fecales, razón por cual es empleada, a nivel mundial, como especie bioindicadora de contaminación fecal en ambientes acuáticos (Bianchi et al., 2014).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son no patógenas e inofensivas, pero algunas cepas poseen una gran capacidad de adquisición y diseminación de genes de virulencia y resistencia a antimicrobianos dentro del tracto digestivo y en matrices ambientales, incluidas aguas superficiales, subterráneas, suelos, sedimentos, etc. (Maal-Bared et al., 2013). De esta forma, pueden causar enfermedades intestinales y extraintestinales en los humanos, como diarrea, infecciones del tracto urinario, septicemia y meningitis neonatal (Clermont et al., 2000; Barbau-Piednoir et al., 2018; Guo et al., 2019).

### 1.2. Patogenicidad y transmisión de *E. coli*

Estas bacterias se pueden clasificar en base a tres tipos de antígenos: somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H) (Jang et al., 2017), aunque esta clasificación no aporta ninguna información acerca de su patogenicidad. Las bacterias de *E. coli* patógenas para el humano pueden dividirse en dos grupos principales: El grupo de *E. coli* diarreigénica (DEC) y *E. coli* extraintestinal (ExPEC) (Croxen & Finlay, 2009; Spina, 2015). Las cepas ExPEC están conformadas por 3 patotipos: uropatógena (UPEC), asociados a meningitis neonatal (NMEC) y causante de sepsis (SEPEC). Por otro lado, el grupo DEC puede dividirse en 7 patotipos: shigatoxigénico o productora

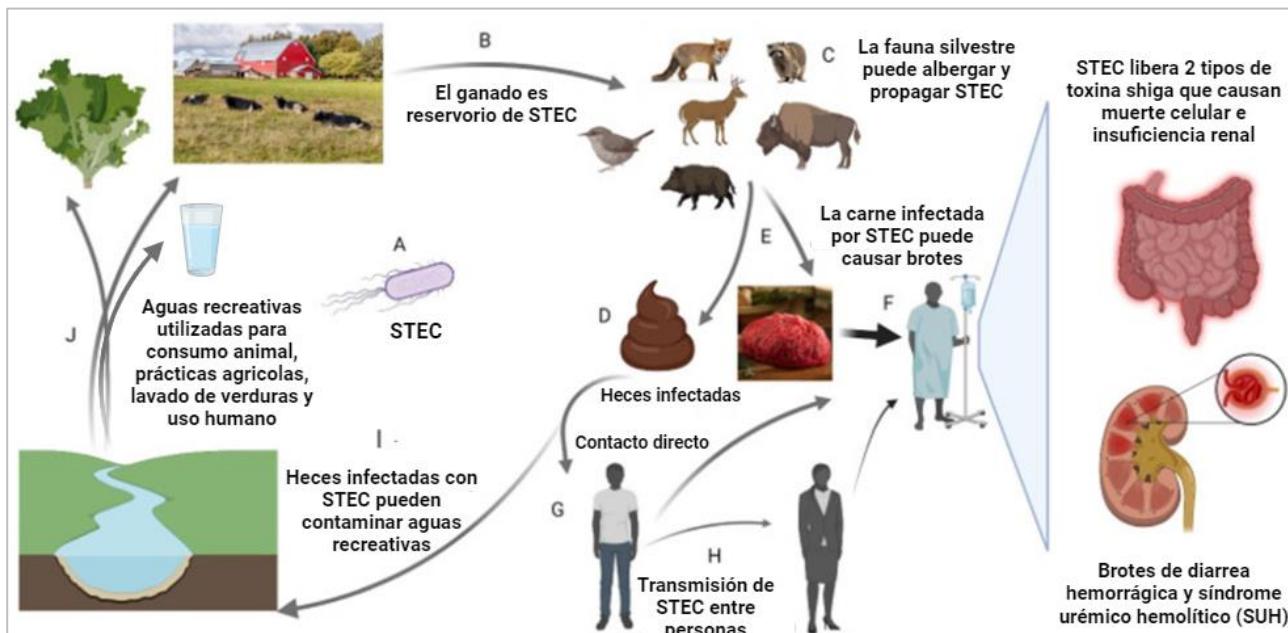
de toxina Shiga (STEC), enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), enteroagregativo (EAEC), de adherencia difusa (DAEC), y shigatoxigénico /enteroagregativo (EAEC-stx) (Kaper et al., 2004; Croxen et al., 2013; Gomes et al., 2016; De Mello Santos et al., 2020).

En particular, el patotipo STEC, también llamado *E. coli* productora de verotoxina (VTEC), es considerado un patógeno emergente generalmente asociado a brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). La patogenicidad de los STEC está relacionada a la producción de la toxina Shiga (o toxina Vero), codificadas por los genes *stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2</sub>* (e.g., Karmali et al., 2010; Clements et al., 2012). A su vez, se puede clasificar los serotipos de STEC en 5 seropatotipos (A-E), de acuerdo a su potencial patogénico y epidémico. El seropatotipo A (O157:H7 y O157: NM) es considerado como el más virulento, el seropatotipo B (O26:H11, O121:H19 y O103:H2, entre otros) se asocia con enfermedad humana grave, pero con una frecuencia más baja, y es poco común en brotes. Los seropatotipos C (O91:H21, O104:H21 y O113:H21, entre otros), y D (O7:H4, O69:H11, O103:H25, O113:H4, entre otros) tienen una baja incidencia en enfermedad humana, y rara vez se asocian a brotes. Por último, el seropatotipo E (O6:H34, O8:H19, O39:H49, O46:H38, entre otros) se compone de muchos serotipos que se encuentran en el reservorio animal y en los alimentos, pero que hasta el momento no han sido implicados en enfermedades humanas (Karmali et al., 2003; Farrokh et al., 2013).

En especial, STEC es una grave preocupación para la salud pública debido a su asociación con grandes brotes y con el SUH, que es la principal causa de insuficiencia renal aguda en los niños (Karmali et al., 2010). En este sentido, Argentina tiene la tasa más alta de SUH a nivel mundial con 8-10 casos/100.000 niños menores de 5 años (Boletín Integrado de Vigilancia Nº 463-SE 34/2019) y el serotipo O157:H7 de *E. coli* es la causa más común (Bustamante et al., 2012). Si bien este serotipo es el responsable de brotes con mayor frecuencia, existen otros serotipos no-O157 asociados a colitis hemorrágica y SUH, como O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM, O8:H19 y O145:H25 (Dublan & Galizio, 2020). En particular, el serotipo O103:H2 adquiere relevancia debido a que se considera un patógeno emergente en Alemania, Argentina, Canadá, Estados Unidos, Francia, Italia y Finlandia (Eklund et al., 2001; Prager et al., 2002; Tozzi et al., 2003; Beutin et al., 2005; Rivas et al., 2006; Karama et al., 2008).

La principal vía de transmisión de STEC O157 y no-O157 son los alimentos contaminados, como, por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, agua, entre otros (Moe, 2002). La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces del ganado bovino. Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales y la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral. La contaminación fecal del agua puede deberse a la descarga de materia fecal

en aguas de recreación o en aguas de pozo que son consumidas sin previo tratamiento de potabilización (Rivas et al., 2006) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Vías de transmisión de STEC. **A.** STEC. **B.** El ganado es reservorio de STEC y puede transmitirse mediante zoonosis. **C.** Los animales tienen la posibilidad de entrar en contacto con estos vectores, actuando como portadores y propagadores de STEC. **D.** La bacteria se propaga mediante eliminación a través de las heces y (**E**) carne contaminada. **F.** Los humanos corren el riesgo de infección al consumir productos cárnicos contaminados con STEC o (**G**) a través del contacto directo con heces contaminadas. Todo esto puede provocar brotes de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. **H.** La transmisión de STEC entre personas es posible a través del contacto directo. **I.** Las heces contaminadas pueden descargarse en aguas de recreación que (**J**) utilizan habitualmente otros animales, para prácticas agrícolas o consumo humano sin previo tratamiento de potabilización. Adaptado de Ray & Singh (2022).

Por otra parte, varios estudios han descrito la detección de STEC O103:H2 en seres humanos y han establecido la relación entre estas cepas aisladas y las muestras recogidas en el medio ambiente (Heinikainen, 2007; Park et al., 2018). Estos trabajos demostraron que el medio acuático puede ser un vehículo importante para la transmisión de *E. coli* patógena. Por lo tanto, conocer las tasas de supervivencia de las cepas de *E. coli* encontradas en el agua de sistemas acuáticos utilizados con fines recreativos es de suma utilidad para evaluar la contaminación microbiana y tomar medidas apropiadas de manejo (Blaustein et al., 2013).

### 1.3. Persistencia de *E. coli* en ambientes naturales

La presencia de *E. coli* en el agua se ha considerado durante mucho tiempo como un indicador de contaminación fecal adecuado para evaluar la calidad microbiológica de la misma. Sin embargo, su uso como

indicador en los últimos años se ha vuelto controvertido. Se ha argumentado que la confiabilidad de esta bacteria como un indicador de ingreso de materia fecal a los sistemas está comprometido por su persistencia y ocurrencia en la naturaleza (Fujioka & Byappanahalli, 2003).

Anteriormente se creía que *E. coli* no podía sobrevivir mucho tiempo en el ambiente, ni crecer en hábitats secundarios, como agua, sedimentos y suelo (Winfield & Groisman, 2003). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que esta bacteria, incluyendo las *E. coli* patógenas, pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo fuera del tracto intestinal y reproducirse en el suelo, la arena y los sedimentos en climas tropicales, subtropicales y templados (e.g., Ishii & Sadowsky, 2008; Tymensen et al., 2015; Jang et al., 2017; Suzuki et al., 2019). La persistencia de *E. coli* patógena, la adaptación ambiental, supervivencia y habilidad de crecer en condiciones ambientales fluctuantes, no solo dependen de su genotipo, sino también del intercambio horizontal de genes que promueven la existencia bacteriana en un hábitat particular (Aminov, 2011). El crecimiento y la supervivencia de *E. coli* en entornos naturales pueden verse influidos por factores bióticos y abióticos (Rochelle-Newall et al., 2015). Los factores abióticos incluyen la temperatura, la disponibilidad de agua y nutrientes, el pH y la radiación solar. Los factores bióticos incluyen la capacidad de *E. coli* para adquirir nutrientes, competir con otros microorganismos y formar biofilms (Jang et al., 2017). En particular, se ha observado que las temperaturas cálidas del agua y las altas concentraciones de nutrientes en el ambiente son factores promotores de la supervivencia y el crecimiento de *E. coli* fuera del huésped (e.g., Ishii & Sadowsky 2008; Jang et al., 2017).

Por consiguiente, el análisis de la calidad bacteriológica del agua es de vital importancia no solo para el consumo humano y animal (Sun et al., 2011; Gharibi et al., 2012), sino también para el riego agrícola (Palese et al., 2009; Pachepsky et al., 2011) y las actividades recreativas (Kumar et al., 2012). Se ha observado que una gran variedad de microorganismos patógenos puede ser transmitida a los humanos mediante el uso de aguas recreativas naturales (agua dulce y marina) contaminadas por aguas residuales (APHA, 2005). Por lo tanto, la contaminación bacteriana en el agua representa no sólo un problema sanitario, sino también un serio riesgo ambiental (Berthe et al., 2008). Una vez que las bacterias se distribuyen por el agua o los sedimentos del cauce de los ríos pueden penetrar a los organismos acuáticos por absorción a través del tegumento o de las branquias, captación de partículas suspendidas y/o por consumo de alimentos contaminados (van der Oost et al., 2003; Dang & Dalsgaard, 2012). Cuando la concentración de *E. coli* en agua es lo suficientemente elevada ( $> 5 \times 10^4$  UFC/ml) puede infectar distintos órganos, tales como el tegumento, el músculo, las branquias y/o el hígado (El-Shafai et al., 2004; Guzmán et al., 2004; Dang & Dalsgaard, 2012).

En particular, las aguas recreativas y los suministros públicos de agua contaminadas por *E. coli* representan un riesgo para la salud humana, ya que algunas cepas pueden ser patógenas o propagarse con otros microorganismos patógenos (Orsi et al., 2007). Recientemente, *E. coli* se ha clasificado como patógeno

prioritario para la vigilancia debido a su amplia resistencia a los antibióticos (Tacconelli et al., 2018; Pellegrini et al., 2022). La importancia de la *E. coli* patógena y su resistencia a los antimicrobianos se ejemplifica con intensos programas internacionales de vigilancia que monitorean y rastrean brotes, incluidas muestras ambientales; aunque, lamentablemente, esta vigilancia a menudo no se aplica completamente en los países en desarrollo (Croxen et al., 2013; Ayukekbong et al., 2017), como Argentina.

#### **1.4. Antecedentes de supervivencia de *E. coli* en ambientes acuáticos**

Los primeros estudios en evaluar la sobrevida de las bacterias *E. coli* en agua dulce en condiciones de laboratorio, hallaron que el tiempo en que el 90% de las bacterias mueren (T90) era igual a 110 h en agua dulce (Dufour, 1984). Otro estudio mostró que a 23°C cepas de *E. coli* O157:H7 toxina-negativa crecieron y sobrevivieron mejor que su contraparte toxina-positiva, mientras que tales diferencias no fueron encontradas a temperaturas más bajas, confirmando una influencia de la composición genética en la supervivencia (Kudva et al., 1998). Sin embargo, trabajos recientes han informado que *E. coli* puede persistir (sobrevivir y reproducirse) por largos períodos y naturalizarse en el medio ambiente, aumentando así el riesgo de colonización de nuevos huéspedes (Jang et al., 2017; Suzuki et al., 2019; Petersen & Hubbart, 2020; Mohamed Hatha, 2021). En distintas partes del mundo se han realizado estudios para evaluar la supervivencia de bacterias coliformes fecales en agua de mar (Šolić & Krstulović 1992, Rozen & Belkin 2001 y citas allí mencionadas), suelos (Ishii et al. 2010) y cuerpos de agua dulce (Bergstein-Ben Dan et al., 1997; Surbeck et al., 2010; Suzuki et al. 2019; Petersen & Hubbart, 2020 y citas allí mencionadas). En nuestro país existe un vacío de investigación, dado que no hay estudios de supervivencia y/o proliferación de estas bacterias en sistemas acuáticos superficiales pampeanos, en cuyas aguas se realicen inmersiones u otras actividades recreativas. No obstante, Polifroni et al. (2009) estudiaron la supervivencia de *E. coli* O157:H7 a temperatura ambiente en agua esterilizada procedente de bebederos de un tambo de la Región pampeana, recuperando células viables hasta el día 117 post-inoculación. Posteriormente, estos autores analizaron la supervivencia de *E. coli* STEC en agua de bebederos y materia fecal de bovinos, encontrando que los tiempos de supervivencia de los diferentes aislados de STEC O157 y no-O157 y los recuentos máximos alcanzados variaron en términos de las características competitivas y adaptativas de cada uno, así como de las condiciones ambientales donde fueron encontrados, aumentando de este modo el riesgo de contagio y de reinfección de animales y alimentos (Polifroni et al., 2014).

#### **1.5. Métodos de detección y cuantificación de bacterias**

El método tradicional de detección y cuantificación de bacterias se basa principalmente en el cultivo microbiano. Los métodos basados en cultivo son de bajo costo, fáciles de operar y altamente estandarizados, lo que los convierte en herramientas ampliamente utilizadas para el monitoreo regulatorio de bacterias patógenas, como la enumeración de FIB (*fecal indicator bacteria*) en aguas de baño (Tiwari et al., 2021). Sin

embargo, las principales limitaciones de estos métodos son la falta de diferenciación entre los microorganismos endógenos objetivo y otros no objetivo de las mismas muestras, resultados falsos negativos/positivos, procedimientos que consumen mucho tiempo y mano de obra, y la incapacidad de detectar células viables, pero no cultivables (VBNC) (Sohier et al., 2014). Además, en la aplicación de la investigación cuantitativa, los métodos basados en cultivos a menudo subestiman el número de bacterias. Esto afecta la precisión de la cuantificación de los objetivos y subestima la prevalencia de patógenos en la comunidad humana. Además, VBNC puede volverse viable y causar enfermedades aumentando el riesgo para la salud pública (Tiwari et al., 2021). Por lo tanto, los métodos moleculares, como la PCR y la secuenciación, han emergido rápidamente como técnicas de detección preferidas para bacterias patógenas, gracias a su alta precisión y especificidad (Zhang et al., 2021). Estos métodos no solo complementan la información obtenida a través del cultivo, sino que también permiten la identificación de bacterias en estado VBNC. Sin embargo, es relevante mencionar que los métodos moleculares no pueden proporcionar una representación precisa del estado de viabilidad de las bacterias (Wang & Levin, 2006; Khan et al., 2010; Massicotte et al., 2017). En este sentido, la citometría de flujo se destaca como una técnica analítica sensible, capaz de monitorear rápidamente los estados fisiológicos de las bacterias mediante técnicas de tinción, como la diferenciación entre células vivas y muertas (Khan et al., 2010). Por lo tanto, tanto los métodos moleculares como la citometría de flujo son capaces de complementar la información obtenida por los métodos de cultivo, ya que permiten la detección de las bacterias VBNC.

#### 1.5.1. Cultivos cromogénicos

Los métodos estándar para la detección y enumeración de *E. coli* en agua se basan en la filtración por membrana con la incubación posterior de los filtros en un medio de agar sólido y en el método de fermentación en tubos múltiples utilizando la estimación del número más probable (NMP) del recuento bacteriano (Ashbolt et al., 2001; Rompre et al., 2002). Sin embargo, la preparación de dichos medios es laboriosa y costosa, lo que genera la necesidad de medios listos para usar que reduzcan el tiempo y la mano de obra (Schraft & Watterworth, 2005).

En las últimas décadas, se han introducido métodos cromogénicos o fluorogénicos que emplean sustratos enzimáticos cromogénicos sintéticos para dirigirse específicamente a especies patógenas (o grupos de especies) en función de su actividad enzimática (Perry, 2017). Estos métodos, basados en sustratos definidos como  $\beta$ -galactosidasa para coliformes totales o  $\beta$ -glucuronidasa para *E. coli*, han mejorado significativamente la especificidad y rapidez de la detección (Edberg et al., 1991; Clark & el Shaarawi, 1993; Ashbolt et al., 2001; Rompre et al., 2002).

En particular, las placas Petrifilm™ REC para el recuento de *E. coli* (3M Center, St. Paul, MN, EE. UU.), proporcionan medios de cultivo listos para usar y permiten la identificación simultánea de coliformes y *E. coli*.

(Figura 2). Estas placas contienen nutrientes biliares de color rojo violeta, un agente gelificante, un indicador de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa y un indicador metabólico para facilitar la enumeración de colonias. Las colonias de *E. coli* aparecen en las placas como colonias azules con gas, basándose en el hecho de que aproximadamente el 97% producen  $\beta$ -glucuronidasa, resultando en un precipitado azul asociado con la colonia, y que aproximadamente el 95% producen gas. Las colonias de coliformes, por otro lado, aparecen en las placas como colonias rojas con gas. La producción de ácido y gas a partir de la lactosa durante la fermentación metabólica hace que el indicador de pH cambie el color del gel a un rojo más oscuro y el gas que rodea a las colonias de coliformes rojas indican coliformes confirmados (Schraft & Watterworth, 2005).



**Figura 2.** Placa Petrifilm 24 hs<sup>TM</sup> para el recuento de *E. coli* y coliformes. Adaptado de 3M Science Applied to Life<sup>TM</sup> (2019).

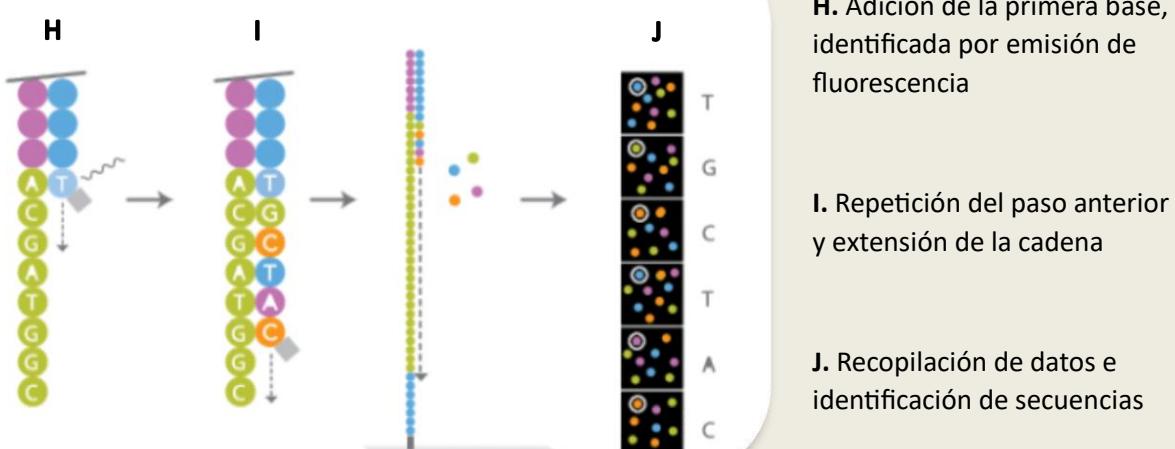
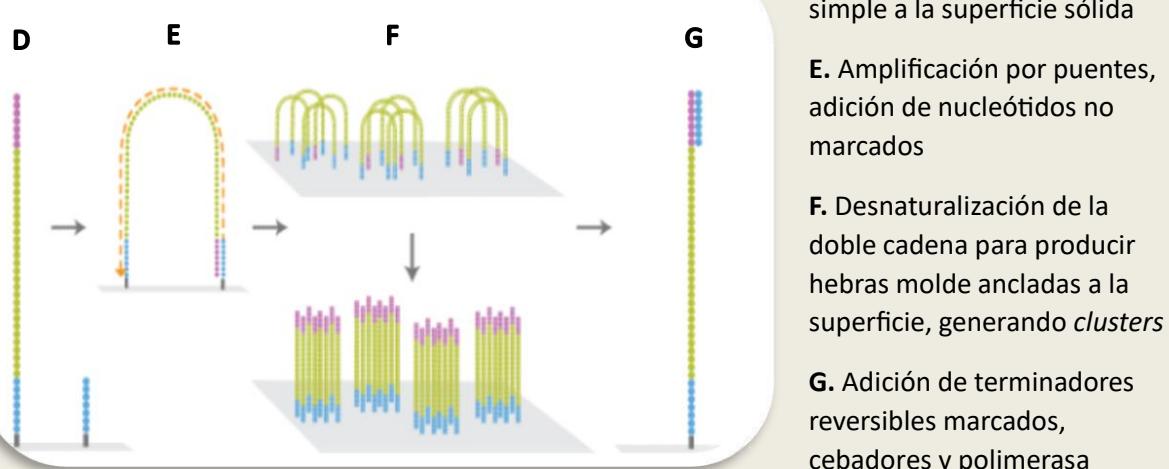
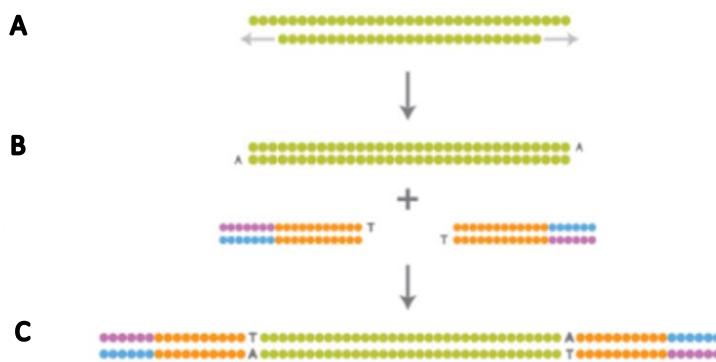
### 1.5.2. Secuenciación del genoma completo (SGC)

La secuenciación de próxima generación (NGS - *Next Generation Sequencing*), también conocida como secuenciación de alto rendimiento, es el término general utilizado para describir varias vías de secuenciación modernas diferentes. Estas tecnologías permiten secuenciar ADN y ARN más rápido y a menor costo que la secuenciación de Sanger, que se utilizaba anteriormente, revolucionando así la investigación en genómica y biología molecular (Behjati & Tarpey, 2013). Una de las aplicaciones de NGS ampliamente utilizadas actualmente es la secuenciación del genoma completo (SGC), también conocida como *Whole genome sequencing* (WGS) en inglés, que resulta un enfoque analítico para determinar la secuencia de todo el contenido genómico de un organismo (Mardis, 2008; Ståhl & Lundeberg, 2012). Este enfoque representa la tecnología más nueva y quizás más fundamental a disposición de los científicos de campo centrados en los

aspectos microbiológicos de las aguas superficiales y agrícolas (Lienau et al., 2011; Allard et al., 2018). Las aplicaciones de SGC son múltiples e incluyen una rápida identificación de patógenos de fuentes contaminadas de brotes, también se puede obtener información más detallada sobre los patógenos, como la resistencia a los antimicrobianos (RAM), la virulencia y la inferencia de posibles vínculos entre las fuentes de contaminación (Quainoo et al., 2017; Bell et al., 2021).

Las tecnologías NGS utilizadas para SGC son secuenciación de segunda generación (por ejemplo, Illumina) (Hilt & Ferreiri, 2022). Dentro de esta tecnología se encuentra Illumina MiSeq, utilizada ampliamente para evaluar la calidad microbiana en los cuerpos de agua e incluso identificar especies que sirven como indicadores biológicos de la contaminación de los mismos (e.g., Tan et al., 2015). Esta plataforma permite generar hasta 25 Gigabytes de información, con un tope de 25 millones de lecturas con una longitud máxima de 2x300 pares de bases (*paired end* o secuenciación desde ambos extremos) en cuestión de horas (<https://www.illumina.com/systems/sequencingplatforms/miseq/specifications.html>).

Las plataformas Illumina se basan principalmente en la secuenciación por síntesis (SBS – *Sequencing By Synthesis*), para lo que se requiere una preparación previa de la muestra en la que se fragmenta el ADN, se repara, y se añaden adaptadores a los extremos libres. Estos adaptadores se unirán a otros complementarios, adheridos a una placa donde se llevará a cabo la amplificación isotermal, mediante la cual la cadena a amplificar hibridará con otro adaptador complementario contiguo, formando un puente para que la enzima polimerasa sintetice la hebra complementaria. Este doble puente se desnaturaliza, quedando las dos cadenas recién sintetizadas inmovilizadas en la celda de flujo. El proceso se repite de manera cíclica y simultánea, generando *clusters* con la misma secuencia de nucleótidos. Posteriormente, se añaden los nucleótidos marcados fluorescentemente y los terminadores reversibles que, al unirse a la cadena en crecimiento generan una señal fluorescente que es captada por el equipo. Una vez que se haya detectado la primera base añadida y se hayan lavado los nucleótidos no incorporados, se elimina el terminador presente en el extremo 3' para que prosiga la síntesis de la cadena (**Figura 3**). El ciclo se repite nuevamente y, por último, las lecturas resultantes se agrupan y se alinean contra un genoma de referencia proveniente de bases de datos como SILVA o GreenGenes.



**Figura 3.** Protocolo de secuenciación por síntesis de Illumina. Esquema adaptado de Akinrinade (2016).

### 1.5.3. Citometría de flujo

La determinación precisa de bacterias vivas, muertas y totales es esencial en numerosas aplicaciones microbiológicas (Alsharif & Godfrey, 2002). Actualmente, se han desarrollado nuevos enfoques para evaluar la viabilidad bacteriana, entre los cuales destaca la citometría de flujo (Pianetti et al., 2005). Esta herramienta es poderosa en el ámbito de la ecología microbiana, ya que ha demostrado ser un método adecuado para evaluar la viabilidad de las bacterias en muestras de agua (Pianetti et al., 2005).

La citometría de flujo examina un gran número de células simultáneamente, registrando para cada célula varios parámetros diferentes que pueden relacionarse con una amplia variedad de características celulares (Shapiro, 1995). En un citómetro de flujo, normalmente entre 200 y más de 2.000 células por segundo circulan a través del haz de un láser o una lámpara de arco, y los circuitos electrónicos captan la luz dispersada por cada una de las partículas, así como la emisión de fluorescencia a diferentes longitudes de onda generadas por la excitación de cada partícula (Gasol & del Giorgio, 2000). Combinado con métodos de tinción, como los utilizados para distinguir células vivas y muertas, la citometría de flujo posibilita la obtención de datos cuantitativos y cualitativos (Shapiro, 1988; Vasavada et al., 1993; Pyle et al., 1999; Verthé & Verstraete, 2006).

## 1.6. Ecosistemas acuáticos superficiales de la Región Pampeana

La Región Pampeana ( $33\text{-}39^{\circ}\text{ S}$ ,  $57\text{-}66^{\circ}\text{ O}$ ) constituye una de las zonas ecológicas más amplias de Sudamérica, abarcando una superficie de aproximadamente  $800.000\text{ km}^2$  y atravesando zonas de alta importancia productiva para nuestro país (Soriano, 1992; Quirós, 2005). Dentro de esta región predominan los ecosistemas acuáticos de baja profundidad o lagunas, que poseen un origen fluvial eólico (Renella & Quirós, 2006). Las mismas no suelen estar estratificadas térmicamente salvo durante cortos períodos de tiempo (Quirós et al., 2002a) y presentan alta variabilidad en cuanto a sus niveles de salinidad (desde salinas a hipersalinas), sólidos en suspensión y turbidez, pudiéndose clasificar como de aguas turbias o claras (Conzonno & Claverie, 1990; Quirós y Drago, 1999; Quirós et al., 2002b; Fermani et al., 2015). Estas lagunas se caracterizan por presentar estados de aguas claras vegetadas (dominadas por macrófitas), aguas turbias orgánicas (dominadas por fitoplancton) e inorgánicas (cuya turbidez está dada por materiales inorgánicos en suspensión), así como también por encontrarse afectadas por un constante estrés ambiental (Quirós et al., 2002a; Quirós et al., 2002b; Allende et al., 2009). Por otra parte, las lagunas pampeanas también se caracterizan por estar naturalmente enriquecidas en nutrientes, alcanzando algunas un estado hipereutrófico (Ringuelet et al., 1967; Quirós & Drago, 1999; Seoane Rocha, 2018).

El cambio en el índice trófico, la turbidez y el deterioro general de estos cuerpos de agua surgen principalmente como resultado del efecto antropogénico, especialmente el proveniente de las actividades

agrícolas y ganaderas, que favorecieron la expansión de la frontera agrícola, con principal predominio del cultivo de soja. A esto se le suman los efectos de las descargas urbano-industriales con escaso o nulo tratamiento (Maizels et al., 2003), la construcción de estructuras para control de inundaciones (Gabellone et al., 2005; Torremorell et al., 2007) y el uso intensivo de agroquímicos (Peluso et al., 2009; Vera et al., 2010). Otro factor importante es el efecto provocado por el creciente cambio climático a nivel global, con aumentos de temperatura, incremento en los ciclos de inundación-sequía (Torremorell et al., 2007) y elevadas precipitaciones que, por efecto de la escorrentía, resultan en la deposición de agroquímicos y otros contaminantes en el agua (Vera et al., 2010; Sagua et al., 2023).

La suma de los factores mencionados junto con la fluctuación de determinadas variables ambientales, como el pH (Carvalho et al., 2003), la temperatura (Vrede et al., 2005), la salinidad (Wu et al., 2006), la concentración de determinados nutrientes (Vrede et al., 1999; Carvalho et al., 2003) y el patrón climático dado por el fenómeno El Niño – Oscilación Sur o ENOS (They et al., 2015), contribuyen a que la presencia, abundancia, metabolismo y distribución de las comunidades biológicas exhiban una marcada variación y una dinámica particular (Gabellone et al., 2005; Ager et al., 2010). De esta manera, se generan impactos sobre las especies vulnerables, afectando las interacciones ecológicas (Gallinat et al., 2015). Los ecosistemas acuáticos pampeanos cumplen funciones ambientales claves, moderando el régimen fluvial, mitigando los efectos del calentamiento global, albergando una gran biodiversidad, así como también brindando otros servicios ecosistémicos (tales como riego, pastoreo, pesca, transporte y actividades recreativas). En consecuencia, estos sistemas son considerados indicadores esenciales de la salud de todo el paisaje (Geraldi et al., 2011); y, por lo tanto, su estudio es de alta relevancia debido a que representan un importante recurso natural, económico y recreativo en la región.

Las aguas recreativas pueden definirse como cuerpos de agua superficiales utilizados para el baño y actividades deportivas, clasificándose en aguas de contacto primario a las que engloban actividades que involucran inmersión en agua con potencial ingestión de la misma (natación o buceo) y aguas de contacto secundario a aquellas donde se realizan actividades que no involucran inmersión, como el canotaje y la pesca deportiva (SRHN, 2003). Dado que las descargas provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales no funcionales, de aguas pluviales y de actividades ganaderas, vuelven a los cuerpos de agua superficiales posibles acervos para la contaminación por microorganismos patógenos (e.g., Florentino López et al., 2013; Saraceno et al., 2021), resulta esencial el monitoreo del estado ambiental y sanitario de los ecosistemas acuáticos utilizados con fines recreativos.

Diversos trabajos han abordado el estudio de bacterias potencialmente patógenas en aguas superficiales de la Región Pampeana, reportando la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y

*Citrobacter* (Sagua et al., 2018, 2020, 2021; Nuozzi et al., 2021). Además, se observó que varios sistemas acuáticos superaron en más de una ocasión los niveles guía de *E. coli* para uso recreativo establecidos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (SRHN, 2003): 293 NMP/100 ml (uso moderadamente frecuente), siendo las lagunas de la cuenca superior del río Salado las más afectadas (Quiroga 2020; Sagua et al., 2021). Asimismo, en un estudio preliminar en sistemas acuáticos pampeanos (lagunas y ríos), se pudieron aislar e identificar distintas cepas DEC (STEC-*stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub>, STEC-*stx*<sub>2</sub>, EAEC, EPEC, híbrido EAEC-ETEC) mediante PCR múltiple (Nuozzi et al., 2023). Esto genera una gran preocupación en cuanto al estado ambiental y sanitario de estos sistemas. Si bien se cuenta con información de base, no se conoce el tiempo de supervivencia y si las bacterias pueden reproducirse o no en estos ambientes en particular. Aunque no existen antecedentes sobre la supervivencia de *E. coli* en lagunas pampeanas, este trabajo de tesis es el primero en abordar su estudio en el agua de la Laguna El Carpincho, localizada en el partido de Junín (provincia de Buenos Aires, Argentina).

## 2. HIPÓTESIS

En las lagunas pampeanas, las cepas de *Escherichia coli* son capaces de sobrevivir y prosperar debido a la abundancia de nutrientes y materia orgánica. Además, las cepas de *Escherichia coli* patógenas y no patógenas sobreviven de diferente manera en este entorno dependiendo de su genotipo.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

Evaluar la supervivencia y potencial proliferación de *Escherichia coli* en aguas naturales provenientes de una laguna pampeana utilizada con fines recreativos (deportes acuáticos).

### 3.2. Objetivos específicos

- Realizar la caracterización genética de cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas previamente aisladas de sistemas acuáticos superficiales pampeanos utilizados con fines recreativos.
- Evaluar y comparar la supervivencia de cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas en el agua de una laguna pampeana utilizada con fines recreativos, mediante ensayos controlados en microcosmos.
- Evaluar y comparar la proliferación o reducción de la abundancia de cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas en el agua de una laguna pampeana utilizada con fines recreativos, mediante ensayos controlados en microcosmos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

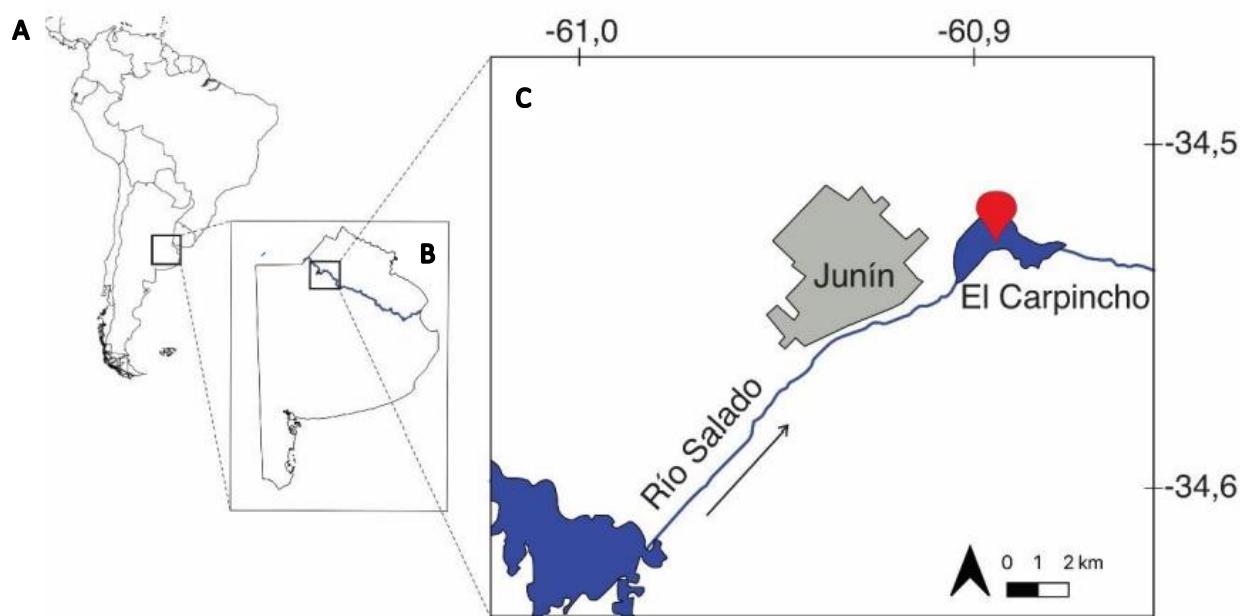
### 4.1. Área de estudio

La cuenca del río Salado es considerada el segundo humedal sudamericano con mayor acumulación de precipitaciones, mostrando además marcadas diferencias en cuanto al uso de suelo que presenta: la cuenca superior se encuentra mayormente caracterizada por el uso agrícola y la cuenca inferior por la ganadería y las pasturas (Gabellone et al., 2005; Sánchez et al., 2021; Sagua et al., 2023).

Dentro de la cuenca del río Salado, la laguna El Carpincho ( $34,57^{\circ}\text{S}$ ;  $60,89^{\circ}\text{O}$ ) se encuentra ubicada a 4 km de la ciudad de Junín, en la provincia de Buenos Aires (**Figuras 4 y 5**). Esta laguna es un cuerpo de agua turbio fitoplanctónico y rico en nutrientes, con una superficie de 440 hectáreas y una profundidad media de 1,4 metros (Bianchelli, 2021). Además, es un sistema polimictico y presenta una gran homogeneidad dentro la columna de agua para la mayoría de los parámetros físicos y químicos (Rennella & Quirós, 2006). Asimismo, se encuentra interconectada con las lagunas de Gómez (aguas arriba) y Rocha (aguas abajo) por el río Salado, el cual actúa como principal afluente y efluente de las mismas, conformando embalses naturales sobre el cauce principal del río (Quiroga, 2020).

Con el objetivo de regular su balance hídrico y evitar inundaciones, desde el año 2005 se han construido vertederos con compuertas en el marco del plan Maestro del río Salado (Renella, 2007; INA, 2012), lo que ha modificado los sistemas acuáticos asociados al río, entre ellos, la laguna El Carpincho (Gabellone et al., 2005; Seoane Rocha, 2018). El balance hídrico de estos sistemas depende principalmente del aporte del río, los canales artificiales y de los ingresos de agua subterránea (Miretzky, 2001).

El estudio de esta laguna es de alta relevancia debido a que representa un importante recurso económico y recreativo en la zona, siendo la pesca la actividad más practicada. Además, debido a que se encuentra localizada en las proximidades de un área urbana, se ve fuertemente afectada por la descarga de desechos urbano-industriales y por las descargas pluviales provenientes de la ciudad (Rennella & Quirós, 2002, 2006).



**Figura 4.** A. Ubicación del área de estudio en el mapa de Sudamérica. B. Ubicación de la laguna de estudio dentro de la cuenca de río Salado en la Provincia de Buenos Aires. C. Laguna de estudio El Carpincho. Adaptado de Bianchelli (2021).



**Figura 5.** Fotografía del área de estudio: muelle o espigón de la laguna El Carpincho.

#### 4.2. Obtención de muestras y medición de variables ambientales

Para este trabajo se tomaron muestras de agua superficial (30 – 40 cm de profundidad) en el mes de noviembre del 2023, en el muelle de la laguna El Carpincho (**Figura 5**) para la realización de los ensayos en

microcosmos. Cabe aclarar que el año de muestreo se caracterizó por una disminución hídrica producto de las escasas precipitaciones.

En la campaña de muestreo se registraron diversas variables ambientales *in situ*: conductividad eléctrica, pH, temperatura (HANNA HI991301 portable pH/conductivity/TDS/temperature meter), oxígeno disuelto (OD) (multisensor HACH HQ30d), turbidez nefelométrica (Lutron TU-2016 Turbidimeter), nivel hídrico mediante una varilla graduada y transparencia del agua mediante el disco de Secchi. Para la determinación de nutrientes totales, las muestras fueron digeridas con un reactivo oxidante de persulfato de potasio (Valderrama, 1981). Las determinaciones de fósforo total (PT) se realizaron mediante el método del ácido ascórbico (APHA, 2005), mientras que las de nitrógeno orgánico total (NTK) mediante el método semi-micro Kjeldahl (APHA, 1992). Para el análisis de nutrientes disueltos, se filtraron 50 ml de agua de laguna mediante filtros de microfibra de vidrio de 0,7 µm (Whatman GF/F) utilizando soportes de filtro (Sartorius) conectados a una bomba de vacío. Luego, se obtuvieron las concentraciones de fósforo reactivo soluble (PRS) y Nitrógeno amoniacal siguiendo los lineamientos detallados en las técnicas APHA (2005). A su vez, la materia orgánica cromofórica disuelta se determinó por espectrofotometría (Torremorell et al., 2014).

La concentración de sólidos en suspensión o seston (SS) se obtuvo a partir del filtrado de volúmenes conocidos de agua a través de filtros Whatman GF/F previamente muflados y pesados. Estos filtros se dejaron secar en la estufa (103-105°C) hasta peso constante (APHA, 1992). Luego, se obtuvo el peso final del filtro y se le restó el peso inicial, para finalmente dividirlo por el volumen filtrado. Para estimar el peso seco libre de cenizas (PSLC) o materia orgánica los filtros con el material seco retenido fueron calcinados a 500°C por 3hs. Luego de la calcinación, fueron pesados nuevamente y por diferencia se estimó el PSLC, también dividido por el volumen filtrado.

La concentración de clorofila (Chl-a) se estimó mediante espectrofotometría antes y después de la acidificación con HCl (1N), utilizando etanol absoluto caliente (60-70°C) como solvente de extracción (Marker et al., 1980).

El estado trófico de la laguna se calculó utilizando el Índice de Estado Trófico (TSI), teniendo en cuenta las concentraciones de Chl-a, PT, y Secchi (Adamovich et al., 2016). Las fórmulas utilizadas para su cálculo fueron las siguientes:

$$TSI = 9,18 \times \ln Chl - a \left( \frac{\mu g}{l} \right) + 30,60$$

$$TSI = 14,43 \times \ln PT \left( \frac{\mu g}{l} \right) + 4,15$$

$$TSI = -14,39 \times \ln Secchi (m) + 59,91$$

Una vez que se calcularon los tres índices de TSI, se procedió a realizar un promedio de estos valores, permitiendo clasificar el estado trófico de la laguna, utilizando una escala de 0 a 100: Un valor promedio entre

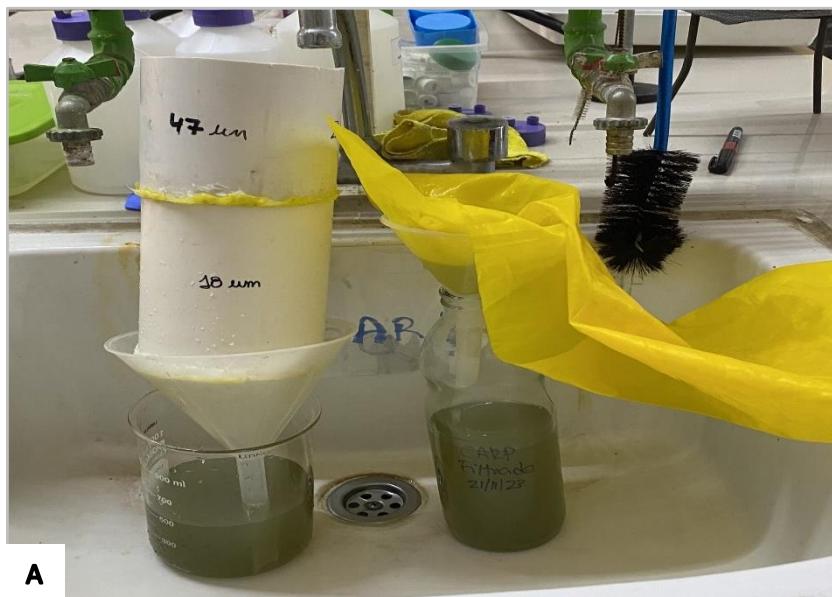
30 y 50 determina condiciones meso-eutróficas. Un valor promedio entre 50 y 60 define condiciones eutróficas y un valor promedio por encima de 70 determina condiciones hipereutróficas (Adamovich et al., 2016).

Para la obtención de la abundancia de *E. coli* en la laguna El Carpincho, se recolectaron 250 ml de muestra en frascos estériles, y se transportaron en oscuridad y frío hasta el laboratorio. Esta muestra se procesó dentro de las 24 hs para la determinación de coliformes totales y *E. coli* en placas Petrifilm 24 hs<sup>TM</sup> a 35°C ± 1°C en estufa. El valor obtenido de *E. coli* se comparó con los niveles guía adoptados por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (SRHN, 2003).

#### 4.3. Acondicionamiento del agua recolectada

Las muestras de agua recolectadas para los ensayos en microcosmos se filtraron secuencialmente mediante una red de 47 µm para remover el zooplancton y luego por una red de 18 µm de poro para remover el microplancton (**Figura 6A**). Posteriormente, el agua filtrada se autoclavó a 121°C durante 15 minutos para eliminar los microorganismos provenientes de la muestra (**Figura 6B**). Luego de este proceso, se corroboró la ausencia de bacterias mediante siembra en placa Petrifilm 24 hs<sup>TM</sup>.

Además, se determinó la concentración de nutrientes totales (NTK, PT) y disueltos (PRS, Nitrógeno amoniacial) en el agua autoclavada, como se detalló anteriormente.





**Figura 6.** A. Sistema de filtración del agua recolectada mediante redes de 47 µm y 18 µm. B. Botellas con agua de laguna filtrada y autoclavada.

#### 4.4. Cultivo de cepas previamente aisladas y secuenciadas

Las cepas de *E. coli* previamente aisladas de los sistemas acuáticos pampeanos estudiados en el marco del proyecto SIB 2019-575 (UNNOBA) fueron conservadas a -20°C en caldo indol + glicerol. Estas cepas fueron caracterizadas mediante PCR múltiples, pruebas bioquímicas y pruebas de aglutinación (serotipificación). Además, las cepas patógenas (diarreigénicas) identificadas fueron enviadas para la secuenciación completa de su genoma (enfoque *shotgun*) al servicio de secuenciación del Instituto Dr. Carlos G. Malbrán, sin embargo, la cepa no patógena aún no fue secuenciada. Antes de la secuenciación, las cepas patógenas se incubaron *overnight* en agar de tripticasa de soja (BD-Difco™, Le Pont de Claix, Francia). Posteriormente, la extracción de ADN genómico se realizó utilizando el equipo robótico QiaCUBE y reactivos y kits QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Group). La cuantificación del ADN extraído se realizó utilizando el fluorómetro Qubit® (Invitrogen, Eugene, OR, EE. UU.), siguiendo el protocolo del fabricante. Las bibliotecas se prepararon utilizando el kit de preparación de bibliotecas de ADN Nextera-XT (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) y se secuenciaron como lecturas pareadas (150 pb + 150 pb) en el equipo Illumina MiSeq (Illumina 1.9, San Diego, CA, EEUU). La calidad de las lecturas sin procesar se evaluó con FastQC v0.11.5. Para la identificación de las bacterias se utilizó el software Kraken. En cuanto a los factores de virulencia, estos pudieron identificarse mediante el uso de ARIBA software (Ariba v2.14.4) utilizando la base de datos de virulence Finder. Por otro lado, los perfiles de genes de resistencia se establecieron utilizando el ARIBA software (Ariba v2.14.4) utilizando la base de datos de Res\_Finder. Para la serotipificación se utilizó SRTS2 con la base de datos EcOH. El secueciotipo se

calculó mediante MLST 2.0 (tipificación de secuencia multilocus de bacterias secuenciadas del genoma total). Finalmente, el análisis fue realizado utilizando el pipeline instalado en el servidor del Instituto Malbrán según el protocolo mencionado que sigue los lineamientos de la Red PulseNet América Latina y el Caribe (Nadon et al., 2017).

Para la realización del ensayo se seleccionó una cepa patógena (P) y otra no patógena (NP) para ser crecidas de forma independiente en caldo nutritivo Luria-Bertani (LB) a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Cepas de *E. coli* seleccionadas para el estudio.

Cepa	Patogenicidad
<i>Escherichia coli</i> sin genes de virulencia	No Patógena
STEC O103:H2 <i>eae-ε/ehA/stx<sub>1a</sub>/stx<sub>2a</sub></i>	Patógena

#### 4.4.1. Concentración inicial de cepas

Inicialmente, se midió la densidad óptica (DO<sub>600</sub>) para obtener una estimación de la concentración de bacterias en cada cepa, siguiendo el método descrito por Gravel et al. (2017), donde una densidad óptica DO<sub>600</sub> de 0,5 se correlaciona con  $10^8$  UFC/ml.

Para determinar la concentración inicial de las cepas, se tomó en cuenta la densidad óptica DO<sub>600</sub> obtenida y se llevaron a cabo las diluciones seriadas en base 1/100. Posteriormente, se sembraron en placas Petrifilm 24 hs™ y se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en estufa durante 24 horas. A partir del resultado, se realizaron los cálculos correspondientes para inocular los microcosmos de los experimentos a razón de  $10^2$  - $10^3$  UFC/ml (concentración final en cada microcosmo) (Polifroni et al., 2014; Suzuki et al., 2019), en función de los niveles reportados previamente en la laguna El Carpincho (rango *E. coli*: 0 - 460 UFC/ml, febrero 2016-octubre 2021) (Quiroga, 2020; Nuozzi et al., 2021).

#### 4.5. Experimentos en microcosmos

Se realizaron experimentos con inóculos de la cepa de *E. coli* NP y la P con 3 réplicas cada uno a distintos intervalos de tiempo (0, 1, 2, 5, 8, 13, 20, 26, 30, 42, 68, 84, 103 y 133 días) durante 133 días (Polifroni et al., 2014; Saima et al., 2021), dependiendo de la supervivencia de cada cepa. A su vez, estos inóculos se mantuvieron en agitación suave, oscuridad, intercambio de oxígeno con la atmósfera y temperatura controlada ( $25\pm2^{\circ}\text{C}$ ). Se realizaron los siguientes tratamientos:

**Tratamientos (NP: *E. coli* no patógena y P: *E. coli* patógena):**

H<sub>2</sub>O de laguna filtrada y autoclavada sin inóculo (control negativo)

H<sub>2</sub>O de laguna filtrada y autoclavada con inóculo NP

H<sub>2</sub>O de laguna filtrada y autoclavada con inóculo P

Medio LB autoclavado sin inóculo (control negativo de crecimiento/procedimiento)

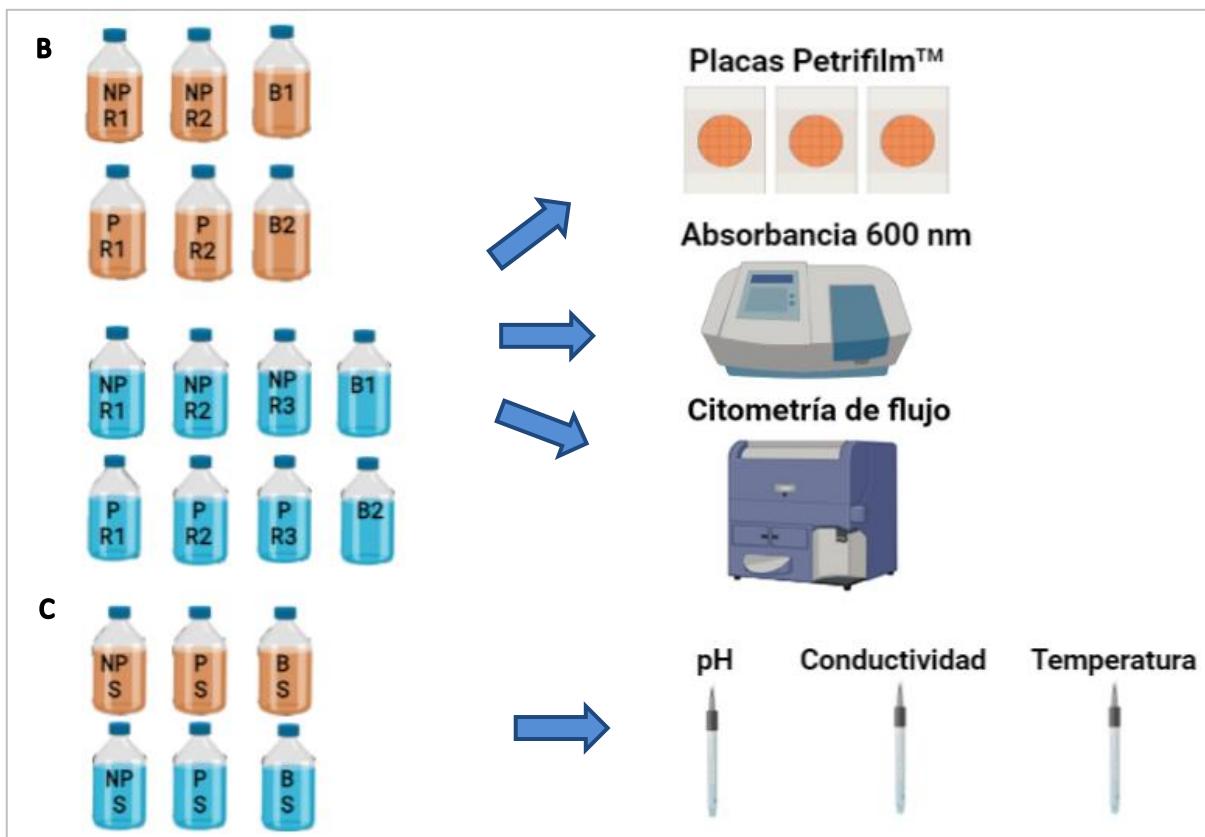
Medio LB autoclavado con inóculo NP (control positivo de crecimiento)

Medio LB autoclavado con inóculo P (control positivo de crecimiento)

Cada microcosmo (capacidad 500 ml) se completó con 400 ml de agua filtrada y autoclavada o con medio LB. Los microcosmos se mantuvieron en un agitador orbital durante la duración del ensayo (**Figura 7A**). La viabilidad y abundancia de *E. coli* en cada réplica y tiempo analizado se determinó mediante siembra en placa Petrifilm 24 hs<sup>TM</sup> y la estimación del crecimiento celular mediante densidad óptica DO<sub>600</sub> (absorbancia a 600 nm). Asimismo, se determinó el porcentaje de células vivas y muertas mediante citometría de flujo (**Figura 7B**).

También, en cada uno de los tratamientos se midieron las siguientes variables físico-químicas: pH, conductividad y temperatura (HANNA HI991301 portable pH/conductivity/TDS/temperature meter) (**Figura 7C**). Asimismo, se evaluó la concentración de nutrientes al inicio y final de los ensayos, tanto en el agua entera de la laguna (sin filtrar ni autoclavar) como en el agua filtrada y autoclavada, siguiendo las técnicas detalladas anteriormente.





**Figura 7.** Flujo de trabajo del ensayo. **A.** Fotografía de los microcosmos del experimento sobre el agitador orbital. **B.** La abundancia y viabilidad de *E. coli* se determinó mediante placas Petrifilm™, absorbancia (600 nm) y citometría de flujo. **C.** Se midieron variables físico-químicas como el pH, conductividad y temperatura en cada tratamiento. **NP:** No patógena. **P:** Patógena. **B:** Blanco. **R:** Réplica. **S:** Sensores.

#### 4.5.1. Placas de cultivo

Se utilizaron placas Petrifilm™ de recuento rápido de 24 horas (REC) para la cuantificación de *E. coli* y coliformes totales. Estas placas presentan un sistema selectivo y diferencial de medio preparado, diseñado para facilitar el análisis microbiológico, e incluyen gradillas que optimizan el proceso de recuento.

Se realizaron diluciones decimales consecutivas de las muestras en agua peptonada y se dispensó 1 ml de cada una en el centro de la placa. Posteriormente, las placas se incubaron a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  en estufa durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se contaron las colonias mediante lupa binocular estereoscópica (ARCANO®).

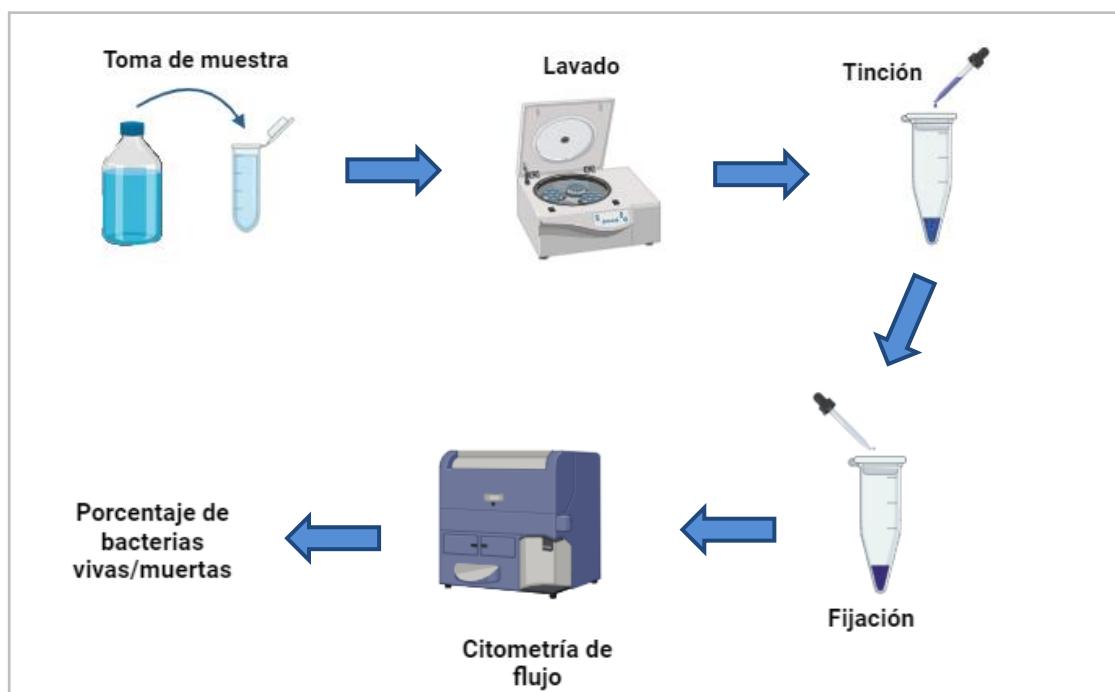
El rango de recuento de *E. coli* en la placa es de 0 a 100 colonias azules o azul-verdosas. En aquellos casos en los que se excedió este número de colonias, se procedió a contar las colonias en uno o más recuadros representativos y se calculó el promedio, según indicaciones del fabricante. Finalmente, el promedio obtenido se multiplicó por 30, que corresponde al área de crecimiento circular de la placa, para obtener el recuento estimado.

#### 4.5.2. Medición de la densidad óptica

Se tomaron 3 ml de cada muestra y se colocaron en cubetas de vidrio para medir la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro dual UV/Visible SP-2000UV (Spectrum). Como blanco se utilizó agua de laguna filtrada y autoclavada, así como medio LB estéril, de acuerdo al medio que se estaba evaluando.

#### 4.5.3. Viabilidad de las cepas mediante citometría de flujo

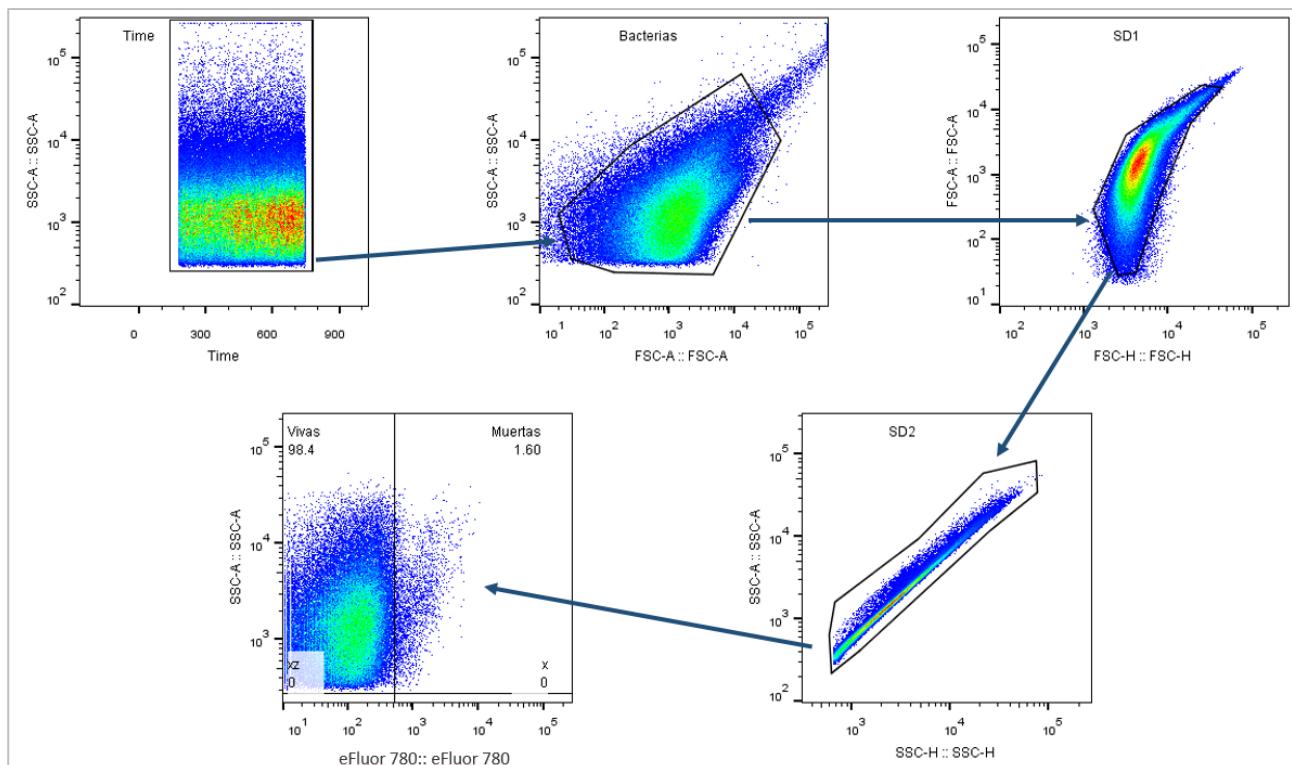
El estrés ambiental puede hacer que muchas bacterias entéricas resulten viables, pero no cultivables. Aunque permanecen metabólicamente activas son incapaces de multiplicarse y formar colonias en los medios regularmente utilizados en los laboratorios (Bergstein-Ben Dan et al., 1997; Polifroni et al., 2009; Rozen & Belkin, 2001). En este sentido, se estimó el porcentaje de bacterias vivas/muertas mediante citometría de flujo como complemento. Para ello, se tomaron 3 ml de los microcosmos y se centrifugaron a 10,000 g durante 5 min. El pellet se lavó con PBS 1X a 10,000 g durante 5 min y se resuspendió en 12,5 µl de una dilución 1/100 del colorante de viabilidad/muerte celular Fixable Viability Dye eFluorTM 780 (eBioscience™) durante 15 minutos en frío y oscuridad. Se realizó un nuevo lavado con PBS 1X a 10,000 g durante 5 min y se fijaron con PFA 1% hasta su análisis, para el cual se utilizó el citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD) del CITNOBA (UNNOBA-UNSAdA-CONICET) (**Figura 8**). Los controles experimentales incluyeron bacterias sin dye de viabilidad resuspendidas en PBS 1X (control sin marca) y bacterias incubadas en termobloque a 95°C, teñidas con dye de viabilidad y resuspendidas en PBS 1X (control de muerte).



**Figura 8.** Flujo de trabajo para la detección de viabilidad por citometría de flujo. Se tomaron muestras de los microcosmos y se centrifugaron. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se tiñó con el colorante de

viabilidad/muerte celular Fixable Viability Dye eFluor™ 780. Posteriormente, las muestras se fijaron con PFA 1% y se analizaron en un citómetro FACSCanto™ II.

Se evaluó el porcentaje de bacterias viables (eFluorTM 780 negativas). Todos los análisis se realizaron en el software FlowJo™ v10 (BD Life Sciences). La **Figura 9** muestra la estrategia de *gating* empleada para la selección de las poblaciones de interés.



**Figura 9.** Estrategia de gating en citometría de flujo para la detección de viabilidad celular. Diagrama que muestra los diferentes pasos para seleccionar y analizar subpoblaciones de bacterias vivas y muertas. El análisis incluye la exclusión de los artefactos (burbujas de aire y aglomeraciones celulares) en función del tiempo, la identificación de la población bacteriana por tamaño y complejidad mediante Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC), seguida de la eliminación de dobletes (SD1 y SD2) y la discriminación entre células vivas (eFluor™ 780 -) y muertas (eFluor™ 780 +) basándose en la intensidad de fluorescencia del Fixable Viability Dye eFluor™ 780.

#### 4.6. Análisis estadístico

Se construyeron las curvas de crecimiento/decrecimiento de cada tratamiento mediante los recuentos de las colonias de *E. coli* obtenidos en diluciones decimales consecutivas versus el tiempo (Polifroni et al., 2014) utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, EE. UU.). Para evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos en el tiempo (dinámica), se realizó la prueba no paramétrica de Friedman (Q) para

muestras no independientes y comparaciones post hoc con valores p corregidos por Bonferroni (Conover, 1999) con el programa IBM SPSS v.22 (Statistical Product and Service Solutions, Armonk, New York), ya que la transformación de los datos no permitió cumplir los supuestos del análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA MR). Además, se realizaron correlaciones pareadas de Spearman entre el recuento de *E. coli*, las variables medidas (pH, conductividad y absorbancia) y el recuento de células mediante citometría de flujo en cada uno de los tratamientos. Estas correlaciones se graficaron en *correlation plots* (Wei et al., 2021), utilizando el programa R v4.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, 2023).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Descripción de parámetros ambientales en el agua de laguna al inicio y finalización del ensayo

En la **Tabla 2** se muestran los resultados de las variables ambientales correspondientes a la laguna estudiada. Los valores de conductividad y nivel hídrico indican que la laguna se encuentra en un período de aguas bajas. Las concentraciones de nutrientes (PT, PRS, NTK) y de Chl-a obtenidas en esta laguna, confirman que se encuentra en un estado hipereutrófico ( $TSI > 70$ ) (**Tabla 3**).

Ademas, se determinó las concentraciones de nutrientes totales y disueltos medidos a partir de agua autoclavada de la laguna El Carpincho al inicio del ensayo (**Tabla 2**). La concentración de PT presento un valor constante tanto en muestra de agua entera como autoclavada y la concentración de PRS aumentó levemente en esta última. Sin embargo, el NTK mostró un valor levemente menor en la muestra de agua autoclavada en comparación con la muestra de agua entera.

**Tabla 2.** Parámetros físicos, químicos y biológicos medidos en la Laguna El Carpincho y en agua autoclavada de dicha laguna.

Variable	Valores medidos en la laguna El Carpincho	Valores medidos en el agua autoclavada de la laguna El Carpincho
Nivel Hídrico (m)	0,96	
Temperatura (°C)	20,5	
pH	9,55	
Oxígeno disuelto (mg/l)	6,18	
Conductividad (μS/cm)	6530	
Turbidez (NTU)	248	
Secchi (cm)	11	
SS (mg/l)	404	
PSLC (mg/l)	155	
Chl-a (μg/l)	408,24	
Concentración de <i>E. coli</i> (UFC/ml)	2	

CDOM $a_g$ 254 ( $\text{nm}^{-1}$ )	49,89	
PT (mg/l)	1,20	1,20
PRS (mg/l)	0,30	0,32
NTK (mg/l)	1,40	1,10

SS, sólidos en suspensión; PSLC, peso seco libre de cenizas; Chl-a, Clorofila-a; CDOM, Materia orgánica cromofórica disuelta; PT, fósforo total; PRS, Fosforo reactivo soluble; NT, Nitrógeno total Kjeldahl; NTU, unidad nefelométrica de turbidez

**Tabla 3.** Índice trófico y estado trófico de la Laguna El Carpincho.

Índice Trófico	Estado Trófico
94,64	Hipereutrófico

Como se describió en el apartado 4.5, también se midieron las concentraciones de nutrientes totales y disueltos en los microcosmos en agua de laguna al finalizar el experimento. Los valores obtenidos se detallan en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Nutrientes totales y disueltos de los ensayos de microcosmos en agua de laguna autoclavada de los microcosmos al finalizar el ensayo.

Nutriente	Blanco	Promedio NP	Promedio P
PT (mg/l)	1,60	1,60	1,60
PRS (mg/l)	0,40	0,44	0,36
NTK (mg/l)	1,40	2,10	2,33
N amoniacial (mg/l)	1,40	1,40	1,43

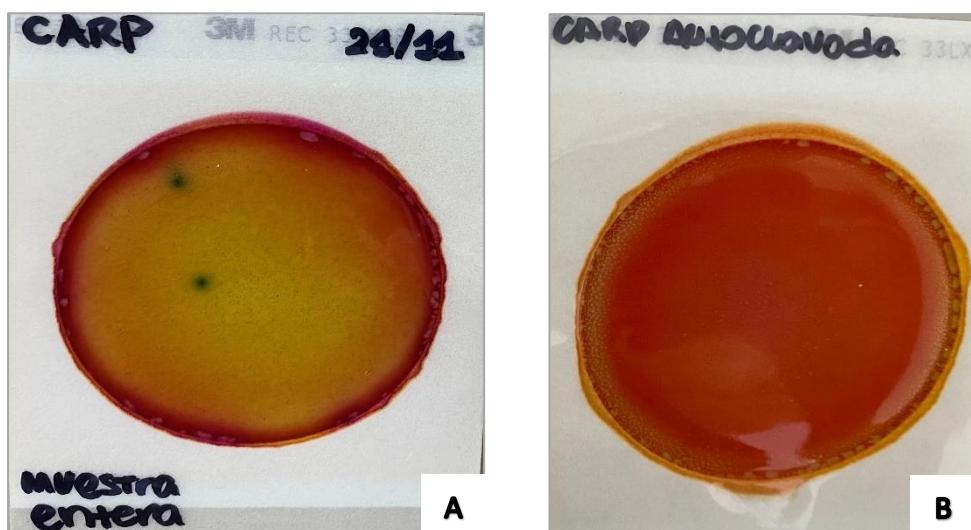
En cuanto al PT, las concentraciones entre ambas cepas y blanco fueron iguales, con un promedio de 1,60 mg/l en cada caso. No obstante, al comparar estos valores con los obtenidos al inicio del experimento (**Tabla 2**), se observó una concentración menor de 1,20 mg/l. Dentro del PT se encuentra el PRS, cuyas concentraciones mostraron leves diferencias entre el blanco y las dos cepas (en promedio se observaron 0,44 mg/l para NP y 0,36 mg/l para P). Comparando estos datos con los de la **Tabla 2**, donde se registró un valor de 0,32 mg/l, los valores al finalizar el experimento fueron mayores.

Para el NTK, las concentraciones obtenidas para las dos cepas (en promedio se observan 2,10 mg/l para NP y 2,33 mg/l para P) fueron superiores a las del blanco, que presentó un valor de 1,40 mg/l. Comparando con los datos iniciales de la **Tabla 2**, donde se registró un valor de 1,11 mg/l, los valores finales también fueron mayores.

En relación con el nitrógeno amoniacial, las concentraciones entre el blanco y las cepas fueron similares, con un promedio de 1,40 mg/l para el blanco y la cepa NP, y 1,43 mg/l para la cepa P.

## 5.2. Análisis microbiológico

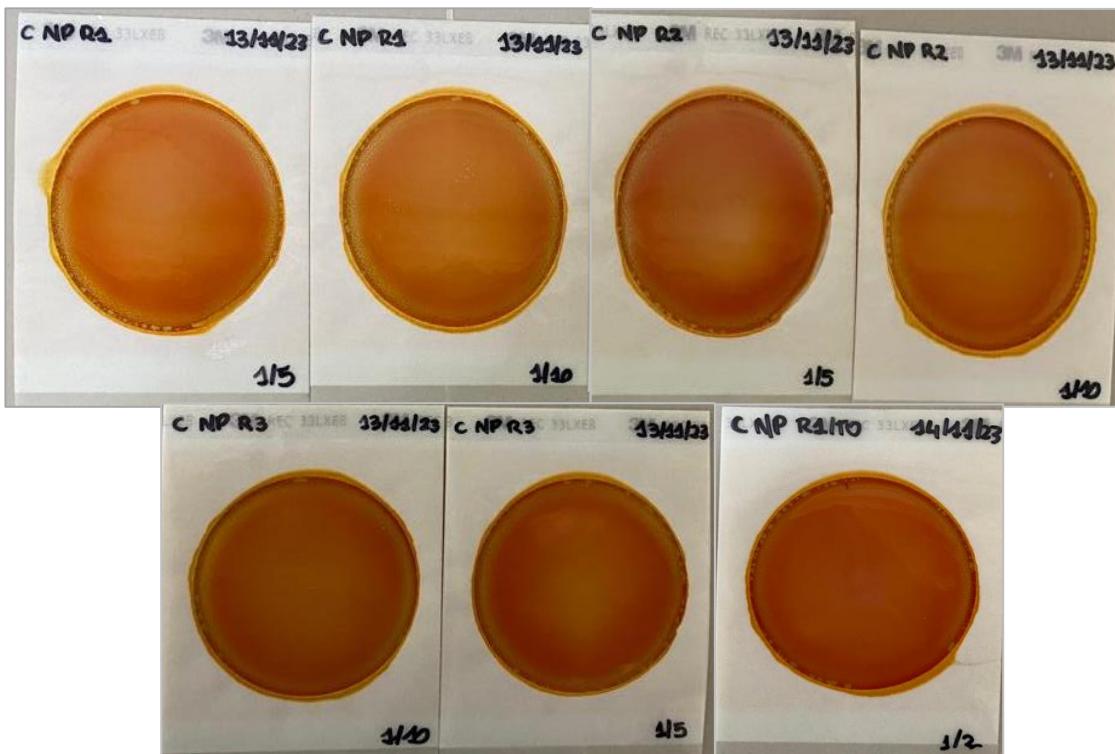
En la **Figura 10** se evalúa la presencia de *E. coli* tanto en la muestra del agua de laguna como en la muestra autoclavada utilizando placas Petrifilm 24 hs™.



**Figura 10.** A. Determinación de coliformes totales y *E. coli* en muestra natural mediante placas Petrifilm 24 hs™. B. Determinación de coliformes totales y *E. coli* en muestra de agua autoclavada mediante placas Petrifilm 24 hs™.

En la **Figura 10A** se observaron 2 UFC/ml de *E. coli* (200 UFC/100 ml). En contraste, en la **Figura 10B** no se distinguió ninguna colonia de *E. coli* ni de coliformes totales, lo cual confirmó la ausencia de estas bacterias en el agua de laguna autoclavada. Cabe destacar, que la abundancia de *E. coli* obtenida en la laguna El Carpincho en noviembre 2023 (200 UFC/100 ml) fue levemente inferior al nivel guía para uso altamente frecuente correspondiente a muestras aisladas (235 UFC/100 ml) y uso moderadamente frecuente para muestras aisladas (293 NMP/100 ml).

Por otra parte, se estudió por triplicado una cepa NP de *E. coli* ATCC25922 en el tratamiento de agua de laguna y se sembró a Tiempo 0. Esta cepa comercial pertenece a un aislamiento clínico y no posee genes de virulencia ni resistencia a antimicrobianos. En este tiempo (T0), no se observó formación de colonias de la cepa ATCC25922 (**Figura 11**) en las tres réplicas en agua de laguna, pero si se observó formación de colonias en el medio LB. Adicionalmente, las réplicas se sembraron sin realizar diluciones; sin embargo, tampoco se observó crecimiento de colonias en agua de laguna. En oposición a la cepa NP de *E. coli* previamente aislada del ambiente y utilizada en el experimento, que mostró desarrollo de colonias en agua de laguna (**Figura 13A**).



**Figura 11.** Determinación de *E. coli* ATCC25922 en tratamiento de agua de laguna mediante placas Petrifilm 24 hs™. 1/5: dilución 1:5, 1/10: dilución 1:10 y 1/2: dilución 1:2. Réplicas: R1, R2 y R3.

### 5.3. Análisis de secuenciación del genoma completo (SGC)

Mediante SGC de la cepa P seleccionada para realizar el ensayo, se confirmó su género y especie como *Escherichia coli*. Respecto a los factores de virulencia, se identificaron aquellos marcadores que se consideran básicos y fundamentales para la caracterización de la virulencia, lo que permitió su categorización, como se describe en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Perfiles de virulencia según criterio basal de clasificación.

Cepa	aaiC_1.match	aggR.match	eae.match	eae_5.match	eae_6.match	ehxA.match	ltaA.match	stx1-.match	stx2-.match
P	No	No	Si	No	No	Si	No	Si	Si

Se observa que los genes de la cepa STEC *eae/ehA/stx1/stx2* fueron correctamente identificados mediante SGC. Respecto a la serotipificación se realizó según lo establecido en materiales y métodos y los resultados se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Resultados de los serotipos y secuenciotipo de MLST, obtenidos mediante SGC. ST MLST, secuenciotipos obtenidos mediante MLST; fliC, flagelina; genes wzm & wzt, transportador de casete de unión

a ATP para la biosíntesis de O-polisacáridos; gen *wzx*, flipasa del antígeno O; gen *wzy*, Polimerasa de antígeno O.

Cepa	Serotipo	ST MLST	FliC	Wzm	Wzt	Wzx	Wzy
P	O103:H2	1967	fliC-H2_19	-	-	wzx-O103_114*	wzy-O103_313*?

El análisis mediante SGC se llevó a cabo utilizando los resultados obtenidos del análisis combinado de genes. Estos genes definen el antígeno O, el cual participa en el proceso de síntesis de los lipopolisacáridos (LPS), y el antígeno H, que codifica para la subunidad básica de la flagelina, la cual forma el flagelo. La tipificación serológica identificó a la cepa P como perteneciente al serotipo O103:H2. El análisis de MLST reveló que la cepa pertenece al secuenciotipo 1967 (ST-1967). La secuencia alélica del gen *fliC* codificó para la flagelina H2 variante 19. La secuencia alélica del gen *wzx* especificó para el serogrupo O103 variante 114 (el asterisco indica una posible mutación) y la secuencia alélica del gen *wzy* especificó para el serogrupo O103 variante 313 (el asterisco indica una posible mutación), sin embargo, el signo de interrogación sugirió que fue reconocida parcialmente por el software utilizado. Por último, no se detectaron secuencias para los genes *wzm* y *wzt* involucrados en el transporte del O-polisacárido. Los serotipos detectados mediante SGC se corresponden con los detectados mediante los procedimientos de serotipificación convencional reportado por Nuozzi et al. (*submitted*).

En la **Tabla 7** se muestran los resultados del análisis de los genes asociados a la resistencia a los antimicrobianos (RAM).

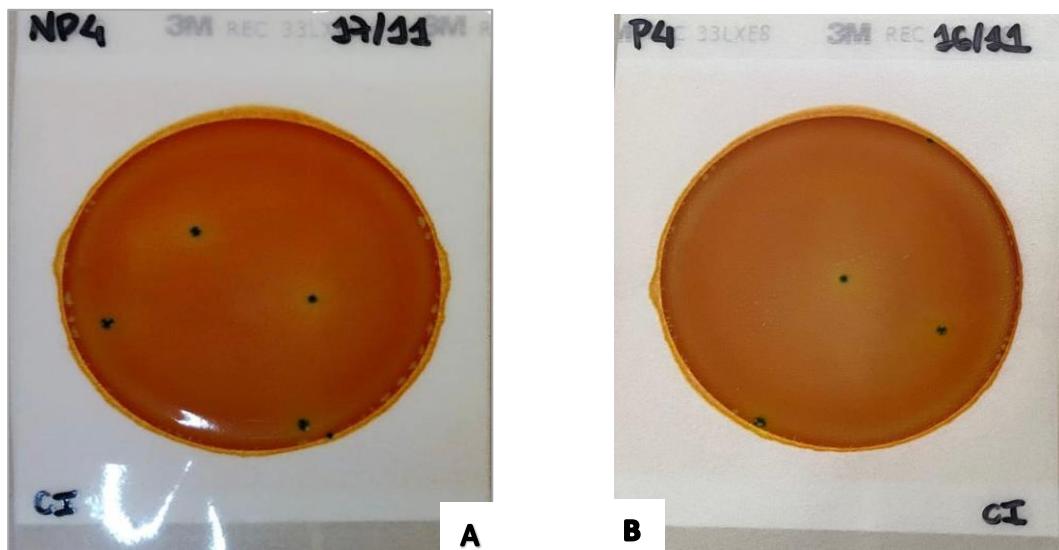
**Tabla 7.** Perfiles de resistencia a los antimicrobianos mediante el análisis de los genes detectados a través de SGC.

Cepa	Cepa caracterizada	Genes RAM	Asociación a RAM	RAM
P	O103:H2 <i>eae</i> <i>E/ehA/stx<sub>1a</sub>/stx<sub>2a</sub></i>	glpT_E448K	Fosfomicina	Sensible
		pmrB_Y358N	Colistina	

La cepa posee genes asociados con resistencia a la fosfomicina (glpT\_E448K) y colistina (pmrB\_Y358N), pero se considera sensible a los dos antimicrobianos.

#### 5.4. Concentración inicial

En las figuras se presentan las concentraciones iniciales de ambas cepas utilizando placas Petrifilm 24 hs<sup>TM</sup>. Estas concentraciones iniciales se utilizaron como stocks para sembrar cada uno de los microcosmos del estudio. Tanto las cepas P como las NP mostraron una concentración inicial de  $5 \times 10^8$  UFC/ml en los stocks.



**Figura 12.** A. Concentración de cepa no patógena (NP) con una dilución 1/10<sup>8</sup> mediante placas Petrifilm 24 hs™. B. Concentración de cepa patógena (P) con una dilución 1/10<sup>8</sup> mediante placas Petrifilm 24 hs™.

### 5.5. Supervivencia de las cepas NP y P en los ensayos de microcosmos

A partir de los datos obtenidos en los ensayos realizados, se calcularon los promedios entre réplicas para trazar una curva de crecimiento que compara ambas cepas (**Figura 13A y 14A**). Por otra parte, las réplicas de las cepas NP y P fueron representadas mediante el recuento de colonias (UFC/ml) indicando su significancia estadística ( $p < 0,05$ ) (**Figuras 13 B, C y 14 B, C**). Se observó que las cepas en agua de laguna y en medio LB, no exhibieron un patrón uniforme de crecimiento, ni tampoco un tiempo de supervivencia equivalente en los ensayos de microcosmos (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Supervivencia de cepas no patógenas (NP) y patógena (P) en ensayos de microcosmos

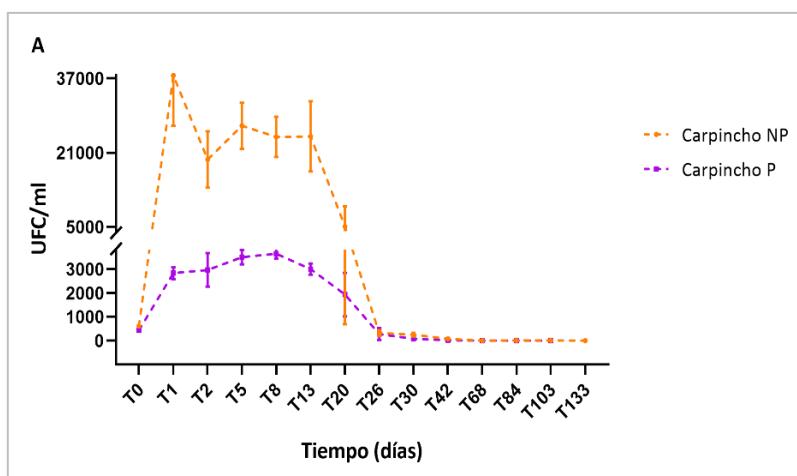
Tratamiento	Cepa	Réplica	Tiempo de sobrevida (días)	Promedio del tiempo de sobrevida (días)	Recuento máximo (UFC/ml)
<b>H<sub>2</sub>O de laguna filtrada y autoclavada</b>	NP	R1	84	117	4,22 x10 <sup>4</sup>
		R2	133		5,37x10 <sup>4</sup>
		R3	133		1,74x10 <sup>4</sup>
	P	R1	30	52	3,85x10 <sup>3</sup>
		R2	42		3,85x10 <sup>3</sup>
		R3	84		4,30x10 <sup>3</sup>
	NP	R1	103	94	1,10x10 <sup>11</sup>

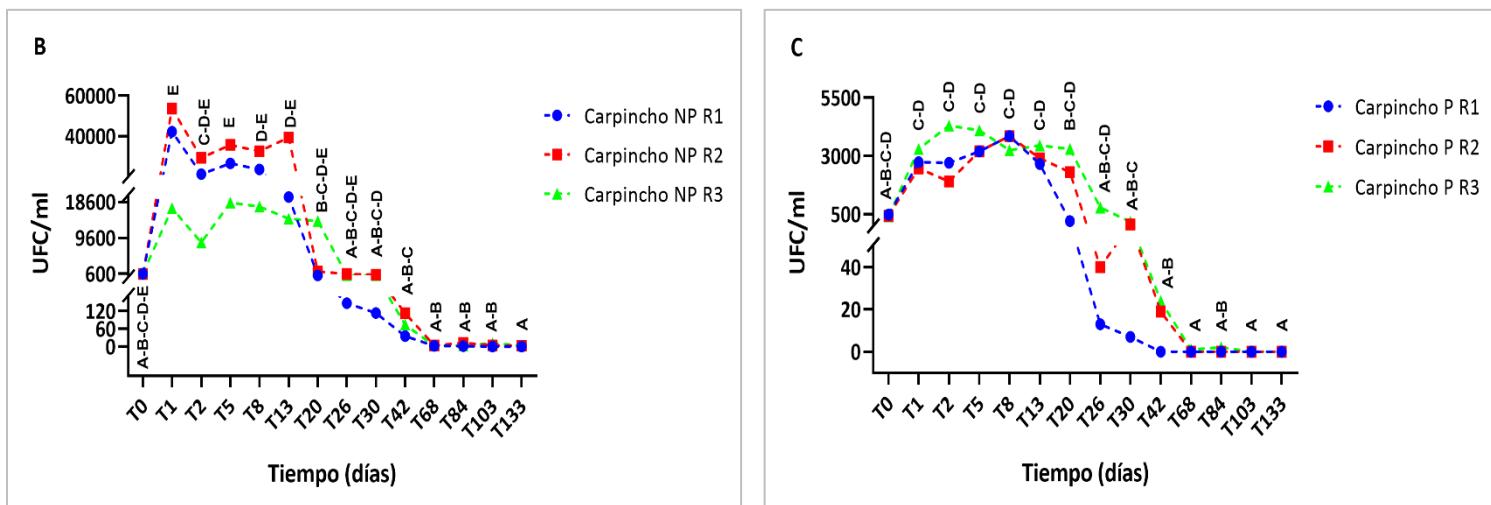
Medio LB autoclavado		R2	84		$5,68 \times 10^{10}$
	P	R1	103	94	$1,92 \times 10^{10}$
		R2	84		$1,61 \times 10^{10}$

### 5.5.1. Supervivencia de las cepas NP y P en agua de laguna

En general, se observó que la cepa NP tuvo una mayor supervivencia en comparación con la cepa P y que ambas cepas no solo sobrevivieron en el agua de la laguna, sino que también se multiplicaron, superando la concentración inicial sembrada. Por un lado, la cepa NP alcanzó un tiempo de supervivencia mínimo de 84 días y máximo de 133 (**Tabla 8**), teniendo un recuento promedio de  $3,76 \times 10^4$  UFC/ml en el T1 (**Figura 13A**). Por otro lado, la cepa P sobrevivió entre 30 y 84 días (**Tabla 8**), alcanzando un recuento promedio de  $3,65 \times 10^3$  UFC/ml en el T8 (**Figura 13A**). Además, se observó que la cepa NP presentó mayores abundancias, y en algunos tiempos abundancias similares, a lo largo del ensayo que la cepa P (**Figura 13A**).

A su vez, las réplicas de cada una de las cepas no se comportaron de igual manera (**Figuras 13 B y C, Tabla 8**). En la cepa NP, las réplicas R1 y R2 tuvieron un recuento máximo en el T1 siendo  $4,22 \times 10^4$  UFC/ml y  $5,37 \times 10^4$  UFC/ml, respectivamente. Sin embargo, la R3 tuvo su recuento máximo en el T5 con  $1,74 \times 10^4$  UFC/ml. En cuanto a la supervivencia de las mismas, las réplicas R2 y R3 sobrevivieron hasta 133 días mientras que la réplica R1 sobrevivió 84 días. Asimismo, se observaron diferencias significativas en los recuentos entre tiempos, T1 y T5 con T30, T42, T68, T84, T103 y T133; T2 con T68, T84, T103 y 133; T8 y T13 con T42, T68, T84, T103 y T133; y T20 con T133. Por otro lado, en la cepa P, las réplicas R1 y R2 tuvieron un recuento máximo de  $3,85 \times 10^3$  UFC/ml en T8, mientras que la réplica R3 tuvo un recuento máximo de  $4,30 \times 10^3$  UFC/ml en T2. En cuanto a la supervivencia, la réplica R1 sobrevivió 30 días, la R2 sobrevivió 42 días, y la réplica R3 sobrevivió 84 días. Asimismo, se observaron diferencias significativas en T1, T2, T5, T8 y T13 con T42, T68, T84, T103 y T133; y T20 con T68, T103 y T133.



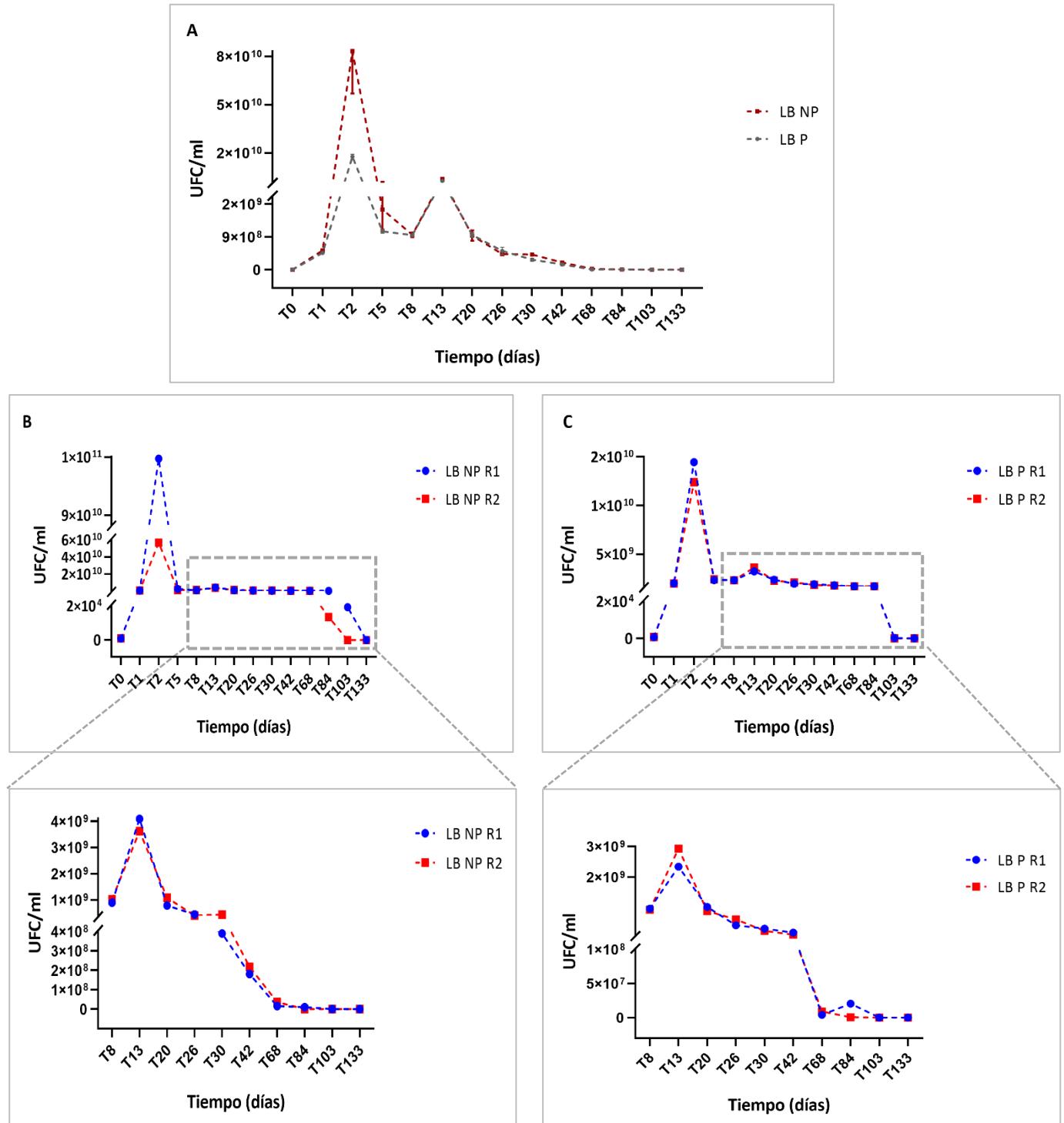


**Figura 13.** Curvas de crecimiento de las cepas Patógenas (P) y No Patógenas (NP) en los microcosmos con agua de Laguna El Carpincho. **A.** Abundancia promedio de las cepas NP y P junto con su desviación estándar ( $N = 3$ ). **B.** Abundancia de cada una de las réplicas de la cepa NP. **C.** Abundancia de cada una de las réplicas de la cepa P. La significancia estadística ( $p < 0,05$ ) se representa mediante letras (A, B, C, D, E), donde los tiempos que tienen letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p < 0,05$ ). La concentración inicial en T0 de la cepa NP fue 610 UFC/ml y la cepa P fue 433 UFC/ml.

#### 5.5.2. Supervivencia de las cepas NP y P en medio LB

En términos generales, se destaca que las cepas NP y P sobrevivieron entre 84 y 103 días (Figura 14, Tabla 8). La cepa NP experimentó un aumento en el número de colonias en comparación con la cepa P, donde alcanzó un recuento máximo promedio de  $8,34 \times 10^{10}$  UFC/ml, mientras que la cepa P no superó las  $2,00 \times 10^{10}$  UFC/ml (Figura 14A, Tabla 8).

Además, se observó que las réplicas de cada cepa mostraron un comportamiento similar durante el ensayo (Figuras 14 B y C, Tabla 7), con la excepción de la cepa NP, donde la réplica R1 alcanzó un recuento máximo de  $1,10 \times 10^{11}$  UFC/ml, mientras que la réplica R2 no superó las  $6,00 \times 10^{10}$  UFC/ml.



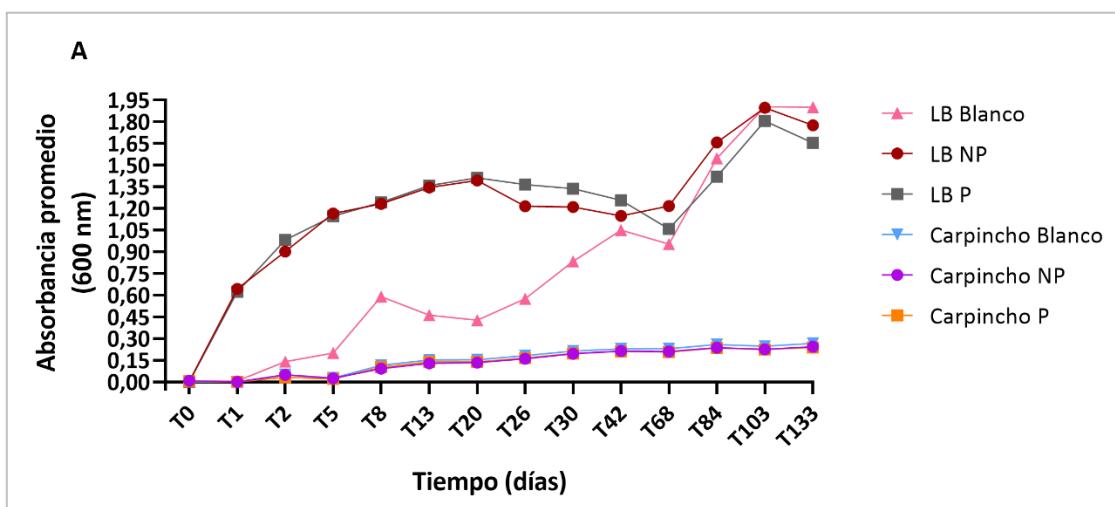
**Figura 14.** Curvas de crecimiento de las cepas Patógenas (P) y No Patógenas (NP) en los microcosmos con medio LB. **A.** Abundancia promedio de las cepas NP y P ( $N = 2$ ). **B.** Abundancia de cada una de las réplicas de la cepa NP. **C.** Abundancia de cada una de las réplicas de la cepa P. La concentración inicial en T0 de la cepa NP fue 885 UFC/ml y la cepa P fue 710 UFC/ml.

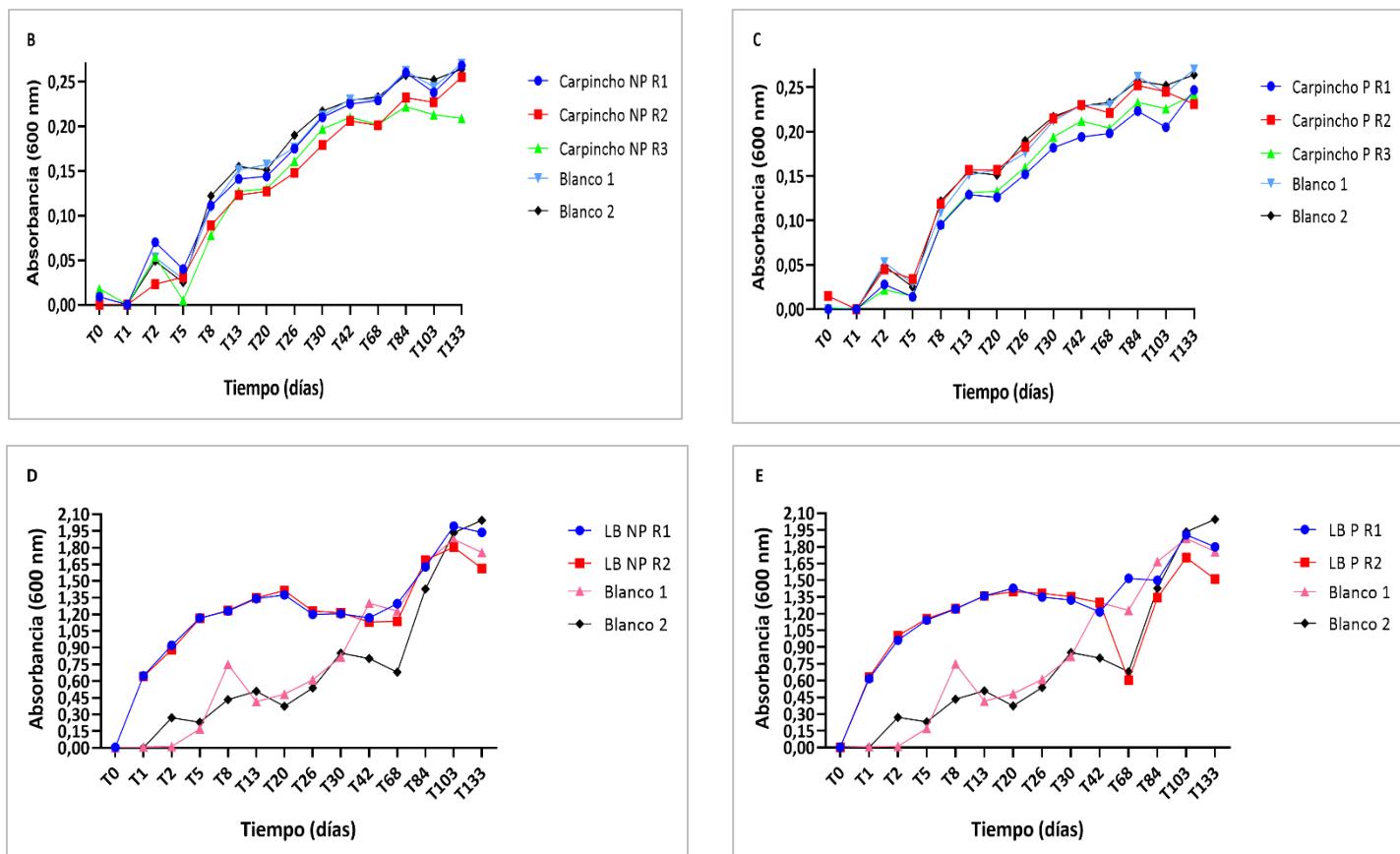
## 5.6. Estimación del crecimiento celular (DO 600 nm) de las cepas NP y P en los ensayos de microcosmos

La **Figura 15** ilustra las absorbancias registradas a lo largo del ensayo, revelando una notable disparidad entre las absorbancias correspondientes a los dos medios evaluados. En el medio LB, ambas cepas muestran un aumento constante en la absorbancia. El blanco de este tratamiento presenta valores de absorbancia más bajos y un incremento gradual. Por otra parte, el agua de laguna mostró que hay discrepancias mínimas entre el blanco y las cepas analizadas que siguen una tendencia ascendente durante el periodo del ensayo. En general, las cepas crecidas en medio LB mostraron un incremento más pronunciado en la absorbancia en comparación con las cepas crecidas en agua de laguna (**Figura 15A**).

Asimismo, se observa que las réplicas de las dos cepas y los blancos en el agua de laguna exhiben absorbancias similares entre sí, con una tendencia ascendente (**Figuras 15 B y C**). Por otro lado, las réplicas de la cepa P en el medio LB presentan una absorbancia discrepante entre ellas en los últimos tiempos del ensayo, mientras que las réplicas de la cepa NP en el mismo medio muestran absorbancias similares entre sí. Además, los blancos en este medio presentan absorbancias claramente discrepantes tanto con las cepas como entre sí (**Figuras 15 D y E**).

En los últimos días del ensayo se observó un aumento de turbidez en los microcosmos con medio LB, no solo en los tratamientos con las cepas P y NP sino también en los blancos, como se puede observar en la **Figura 16**.





**Figura 16.** Fotografía de los microcosmos con medio LB sobre el agitador orbital en los últimos días del ensayo.

## 5.7. Viabilidad de las cepas NP y P en los ensayos de microcosmos mediante citometría de flujo

A partir de los datos obtenidos sobre el porcentaje de viabilidad de las bacterias (% células vivas), se calcularon los promedios entre las réplicas para trazar una curva de viabilidad que compara ambas cepas a través del tiempo (**Figura 17A** y **Figura 19A**). Las réplicas de las cepas NP y P fueron representadas mediante porcentaje de viabilidad (**Figura 17 B - C** y **Figura 19 B - C**). Por otra parte, se realizaron histogramas para representar la intensidad de fluorescencia de distintos tiempos del ensayo en cada uno de los tratamientos (**Figuras 18** y **20**). Se observó que las cepas en agua de laguna y en medio LB no exhibieron un patrón uniforme en su viabilidad, sino que presentaron fluctuaciones con picos de mayor y menor viabilidad a lo largo del tiempo.

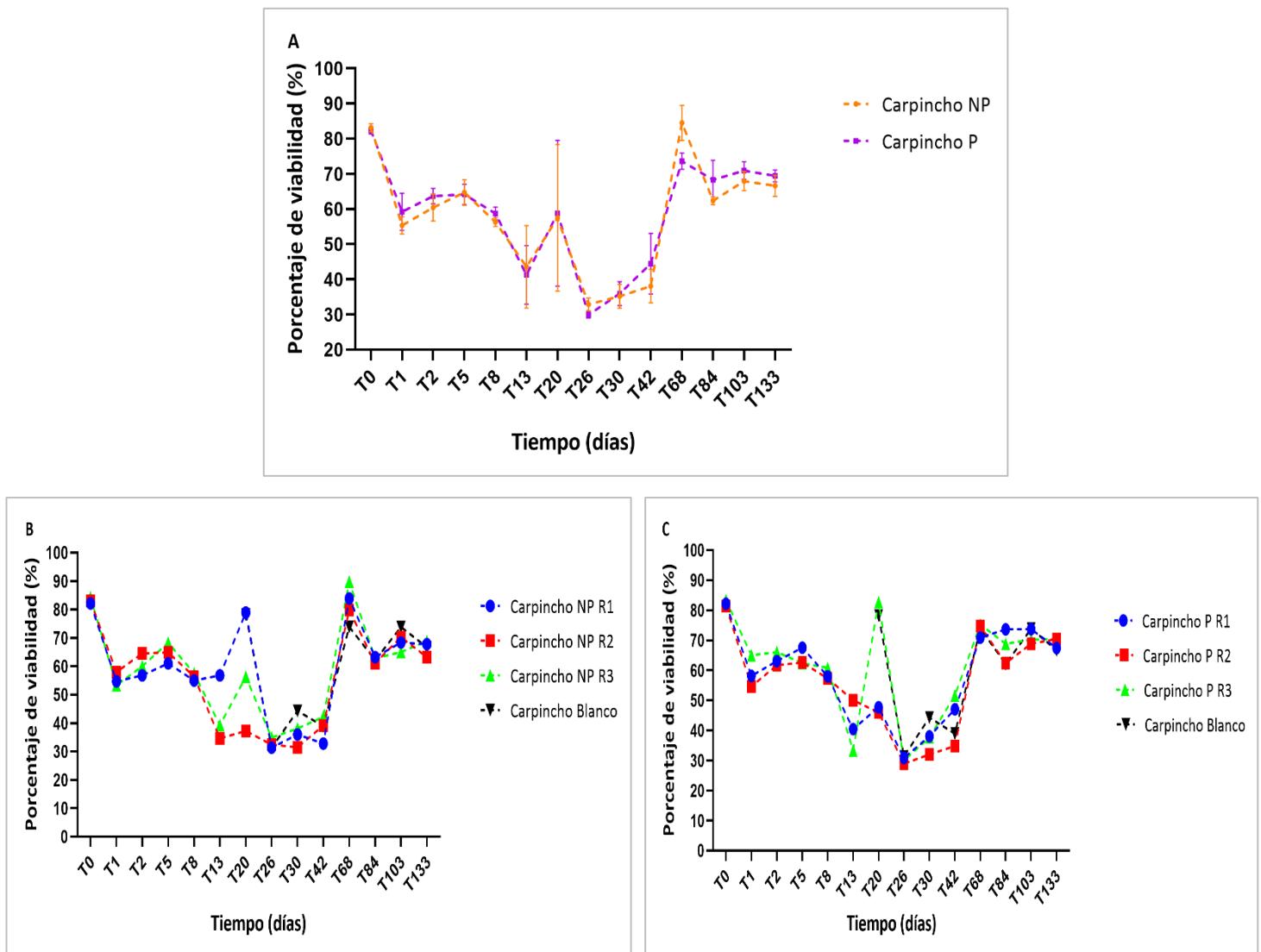
### 5.7.1. Viabilidad de las cepas NP y P en agua de laguna

A grandes rasgos, se observó que ambas cepas comienzan con porcentajes de viabilidad similares, 84% para NP y 82% para P en T0. Posteriormente, la viabilidad disminuyó al 55 % en T1, y a partir de este punto, fluctuó de manera irregular, con aumentos y descensos hasta alcanzar un porcentaje mínimo en los tiempos T26 y T42. A partir de este último tiempo, la cepa NP alcanzó su máximo porcentaje de viabilidad en T68, superando incluso el porcentaje inicial. Este incremento es seguido por una fase de "meseta" (plateau) que se extiendió entre los tiempos T84 y T133 (**Figura 17A**).

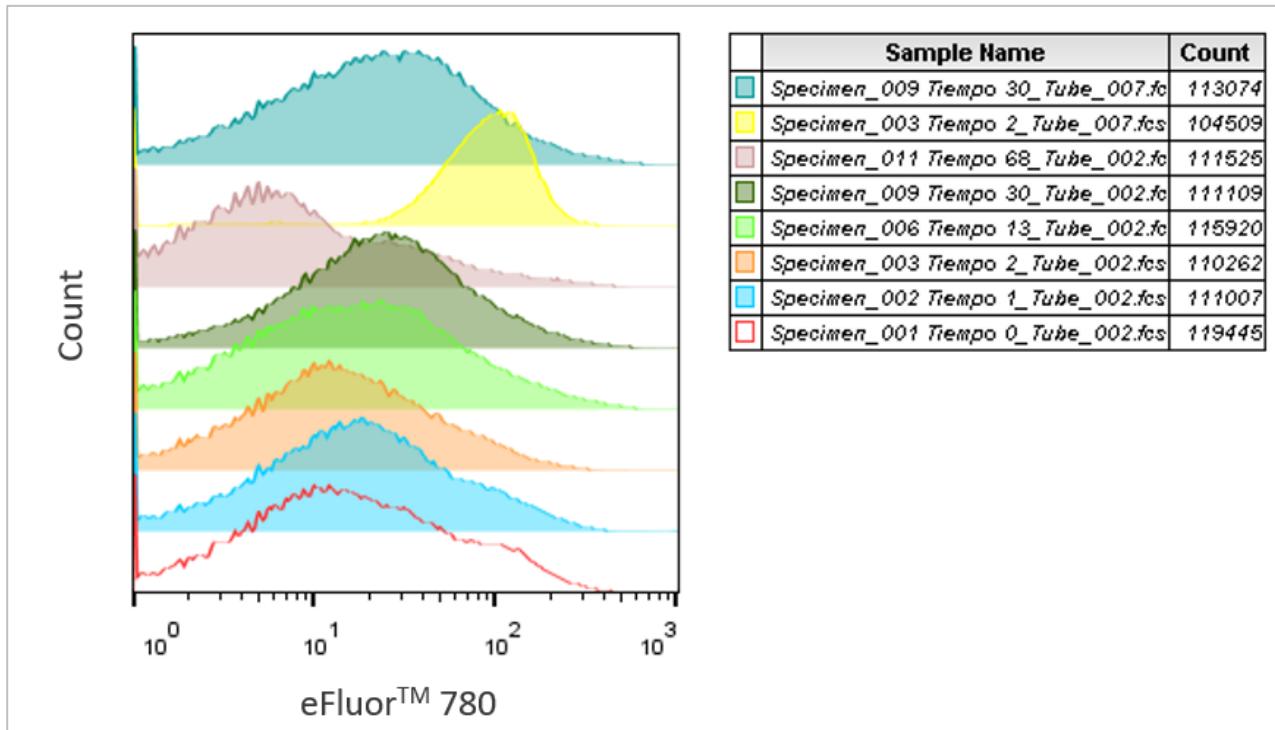
Por otra parte, se destaca que la viabilidad celular fue inversamente proporcional a los valores de UFC/ml y a la densidad óptica medida a 600 nm (DO600) entre los tiempos T2 y T13, lo que reflejó una disminución progresiva en la viabilidad de ambas cepas durante esta fase inicial.

En cuanto a la variabilidad entre réplicas, se observaron diferencias en las viabilidades registradas para ambas cepas (**Figuras 17 B y C**). La cepa NP presentó discrepancias notables entre los tiempos T13 y T20, donde la réplica R1 mostró una mayor viabilidad en comparación con las réplicas R2 y R3. De manera similar, en la cepa P, se evidenciaron variaciones entre réplicas en el mismo rango de tiempos. En T20, la réplica R3 exhibió una viabilidad superior a las réplicas R1 y R2, mientras que en T13, la réplica R2 presentó la mayor viabilidad en comparación con las réplicas R1 y R3. Por otro lado, el tiempo T42 mostró un patrón de comportamiento similar al observado en T13. Además, no se observó diferencias notables entre el blanco y las réplicas en los diferentes tiempos evaluados.

En particular, en el tiempo T20 se registró la mayor discrepancia entre ambas cepas, caracterizada por una marcada variabilidad entre réplicas.



**Figura 17.** Gráficos de viabilidad de las cepas No Patógenas (NP) y Patógenas (P) en agua de laguna. **A.** Viabilidad promedio de las cepas NP y P junto con su desviación estándar ( $N = 3$ ). **B.** Viabilidad de cada una de las réplicas de la cepa NP. **C.** Viabilidad de cada una de las réplicas de la cepa P.



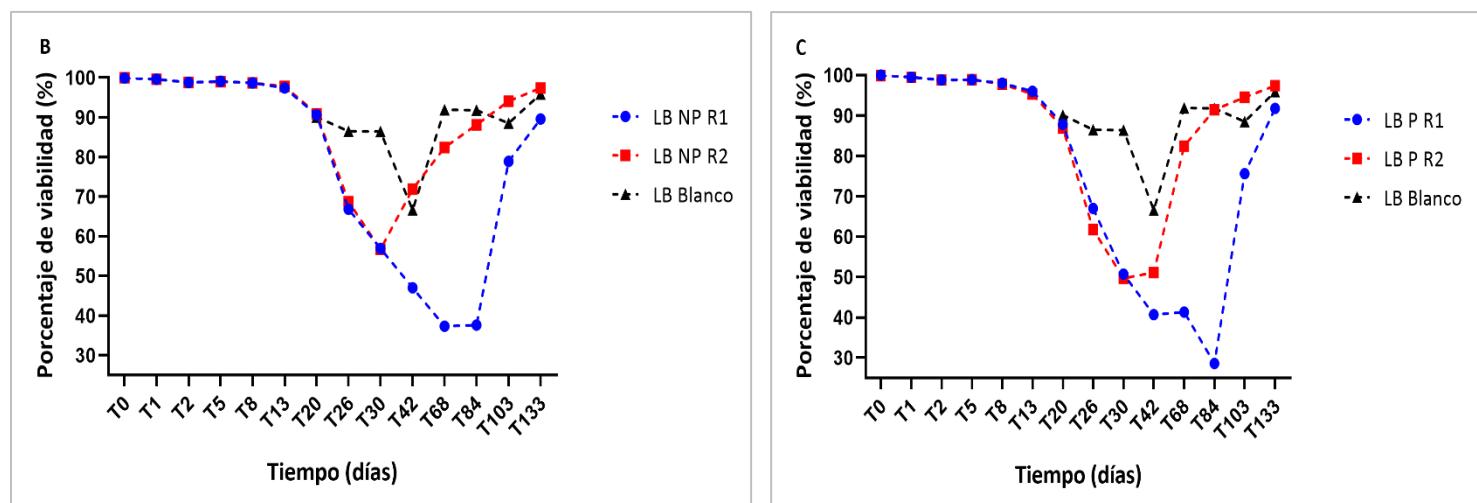
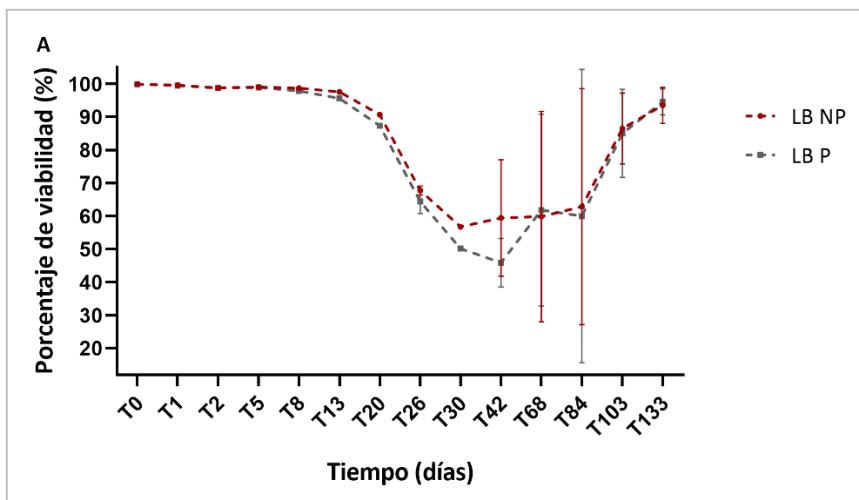
**Figura 18.** Histogramas de intensidad de fluorescencia de distintos tiempos del ensayo, utilizando la muestra Carpincho NP como referencia. El análisis se realizó utilizando la estrategia de gating descripta en el apartado 4.5.3. Cada histograma en el gráfico corresponde a una medición de fluorescencia para un tiempo específico, codificados por colores: T0 (rojo), T1 (celeste), T2 (naranja), T13 (verde claro), T30 (verde oscuro), y T68 (lila), con un control positivo en amarillo y un blanco en celeste oscuro.

#### 5.7.2. Viabilidad de las cepas NP y P en medio LB

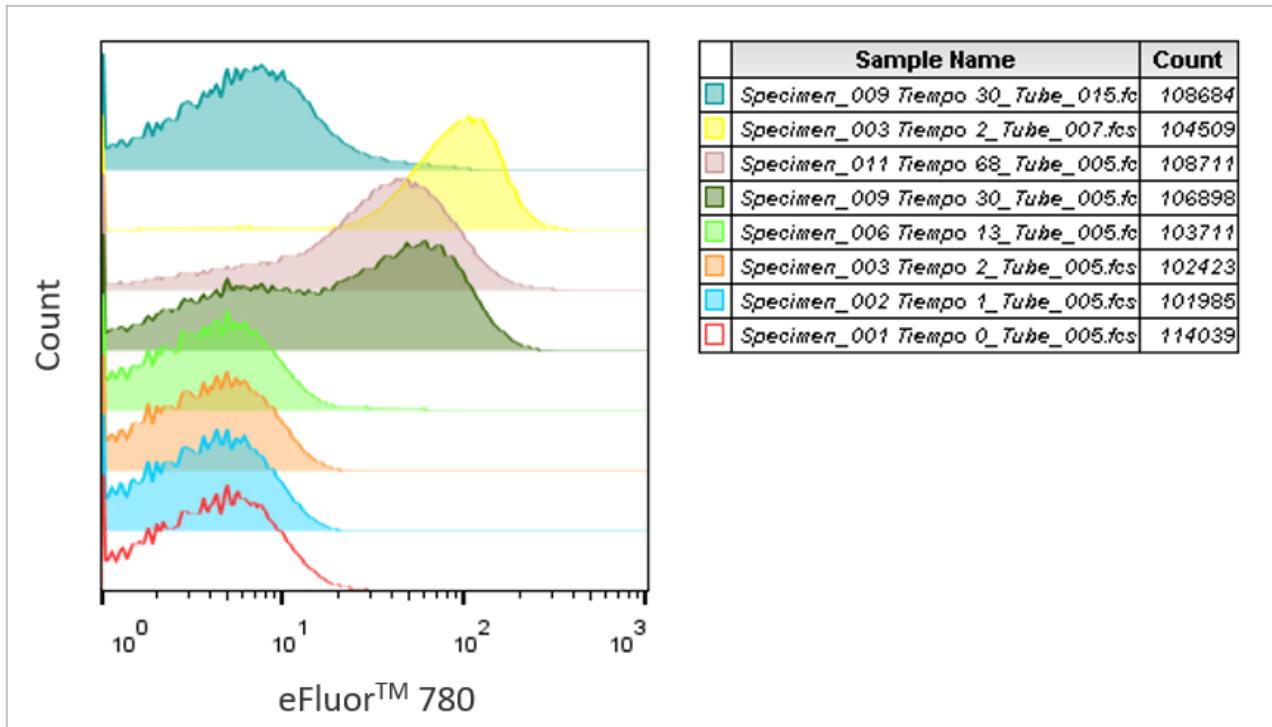
A grandes rasgos, se observó que la viabilidad de las dos cepas se mantuvo en valores de 100% a 98% hasta el T13, momento a partir del cual comenzó a descender. Esta disminución continuó hasta el T30, donde la viabilidad cayó a alrededor del 50%. Sin embargo, después de este punto, la viabilidad fluctuó, aumentando y disminuyendo, hasta alcanzar casi el 100% en el último tiempo medido. Además, ambas cepas mostraron una viabilidad similar en medio LB a lo largo del ensayo (**Figura 19A**).

Por otro lado, se observaron diferencias en la viabilidad entre las réplicas de las cepas (**Figuras 19 B y C**). En la cepa NP, se registraron diferencias notables entre los tiempos T42 y T84, donde la réplica R2 exhibió una mayor viabilidad que la réplica R1. De manera similar, en la cepa P, también se observaron diferencias en el rango de tiempos entre T42 y T84, con la réplica R2 mostrando una mayor viabilidad que la réplica R1.

A partir del tiempo T42, se observó que la réplica R2 de ambas cepas exhibió un comportamiento similar al blanco. En contraste, la réplica R1 de ambas cepas mostraron un comportamiento distinto al blanco.



**Figura 19.** Gráficos de viabilidad de las cepas No Patógenas (NP) y Patógenas (P) en medio LB. **A.** Viabilidad promedio de las cepas NP y P junto con su desviación estándar ( $N = 2$ ). **B.** Viabilidad de la cepa NP. **C.** Viabilidad de la cepa P.



**Figura 20.** Histogramas de intensidad de fluorescencia de distintos tiempos del ensayo, utilizando la muestra LB NP como referencia. El análisis se realizó utilizando la estrategia de gating descripta en el apartado 4.5.3. Cada histograma en el gráfico corresponde a una medición de fluorescencia para un tiempo específico, codificados por colores: T0 (rojo), T1 (celeste), T2 (naranja), T13 (verde claro), T30 (verde oscuro), y T68 (lila), con un control positivo en amarillo y un blanco en celeste oscuro.

#### 5.7.3. Correlación entre los recuentos en placa Petrifilm 24 hs<sup>TM</sup> y los recuentos de células mediante la citometría de flujo

Se realizaron correlaciones de Spearman para verificar la relación entre los recuentos en placas Petrifilm 24 hs<sup>TM</sup> y los recuentos obtenidos mediante citometría de flujo (% de células vivas) (**Tabla 9**). Se observó ausencia de correlaciones significativas entre las cepas en el agua de laguna utilizando el recuento en placa y la citometría. Sin embargo, se encontró que los coeficientes de correlación para las cepas cultivadas en medio LB fueron un poco más altos (0,32 y 0,38) que los de las cepas cultivadas en agua de laguna (0,10 y 0,19), aunque ninguna de las variables medidas mostró una correlación estadísticamente significativa.

**Tabla 9.** Correlaciones utilizando el coeficiente de Spearman entre los recuentos en placa y los porcentajes de células vivas mediante la citometría de flujo.

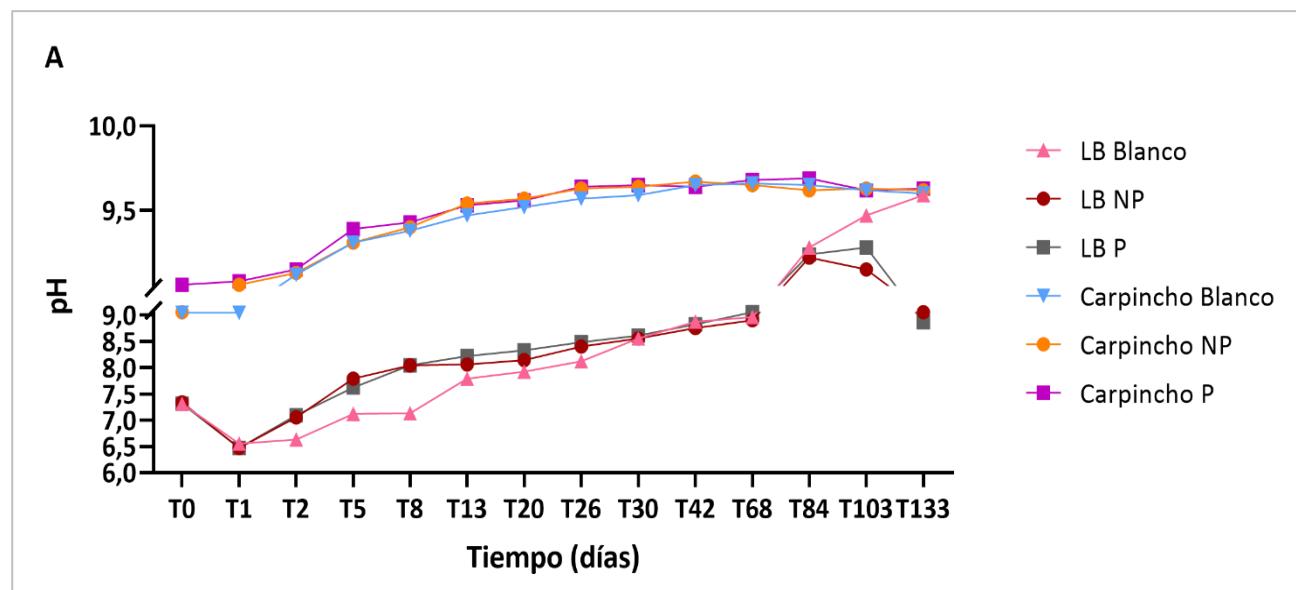
Variables	Coeficientes de correlación (r)	p-values
Carpincho NP	0,100	0,739

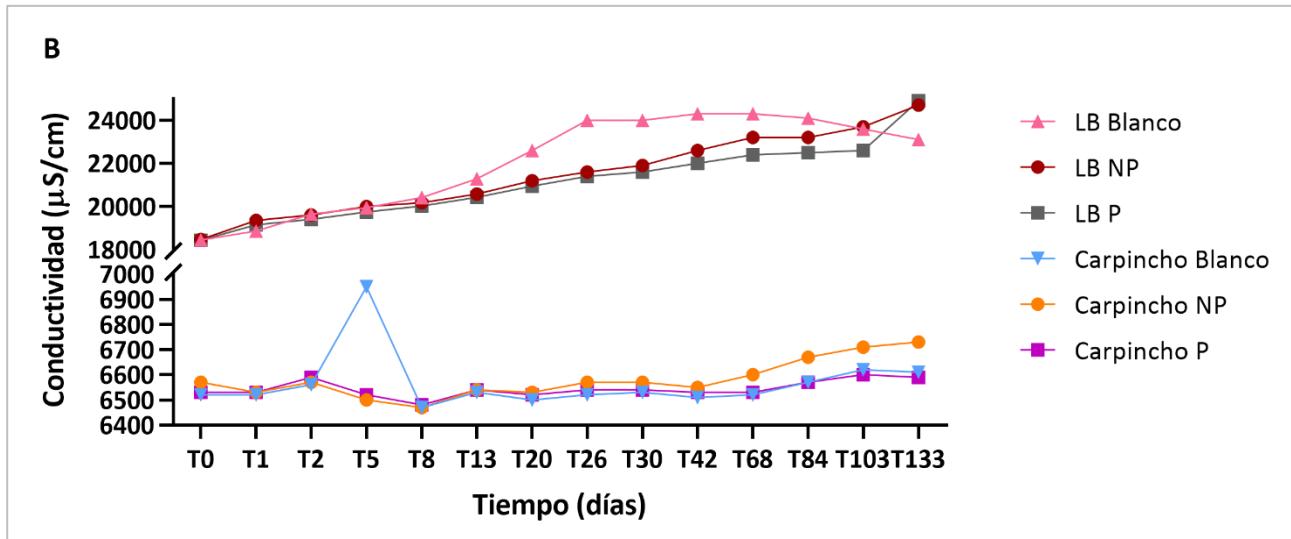
<b>Carpincho P</b>	0,190	0,511
<b>LB NP</b>	0,380	0,176
<b>LB P</b>	0,320	0,266

### 5.8. Determinación de variables físico-químicas en los ensayos de microcosmos

En las figuras subsiguientes se muestra la variación del pH y la conductividad a lo largo del experimento. Respecto al pH, su valor varió de 9,04 a 9,69 en agua de laguna y se constata que, en este medio, no se registraron grandes discrepancias entre las distintas cepas y el control. Por otro lado, en el medio LB, el pH fluctuó entre 7,30 y 9,28, presentando una disminución a 8,50 en el último tiempo para ambas cepas, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ( $p > 0,99$ ). Adicionalmente, el blanco en este medio mostró fluctuaciones, aumentando de 7,30 a 9,59 a lo largo del tiempo (**Figura 21A**).

En cuanto a la conductividad, su valor varió de 6500 a 6700  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en el agua de laguna, evidenciándose discrepancias entre el control (Blanco) y las cepas en T5, con un incremento progresivo a lo largo del experimento. Por otro lado, en el medio LB, los valores de conductividad oscilaron entre 18400 y 24000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , superiores en comparación con los registrados en el agua de laguna. Además, se observaron discrepancias entre el control y las cepas en los últimos períodos del ensayo, con un aumento continuo a lo largo del experimento (**Figura 21B**).





**Figura 21.** Variables físico-químicas medidas en los ensayos de microcosmos. A. pH. B. Conductividad.

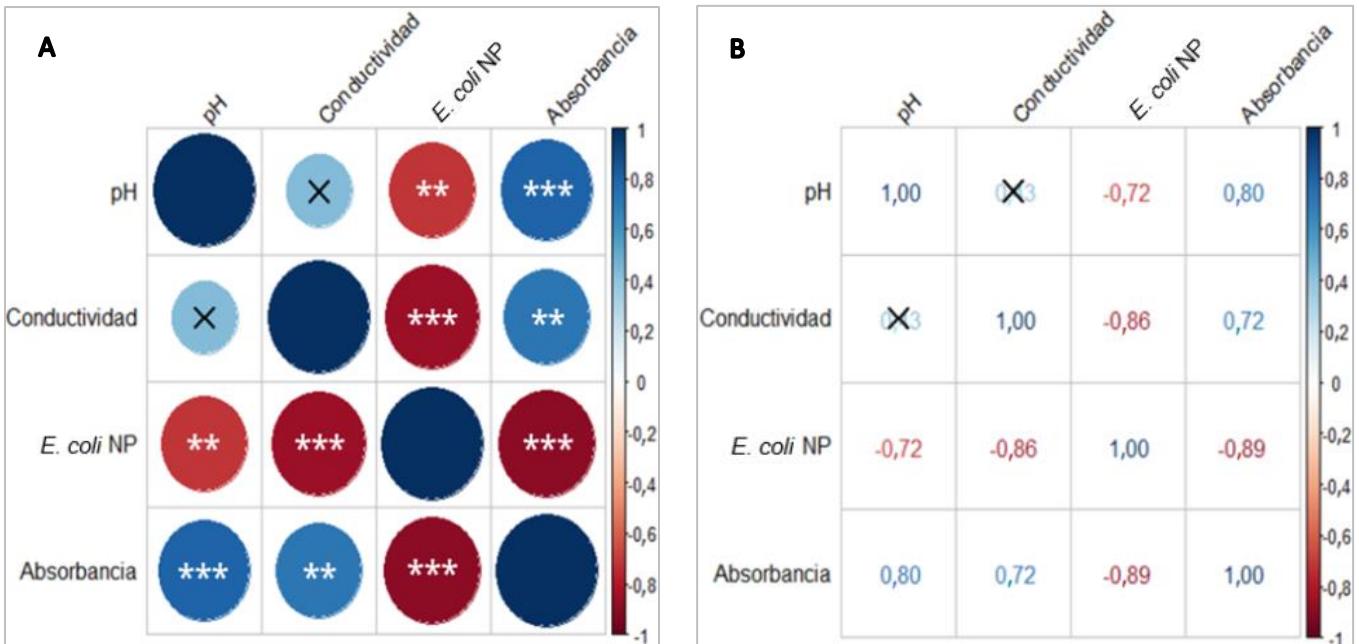
### 5.9. Análisis de las variables físico-químicas en relación a la abundancia de las cepas de *E. coli*

Se realizaron correlogramas utilizando el coeficiente de correlación de Spearman para analizar la relación entre la abundancia de las cepas de *E. coli* (NP y P) obtenidas mediante placas Petrifilm 24 hs<sup>TM</sup> en agua de laguna y medio LB versus las variables medidas a lo largo del ensayo (**Figuras 22 - 25**).

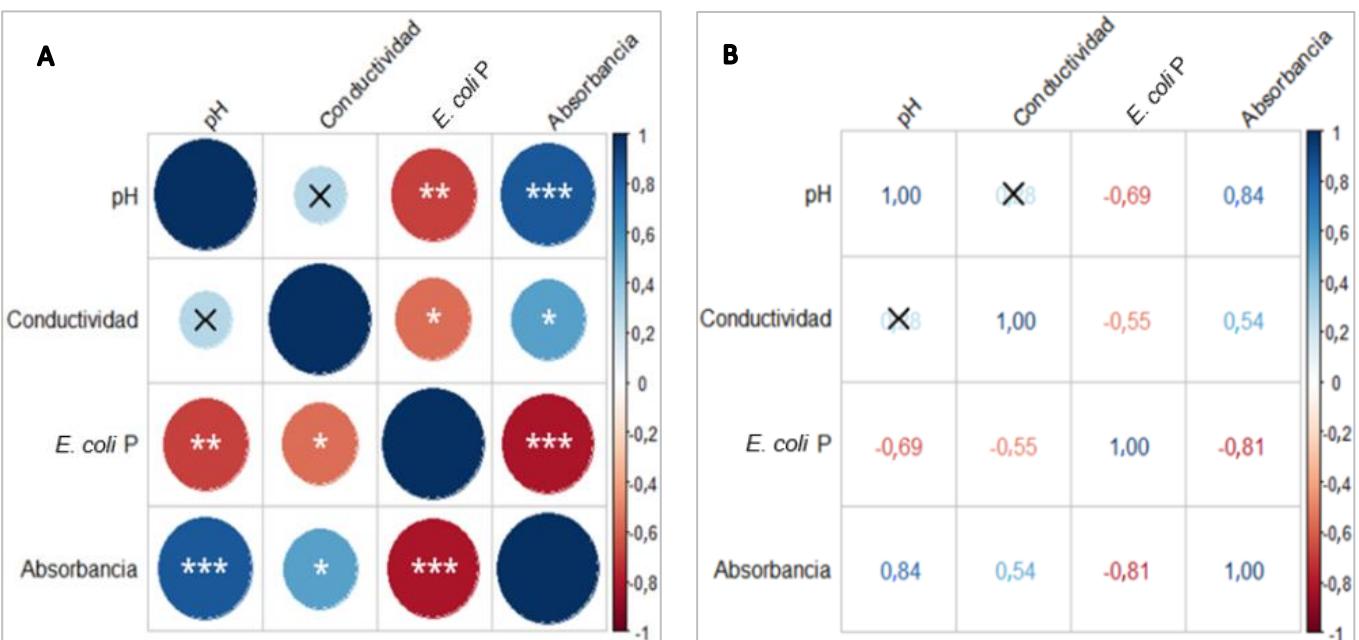
#### 5.9.1. Análisis de las variables físico-químicas en relación a la abundancia de las cepas de *E. coli* en agua de laguna

En el caso de la abundancia de la cepa NP (**Figura 22**), no se encontraron correlaciones positivas significativas con ninguna variable. Sin embargo, se identificaron correlaciones fuertes negativas y significativas de la abundancia de la cepa NP con el pH ( $r=-0,72$ ), la conductividad ( $r=-0,86$ ) y la absorbancia ( $r=-0,89$ ). Por otro lado, se observó una correlación positiva y significativa entre la absorbancia y la conductividad ( $r=0,72$ ), así como entre la absorbancia y el pH ( $r=0,80$ ).

En cuanto a la abundancia de la cepa P (**Figura 23**), no se encontraron correlaciones positivas significativas con ninguna variable. Sin embargo, se identificaron correlaciones fuertes negativas y significativas de la abundancia de la cepa P con el pH ( $r=-0,69$ ), la conductividad ( $r=-0,55$ ) y la absorbancia ( $r=-0,81$ ). Por otro lado, se observó una correlación fuerte positiva y significativa entre la absorbancia y la conductividad ( $r=0,54$ ), así como entre la absorbancia y el pH ( $r=0,84$ ) en los microcosmos con agua de laguna.



**Figura 22.** Gráficos de correlación utilizando el coeficiente de Spearman entre las variables físico-químicas y la abundancia de la cepa NP en agua de laguna. **A.** Correlograma con el nivel de significancia: \* $p$ -values < 0,05. \*\*  $p$ -values < 0,01. \*\*\*  $p$ -values < 0,001. \*\*\*\*  $p$ -values < 0,0001. **B.** Correlograma con los valores de los coeficientes de correlación ( $r$ ). X: ausencia de relación entre las variables medidas.  $N = 14$ .



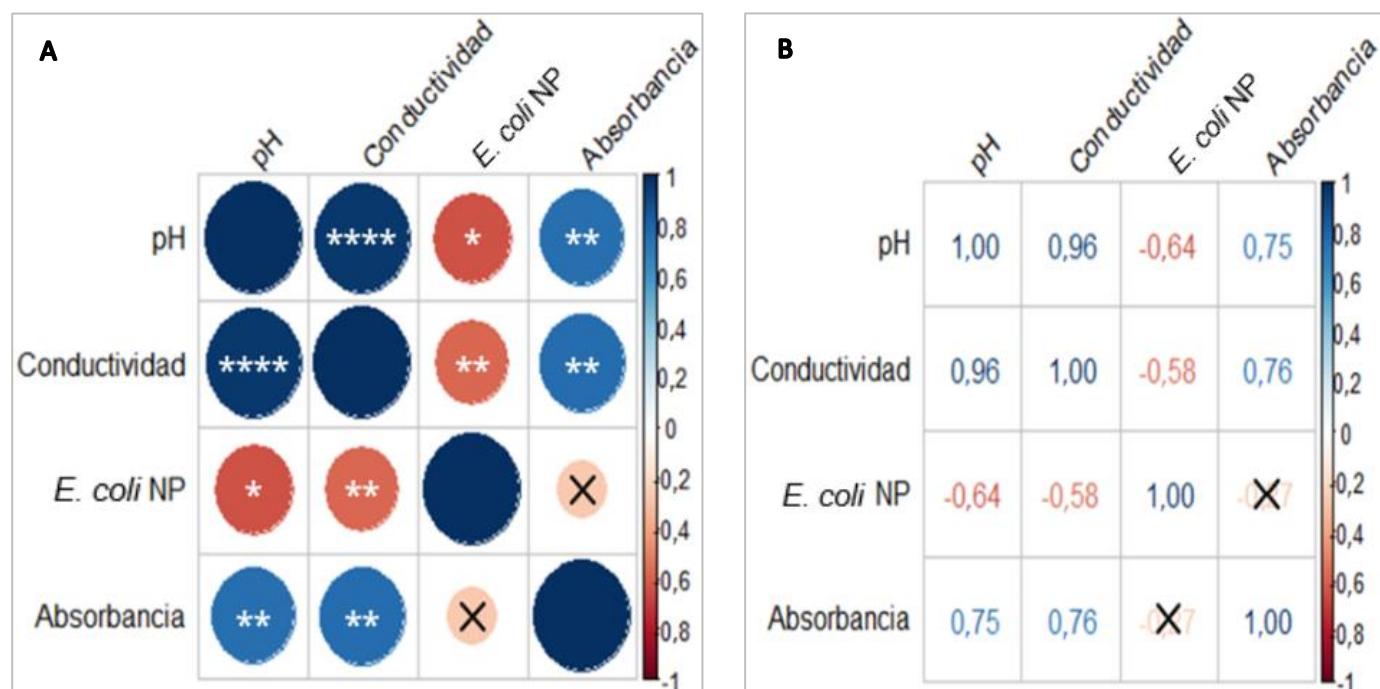
**Figura 23.** Gráfico de correlación utilizando el coeficiente de Spearman entre las variables físico-químicas y la abundancia de la cepa P en agua de laguna. **A.** Correlograma con el nivel de significancia: \* $p$ -values < 0,05.

\*\*  $p$ -values < 0,01. \*\*\*  $p$ -values < 0,001. \*\*\*\*  $p$ -values < 0,0001. **B.** Correlograma con los valores de los coeficientes de correlación ( $r$ ). X: ausencia de relación entre las variables medidas.  $N = 14$ .

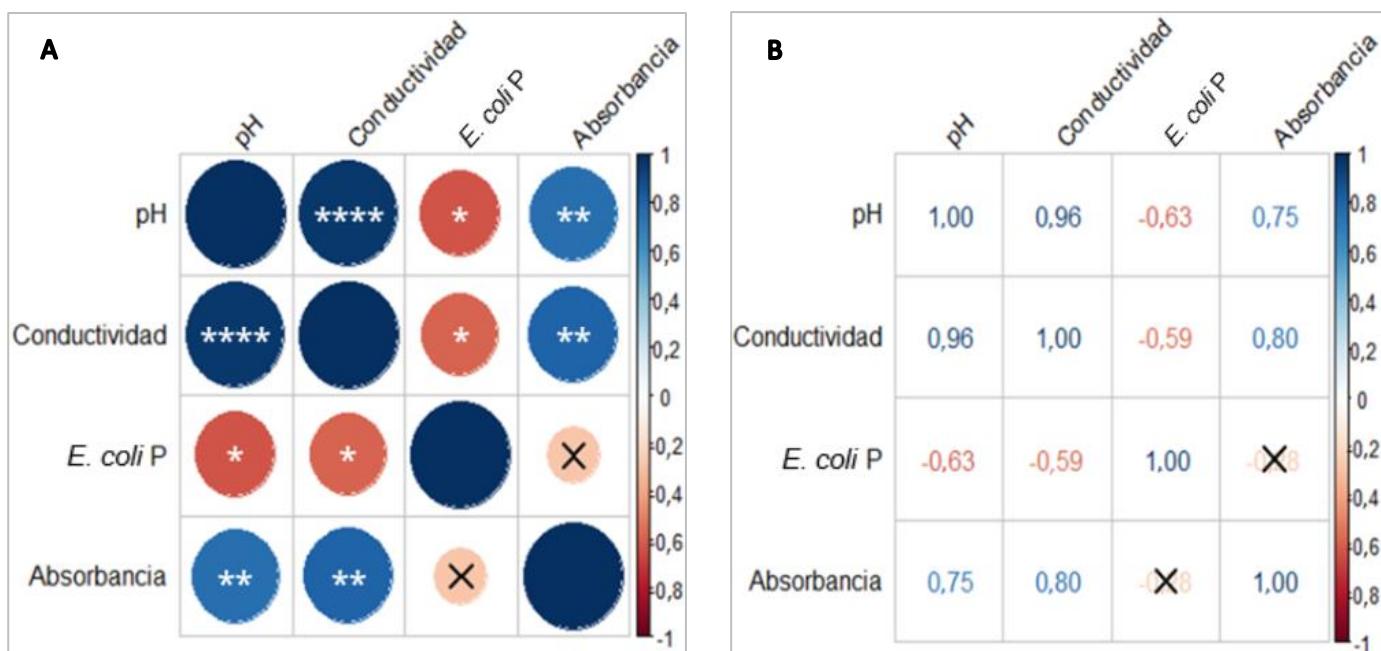
### 5.9.2. Análisis de las variables físico-químicas en relación a la abundancia de las cepas de *E. coli* en medio LB

En el caso de la abundancia de la cepa NP (Figura 24), no se encontraron correlaciones positivas significativas con ninguna variable. Sin embargo, se identificaron correlaciones negativas y significativas de la abundancia de la cepa NP con el pH ( $r=-0,64$ ) y la conductividad ( $r=-0,58$ ). Se observó que no hubo una relación significativa entre la abundancia de *E. coli* y la absorbancia, a diferencia del tratamiento con agua de laguna, donde sí se observaron tales relaciones. Asimismo, se observó una correlación fuerte positiva y significativa entre la absorbancia y la conductividad ( $r=0,76$ ), así como entre la absorbancia y el pH ( $r=0,75$ ) y, también entre la conductividad y el pH ( $r=0,96$ ).

En cuanto a la abundancia de la cepa P (Figura 25), tampoco se encontraron correlaciones positivas significativas con ninguna variable. Sin embargo, se identificaron correlaciones negativas de la abundancia de la cepa P con el pH ( $r=-0,63$ ) y la conductividad ( $r=-0,59$ ), presentando un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Se observó que no hubo una relación significativa entre la abundancia de *E. coli* y la absorbancia, a diferencia del tratamiento con agua de laguna, donde sí se observaron tales relaciones. Por otro lado, se observó una correlación fuerte positiva y significativa entre la absorbancia y la conductividad ( $r=0,80$ ) y entre la absorbancia y el pH ( $r=0,75$ ).



**Figura 24.** Gráfico de correlación utilizando el coeficiente de Spearman entre las variables físico-químicas y la abundancia de la cepa NP en medio LB. **A.** Correlograma con el nivel de significancia: \* $p$ -values < 0,05. \*\*  $p$ -values < 0,01. \*\*\*  $p$ -values < 0,001. \*\*\*\*  $p$ -values < 0,0001. **B.** Correlograma con los valores de los coeficientes de correlación ( $r$ ). X: ausencia de relación entre las variables medidas.  $N = 14$ .



**Figura 25.** Gráfico de correlación utilizando el coeficiente de Spearman entre las variables físico-químicas y la abundancia de la cepa P en medio LB. **A.** Correlograma con el nivel de significancia: \* $p$ -values < 0,05. \*\*  $p$ -values < 0,01. \*\*\*  $p$ -values < 0,001. \*\*\*\*  $p$ -values < 0,0001. **B.** Correlograma con los valores de los coeficientes de correlación ( $r$ ). X: ausencia de relación entre las variables medidas.  $N = 14$ .

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio, se investigó la supervivencia y proliferación de cepas de *E. coli* en el agua de la laguna El Carpincho, utilizada con fines recreativos, a través de ensayos en microcosmos. Para ello, se emplearon distintas técnicas para la enumeración de *E. coli*, como los recuentos en placas, la densidad óptica DO<sub>600</sub> y citometría de flujo. Además, se llevó a cabo la caracterización de la cepa P mediante SGC. El análisis mediante SGC confirmó su género y especie, proporcionando detalles sobre su genoma, como sus factores de virulencia (**Tabla 5**), serotipo y secuenciotipo (**Tabla 6**), y genes asociados a la resistencia a antimicrobianos (**Tabla 7**). De los resultados del ensayo, se observó que la cepa P sobrevivió entre 30 y 84 días en el agua de laguna, mientras que la cepa NP sobrevivió entre 84 y 133 días (**Figura 13** y **Tabla 8**). Estos resultados coinciden con estudios previos que han demostrado que la presencia de factores de virulencia representa una carga metabólica adicional, dificultando su adaptación al ambiente (van Elsas et al., 2011; Berthe et al., 2013).

Además, se observó sorprendentemente que ambas cepas proliferaron en el agua de laguna, lo que sugiere que condiciones ambientales óptimas pueden favorecer la multiplicación de estas bacterias. La capacidad de *E. coli* para sobrevivir y crecer en el medio ambiente probablemente se deba a su versatilidad en la adquisición de energía.

Como se mencionó previamente y acorde a lo descripto por Quirós et al. (2002a), la laguna en estudio se caracteriza por estar altamente enriquecida en nutrientes (hipereutrófica) (**Tabla 3**), lo cual se manifestó en los valores elevados de PT, NTK, PRS y Chl-a (Adamovich et al., 2016). Además, la esterilización empleada liberó nutrientes adicionales como se observa en la **Tabla 4**, los cuales proceden de las algas y otros materiales orgánicos enriqueciendo aún más el ambiente acuático (Suzuki et al., 2019). Estos resultados obtenidos respaldan la hipótesis inicial, demostrando que las cepas de *E. coli* son capaces de sobrevivir y prosperar en este entorno acuático debido a su abundancia de nutrientes y que su capacidad de supervivencia varía según su genotipo.

Por otro lado, la estimación de la DO<sub>600</sub> y la viabilidad de las cepas mediante citometría de flujo no se correlacionaron con los recuentos en placa (**Figuras 22 – 25 y Tabla 9**), debido a la falta de selectividad, por parte de estos métodos, para cuantificar únicamente *E. coli* y al posible crecimiento de otras bacterias. Esto se debe a que el ensayo no se desarrolló en una atmósfera estéril. Por este motivo, el mejor método para cuantificar la abundancia de *E. coli* durante el ensayo fue el cultivo selectivo en placas cromogénicas.

### 6.1. Caracterización genética de las cepas

En este trabajo, el tratamiento correspondiente a la cepa P se llevó a cabo con una cepa STEC O103:H2 *eae-ε/ehA/stx<sub>1a</sub>/stx<sub>2a</sub>*, aislada previamente de un ambiente acuático pampeano (Nuozzi et al., 2023). La técnica de SGC permitió la serotipificación y caracterización detallada de esta cepa. Esta técnica proporciona información completa sobre los genes codificados en todo el genoma, lo que permite identificar los determinantes que intervienen en los mecanismos de patogenia. Estos determinantes incluyen elementos genéticos como islas de patogenicidad, plásmidos y distintos sistemas de secreción (Kekre et al., 2021), todos ellos esenciales para la supervivencia del microorganismo y su adaptación al medio ambiente (Garza-Ramos et al., 2009).

Cabe destacar, que los patotipos de STEC presentan dos tipos distintos de toxina Shiga, con varios subtipos: *stx<sub>1</sub>* (que comprende *stx<sub>1a</sub>*, *stx<sub>1c</sub>* y *Stx<sub>1d</sub>*) y *stx<sub>2</sub>* (*stx<sub>2a</sub>*, *stx<sub>2b</sub>*, *stx<sub>2c</sub>*, *stx<sub>2d</sub>*, *stx<sub>2e</sub>*, *stx<sub>2f</sub>*, *stx<sub>2g</sub>*, *stx<sub>2h</sub>* y *stx<sub>2i</sub>*) (Scheutz et al., 2012; Lacher et al., 2016; Bai et al., 2018;). Estos genes *stx* están codificados en bacteriófagos lambdoides (e.g., Muniesa & Jofre, 1998) y varios estudios han informado de un número significativo de bacteriófagos libres portadores de *stx<sub>2</sub>* en el medio ambiente, aumentando así el potencial de infectar nuevos huéspedes bacterianos (Muniesa et al., 1999; García-Aljaro et al., 2004). García-Aljaro et al. (2005) llevaron a cabo una caracterización fenotípica y genotípica de 144 cepas de STEC aisladas de aguas residuales urbanas y animales

con el factor virulento *stx*<sub>2</sub>. Entre ellas, una cepa fue positiva para el gen que codifica a la intimina (*eae*) y cinco cepas fueron positivas para la adhesión a la célula huésped codificada por el gen *saa*. Se ha descripto que *eae* es uno de los genes patógenos detectados con mayor frecuencia en el medio ambiente (Hamilton et al., 2010; Zhang et al., 2016). En este sentido, Marucci et al. (2011) informaron el aislamiento de cepas de STEC portadoras de factores *stx*<sub>2</sub> y *eae* en aguas recreativas (ríos y arroyos) de la Región Sierra de la Ventana de la Provincia de Buenos Aires. Por otro lado, varios autores han señalado la fuerte asociación entre la presencia del gen *eae* y la capacidad de las cepas STEC de causar enfermedades humanas graves (Paton & Paton, 1998).

El serotipo O103:H2 ha sido aislado en diversos ambientes, incluyendo alimentos como leche sin pasteurizar (Mylius et al., 2018), carne de res (Bibbal et al., 2015) y productos lácteos (Douëllou et al., 2017), así como en heces de animales y humanos (Adator et al., 2018). Su presencia también se ha detectado en aguas recreativas (Tyson et al., 2019; Dias et al., 2022) y residuales (Doughari et al., 2011). Asimismo, esta cepa se ha aislado en casos de diarrea y síndrome urémico hemolítico en Argentina durante el período 2017-2022 (Laboratorio Nacional de Referencia para Base de datos de STEC; Nuozzi et al., *submitted*), lo que resalta su importancia como agente causal de enfermedades graves. La presencia del serotipo STEC O103:H2 en ambientes acuáticos no se limita a Argentina. Estudios en Canadá (Tyson et al., 2019) y Portugal (Dias et al., 2022) también han encontrado esta cepa en aguas de ríos y áreas de agua dulce, respectivamente. En este último estudio, se la aisló en un sistema acuático donde las actividades relevantes incluyen la agricultura, la ganadería y la pesca (Lillebø et al., 2019). Esto concuerda con las actividades desarrolladas en la zona donde se aisló la cepa utilizada en este trabajo, recolectada en el río Rojas, aguas arriba de la ciudad de Rojas, en la provincia de Buenos Aires, una zona influenciada por actividades ganaderas y agrícolas (Nuozzi et al., 2023). Diversos estudios han demostrado la relación entre la presencia de cepas STEC O103:H2 en el medio ambiente y su transmisión a humanos. En Finlandia, se rastreó una infección por este serotipo en un niño con diarrea sanguinolenta hasta muestras fecales de ganado y del entorno circundante (Heinikainen et al., 2007). Un estudio más reciente en Corea asoció un brote de gastroenteritis por STEC O103:H2 con el consumo de aguas subterráneas contaminadas en un campamento escolar (Park, 2018). Estas investigaciones, junto con otros casos documentados de diarrea aguda, diarrea sanguinolenta e incluso SUH asociados a infecciones por STEC, confirman que el medio acuático puede ser un importante vehículo de transmisión de *E. coli* patógena. Los resultados obtenidos por SGC de la cepa P para la detección de RAM concordaron con los obtenidos mediante técnicas convencionales, coincidiendo en la presencia de sensibilidad a los antimicrobianos testeados. Sin embargo, la SGC ofrece una ventaja significativa al proporcionar información sobre el mecanismo de resistencia (Koutsoumanis et al., 2019). Esta información es crucial para la vigilancia a nivel internacional, no solo en el contexto de patógenos específicos, sino también en un enfoque global bajo el

concepto de "una sola salud" (Djordjevic et al., 2024). El agua ambiental juega un papel fundamental en la introducción y diseminación de RAM entre humanos, animales y plantas/cultivos. Esto se debe a que el agua potable y el agua de riego a menudo provienen de aguas superficiales, las cuales también reciben aguas residuales como punto de descarga. Las actividades recreativas y los escurrimientos agrícolas también pueden contaminar las aguas superficiales, contribuyendo a la transmisión de la resistencia antimicrobiana (Bell et al., 2021). En este trabajo se encontraron dos genes asociados con RAM, *glpT\_E448K* y *pmrB\_Y358N*. El gen *glpT* codifica para un importador activo que participa en la absorción de muchos azúcares fosforilados. Esta mutación específica, E448K cambia el aminoácido glutamato (E) por lisina (K) en la posición 448 de la secuencia de aminoácidos de la proteína *glpT*. Estas mutaciones puntuales pueden conferir resistencia a la fosfomicina al reducir la importación del fármaco a las bacterias (Nilsson, et al., 2003; Takahata, et al., 2010). Altayb et al. (2022) llevaron a cabo un estudio que analizó la co-ocurrencia de determinantes de resistencia a los antimicrobianos en aislamientos clínicos y ambientales de *K. pneumoniae* y *E. coli*. En sus hallazgos, se observó que *glpT* (E448K) estaba presente en 20 aislamientos (90%) de las muestras de *E. coli*, tanto de origen clínico como ambiental. Por otro lado, el gen *pmrB* codifica un regulador de respuesta de dos componentes y un sistema sensor quinasa que ayuda a las bacterias a detectar y responder a los factores ambientales. Esta mutación específica, Y358N, sustituye el aminoácido tirosina (Y) por asparagina (N) en la posición 358 de la secuencia de aminoácidos de la proteína *pmrB*. Estas mutaciones pueden modificar la síntesis de LPS y esto provoca menos carga negativa y una menor afinidad de unión de la colistina a su objetivo en la LPS (Seleim et al., 2022). Sin embargo, esta bacteria resultó ser sensible a los dos antimicrobianos, es decir que los mismos son eficaces frente a ella (Daza Pérez, 1998). Esto puede ser debido a que los genes asociados a RAM en bacterias no siempre confieren resistencia fenotípica, un fenómeno conocido como resistencia "silenciosa" (Deekshit & Srikumar, 2022). Los genes silenciosos de resistencia antimicrobiana (genes crípticos) se definen como aquellos genes que portan las bacterias en un plásmido o en el ADN cromosómico sin mostrar la correspondiente resistencia fenotípica a los antibióticos (Tamburini & Mastromei, 2000; Kime et al., 2019). Estos genes crípticos se identifican esporádicamente en patógenos bacterianos y han sido encontrados en *E. coli* (Stasiak et al., 2021). El silenciamiento de estos genes a menudo es resultado de mutaciones o proteínas reguladoras que desactivan su expresión (Kime et al., 2019; Deekshit & Srikumar, 2022). También puede ocurrir que la expresión del gen de resistencia sea subóptima, lo que impide la producción de una proteína de resistencia funcional (Kime et al., 2019). Además, se sabe que el transporte y la expresión de genes de resistencia a los antibióticos exigen un costo de aptitud para las bacterias (Andersson et al., 2007; Andersson & Hughes, 2010; Vk et al., 2019), lo cual puede conducir a la contraselección de estos genes costosos cuando no son necesarios (Deekshit & Srikumar, 2022).

Tal como se describió en el apartado 4.4, se realizaron análisis convencionales para la caracterización de ambas cepas, como pruebas de PCR múltiples para detectar genes de virulencia, pruebas bioquímicas para confirmar la identidad de *E. coli*, ensayos de aglutinación (serotipificación) y evaluación de la sensibilidad a los antibióticos (Nuozzi et al., *submitted*). Sin embargo, todos estos análisis dieron resultados negativos para la cepa NP. Estos hallazgos sugieren la ausencia de los principales determinantes de patogenicidad en esta cepa, lo cual respalda su clasificación como no patogénica.

## 6.2. Supervivencia de cepas de *E. coli* NP y P en los ensayos de microcosmos

### 6.2.1. Placas de cultivo

Los resultados mostraron que la cepa NP de *E. coli* tuvo una mayor supervivencia a lo largo de los 133 días en agua de laguna, alcanzando un recuento máximo promedio de  $3,76 \times 10^4$  UFC/ml en T1 (**Figura 13A, Tabla 8**). En contraste, la cepa P alcanzó un recuento máximo promedio de  $3,65 \times 10^3$  UFC/ml en T8 y su supervivencia fue menor, con un rango de 30 a 84 días (**Figura 13A, Tabla 8**). Ambas cepas no solo mostraron supervivencia en el agua de la laguna, sino también proliferación o multiplicación en este medio, al superar en ambos casos la concentración inicial sembrada. Asimismo, las réplicas de cada cepa mostraron variabilidad en los recuentos y en la supervivencia (**Figuras 13 B y C**), lo que podría indicar diferencias en el comportamiento individual de las bacterias bajo condiciones similares, distintos estados de latencia (VBNC), diferencias en la competencia por recursos o disparidad en la siembra. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado que *E. coli* puede sobrevivir por largos períodos fuera del huésped. Ishii & Sadowsky (2008) y Petersen & Hubbard (2020) reportaron la capacidad de *E. coli* para sobrevivir en ambientes acuáticos y suelos. En medios acuáticos, esta bacteria puede persistir desde dos semanas hasta más de diez meses (Warburton et al., 1998; McGee et al., 2002; Chekabab et al., 2013), mientras que en el suelo su supervivencia puede extenderse por lo menos a ocho meses (Byappanahalli et al., 2006).

En línea con estos hallazgos, Polifroni et al. (2014) llevaron a cabo investigaciones sobre la supervivencia de *E. coli* y observaron que las cepas STEC O20:H19 y O157:H7 sobrevivieron 71 y 78 días, respectivamente, en agua de bebederos, lo cual es comparable a la supervivencia registrada en la réplica R3 de la cepa P en este estudio. Por su parte, Ding et al. (2018) encontraron que la cepa STEC O157:H7 puede sobrevivir casi dos meses en agua de pozo, con un promedio de aproximadamente 30 días, similar a lo observado para la cepa P en este trabajo. Además, se ha reportado que *E. coli* puede sobrevivir hasta 42 días en aguas superficiales en Nigeria (Adesioye & Ogunjobi, 2013), lo cual también concuerda con los resultados obtenidos en la réplica R2 de la cepa P. En todos estos casos, *E. coli* ha demostrado la capacidad de multiplicarse en estas condiciones ambientales, con tiempos de generación más altos a temperaturas de 18-25°C (Leclerc, 2003).

Es importante señalar que la considerable variabilidad en la persistencia de estos agentes en aguas procede de diferentes fuentes y con diferente contenido de nutrientes y grado de competencia por parte de otros

microorganismos del ecosistema (Avery et al., 2008; Barcina, 1995). En concordancia con los resultados aquí obtenidos, Saima et al. (2021) investigaron la supervivencia de cinco cepas aisladas de *E. coli*, que incluían tres cepas marinas (dos no patogénicas y una EPEC portadora del gen de virulencia *eaeA*), una cepa clínica O157:H7 con los genes de virulencia *vt2* y *eaeA*, y una cepa de laboratorio DH5α (ATCC68362). Estas cepas fueron inoculadas en microcosmos de agua destilada estéril, así como en agua recolectada de río, estanque, mar y estuario, manteniéndose en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente, que oscilaba entre 25 y 35 °C. Los resultados demostraron que las cepas NP ambientales tendieron a sobrevivir mejor, alcanzando hasta 168 días en condiciones de agua dulce, en comparación con las cepas P ambientales, que sobrevivieron un máximo de 91 días.

La mayor supervivencia de la cepa NP comparada con la cepa P en este trabajo de tesis puede atribuirse a diferencias en la adaptabilidad genotípica a las condiciones ambientales de la laguna, incluyendo variabilidad en la utilización de fuentes de carbono y energía, así como genes catabólicos y de protección contra el estrés (van Elsas et al., 2011; Rumball et al., 2023). Se ha demostrado que la supervivencia ambiental está asociada a una amplia variedad de factores genéticos, correspondiendo la mayoría a enzimas del metabolismo y proteínas del transporte (Rumball et al., 2023). Rumball et al. (2023) encontraron que entre los módulos génicos Enriquecidos en las poblaciones supervivientes figuraban la vía de biosíntesis de la betaína, que produce un osmoprotector, y la vía de biosíntesis del GABA (gamma-aminobutirato), que contribuye a la homeostasis del pH y a la versatilidad en el uso de nutrientes. En conjunto, estos resultados demuestran que la flexibilidad genética de esta especie le permite sobrevivir en el ambiente durante largos períodos de tiempo (Rumball et al., 2023). Por su parte, las cepas de *E. coli* también varían en características fenotípicas, como los patrones de utilización de carbono, los perfiles de resistencia a los antibióticos, la motilidad flagelar, la capacidad de formar biopelículas y la capacidad de causar enfermedades (Krumperman et al., 1983; Parveen et al., 1997; Durso et al., 2004; Yang et al., 2004; Anderson et al., 2006). Esto probablemente se deba a mutaciones genéticas y a la adquisición de nuevos genes mediante la transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos o fagos (Ishii & Sadowsky, 2008). *E. coli* es una bacteria heterótrofa que requiere sólo fuentes simples de carbono y nitrógeno, además de fósforo, azufre y otros oligoelementos para su crecimiento. Esta bacteria también puede degradar varios tipos de compuestos aromáticos como el ácido fenilacético y el ácido benzoico, para adquirir energía (Díaz et al., 2001). Además, pueden crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, adaptándose en una variedad de entornos fluctuantes (Ishii & Sadowsky, 2008).

Por otro lado, en varios estudios se ha constatado que la supervivencia prolongada podría verse favorecida por el uso de agua esterilizada para el establecimiento del microcosmos, que carece de otros factores que limiten la supervivencia de *E. coli*, por ejemplo, competencia por recursos limitados, relaciones comensales y

antagónicas con otras poblaciones bacterianas, depredación por protozoos e infección por fagos (Flint, 1987; Winfield & Groisman, 2003; Nautiyal, 2009; El-Leithy et al., 2014). Otra causa de la supervivencia prolongada puede ser la liberación de nutrientes al medio en donde se ha demostrado que la exposición a células muertas favorece el crecimiento de bacterias vivas vecinas (Steinhaus & Birkeland, 1939; Nioh & Furusaka, 1968) y se cree que desempeña un papel clave en la supervivencia de la población de bacterias durante períodos prolongados después de que se agotan otros nutrientes (Zambrano & Kolter, 1996; Zinser & Kolter 1999, 2004; Takano et al., 2017; Schink et al., 2019). Asimismo, Desnues et al. (2003) indicaron que, ante la restricción de nutrientes, las células pierden lentamente la capacidad de reproducirse debido al deterioro oxidativo, pero dependiendo del grado de deterioro, esta puede llegar a restablecerse. La pérdida irreversible de los mecanismos de soporte de la vida bacteriana es consecuencia del incremento de la carbonilación de las proteínas durante el estrés. Sin embargo, solo una fracción de la población sufre inmediatamente estas consecuencias, mientras que el resto se adapta lentamente modificando su expresión de genes (Duffitt et al., 2011). Este proceso aleatorio y progresivo provoca la muerte paulatina de la población a lo largo del tiempo (Polifroni et al., 2014). En concordancia, en este trabajo se observaron diferencias significativas entre los tiempos iniciales y los tiempos finales del ensayo, dado que las cepas experimentaron una disminución en la formación de colonias y en su supervivencia.

En los microcosmos con medio LB, se observó que ambas cepas sobrevivieron entre 84 y 103 días (**Figura 14, Tabla 8**), con un crecimiento muy rápido durante los primeros 2 días, alcanzando un recuento máximo de  $6 \times 10^{10}$  UFC/ml en la cepa NP y  $2 \times 10^{10}$  UFC/ml en la cepa P seguido de un descenso brusco (**Figura 14, Tabla 8**). Esta dinámica poblacional puede explicarse por la disponibilidad de nutrientes de fácil acceso en el medio LB, que son rápidamente consumidos durante los primeros días, pero cuando se reduce su disponibilidad, la población comienza a declinar lentamente (Polifroni et al., 2014). Estos recuentos resaltan que la cepa NP tuvo una mayor abundancia comparada con la cepa P. Esto podría deberse a que como se mencionó anteriormente, la cepa P posee factores de virulencia que representan una carga metabólica adicional (Van Elsas et al., 2011), haciendo que estas cepas sean menos competitivas en comparación con las cepas NP, que no tienen que invertir recursos en la producción de estos factores. También se podría atribuir a una mayor eficiencia de las cepas NP en la utilización de los nutrientes disponibles o a una menor susceptibilidad a cualquier componente estresante del medio.

Las cepas no tuvieron la misma supervivencia en los microcosmos en agua de laguna y en medio LB (**Tabla 8**). Se destaca que la cepa NP en agua de laguna sobrevivió más tiempo que en medio LB, con excepción de la réplica R1 de la cepa NP que sobrevivió 84 días. Este es un hallazgo interesante ya que se esperaba que las cepas sobrevivieran más tiempo en el medio de cultivo, dado que posee los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de *E. coli*. Esto puede deberse a que este medio de amplio espectro permite el crecimiento

de una gran variedad de especies bacterianas (Garboza et al., 2011), lo que puede haber resultado en el crecimiento de otras bacterias y una mayor competencia microbiana y, potencialmente, en la contaminación del cultivo. Esto se reflejó en la absorbancia (**Figura 15**), en los resultados de citometría y en la turbidez de los microcosmos (**Figura 16**).

Es importante tener en cuenta que el tiempo de incubación del medio de cultivo, una vez inoculado, es óptimo hasta 24 horas (Miller, 1972). Este factor podría afectar la supervivencia de las cepas. Por otra parte, *E. coli* cultivada en este medio puede provocar cambios graduales en el pH (como se observó en los resultados de este trabajo) y la disponibilidad de azúcar, afectando así la heterogeneidad celular dentro de las comunidades microbianas y los perfiles de expresión genética de las poblaciones microbianas (Smith et al., 2018) así como la adaptabilidad de las bacterias en su entorno (Sánchez-Clemente et al., 2020).

#### 6.2.2. Absorbancia

En este estudio, se empleó la medición de la densidad óptica ( $DO_{600}$ ) para estimar la concentración bacteriana en los diferentes tratamientos, siguiendo la metodología descrita por Gravel et al. (2017). Esta metodología establece una correlación entre una  $DO_{600}$  de 0,5 y una concentración de  $10^8$  UFC/ml. Sin embargo, en este trabajo se observó que esta relación no se ajustaba a los datos obtenidos en las placas, sugiriendo que la concentración real de bacterias fue superior a la estimada a partir de la  $DO_{600}$ . La discrepancia observada entre la  $DO_{600}$  y la concentración bacteriana real no es un caso aislado. Diversos estudios han reportado limitaciones en la correlación entre  $DO_{600}$  y UFC/ml en diferentes cepas y condiciones de cultivo. Gravel et al. (2017) mencionaron que la relación  $DO_{600}$ -UFC/ml puede variar entre cepas bacterianas debido a diferencias en la composición celular y el tamaño celular. Jin & Zhu (2016) exploraron el impacto de la composición del medio de cultivo en la relación  $DO_{600}$ -UFC/ml. Observaron que la presencia de sustancias dispersantes en el medio puede aumentar la  $DO_{600}$  sin un aumento proporcional en la concentración bacteriana. Wang et al. (2018) investigaron la influencia de las condiciones de crecimiento en la relación  $DO_{600}$ -UFC/ml, y demostraron que cambios en la temperatura o el pH pueden afectar la fisiología bacteriana y, por lo tanto, la dispersión de la luz, alterando la relación entre  $DO_{600}$  y la concentración bacteriana. En esta tesis, la alta concentración de bacterias observada en los diferentes tratamientos, junto con las variaciones en la composición celular y las posibles interferencias del medio de cultivo, podrían explicar la discrepancia entre la  $DO_{600}$  y la concentración bacteriana real.

En los microcosmos se observó una notable disparidad entre las absorbancias correspondientes a los dos medios evaluados, siendo el medio LB el que mostró una mayor absorbancia en comparación con el agua de laguna (**Figura 15A**). En concordancia con Neidhardt & Birch (1989) y Wolfe & Wolfe (2013), la diferencia de absorbancia observada entre los microcosmos de *E. coli* expuestos a medio LB y agua de laguna podría deberse principalmente a dos factores. En primer lugar, puede ser debido a la densidad celular. El medio LB,

al ser más rico en nutrientes, favorece el crecimiento de *E. coli*, lo que se traduce en una mayor cantidad de células en el microcosmos. Esta mayor densidad celular aumenta la dispersión de la luz, resultando en una mayor absorbancia (Neidhardt & Birch, 1989). En segundo lugar, puede ser debido a la producción de metabolitos. *E. coli* produce diversos metabolitos, algunos de los cuales absorben luz en longitudes de onda específicas. La composición del medio de cultivo puede influir en la producción de estos metabolitos, lo que a su vez podría contribuir a las diferencias de absorbancia observadas (Wolfe & Wolfe, 2013).

Asimismo, se observó que las réplicas de las dos cepas en el agua de laguna exhiben absorbancias similares entre sí, con una tendencia ascendente (**Figuras 15 B y C**). Como ya se explicó anteriormente, este aumento en la absorbancia se debe al crecimiento celular, producción de metabolitos y a la muerte celular. Sin embargo, se ha probado que esta última no es la causa principal ya que la muerte celular puede disminuir la absorbancia debido a la desintegración de las células y la pérdida de integridad celular (Wang et al., 2018).

Por otro lado, las réplicas de la cepa P en el medio LB presentan una absorbancia discrepante entre ellas en los últimos tiempos del ensayo, mientras que las réplicas de la cepa NP en el mismo medio muestran absorbancias similares entre sí (**Figuras 15 D y E**). Esto puede deberse a las mutaciones aleatorias pueden generar variabilidad genética dentro de una población bacteriana (Elena & Lenski, 2003; Gutiérrez-Escobar et al., 2019). Las interacciones intercelulares, como la cooperación y la competencia, pueden influir en el crecimiento y la fisiología de las bacterias (Velicer & Lenski, 2009; Xavier et al., 2009), lo que podría explicar las diferencias en la absorbancia observadas entre las réplicas de las cepas NP y P en medio LB.

La correlación negativa entre la abundancia de *E. coli* y la absorbancia (**Figuras 22 - 25**), puede sugerir que, durante la muerte celular, hay ruptura de la membrana citoplasmática que provoca la liberación de material intracelular al medio como proteínas y ADN (Ramírez Agudelo & Rojas López, 2010), lo que incrementa la absorbancia de la luz. Sin embargo, la ausencia de un cultivo puro como se observa en los blancos, sugiere la posibilidad de crecimiento de otros microorganismos que podría contribuir al aumento de la absorbancia. En tal caso, *E. coli* debe competir con los microorganismos por fuentes limitadas de nutrientes y defenderse del antagonismo del medio ambiente (Jang et al., 2017).

### 6.2.3. Citometría de flujo

Para comprender completamente la viabilidad, es necesario establecer herramientas que midan estos parámetros de manera precisa y confiable (Boi et al., 2016). Como se mencionó, el estándar de oro que se utiliza para medir la viabilidad es el cultivo, que es económico y sencillo, pero una herramienta lenta, retrospectiva y binaria (Buysschaert et al., 2016). Por lo tanto, estimar la diferenciación y la heterogeneidad dentro de una población en relación con la viabilidad requiere una combinación de técnicas unicelulares como la citometría, la caracterización molecular o la microscopía (Hastings & Wilson, 1976; Ericsson et al., 2000; Jameson et al., 2003; Cangelosi & Meschke, 2014). En este sentido, la citometría de flujo es una

técnica excelente, ya que ofrece análisis unicelular de varios parámetros de manera de alto rendimiento con velocidad y sensibilidad mejoradas (Buysschaert et al., 2016). En este estudio, se midió la viabilidad de los microcosmos de ambas cepas donde se observó fluctuaciones a lo largo del ensayo (**Figuras 17 y 19**). Se observaron eventos en los blancos, lo que sugiere contaminación con otros microrganismos, lo que probablemente sea la causa de estas fluctuaciones. Además, se describió que, en el medio LB, la réplica R2 de ambas cepas se comportó de manera similar al blanco, lo que indicaría la presencia de microorganismos contaminantes. Esta contaminación pudo ser causada por las condiciones del experimento como el intercambio de oxígeno con la atmósfera, y la realización del ensayo en una atmósfera no estéril o en la manipulación en el flujo de trabajo para la detección de la viabilidad. Debido a esto, no se puede tomar en cuenta estos datos. Por otro lado, se ha utilizado un colorante eFluor Fixable Viability, que normalmente se utilizan en células eucariotas y en un estudio reciente se observó que este tipo de marcador de viabilidad fijable es trasladable para marcar células procariotas. Aunque, este método debe ajustarse dependiendo de las características de las cepas bacterianas y de las técnicas de microbiología utilizadas en el laboratorio (Servain-Viel et al., 2024). No obstante, en este trabajo, se observó una buena performance del colorante, evidenciando su efectividad en el análisis de la viabilidad celular en las cepas estudiadas, lo que sugiere su potencial aplicación en futuros estudios microbiológicos.

Por otra parte, no se observaron correlaciones significativas entre los recuentos en placa y los recuentos de células mediante la citometría de flujo. Si bien, estudios previos mostraron una buena correlación entre la técnica estándar (recuento de placas bacterianas) y la técnica de citometría de flujo en cultivos estériles (Cassoli et al., 2007), la contaminación presente en las muestras pudo interferir en los resultados de citometría. Además, es importante considerar que la técnica de citometría de flujo enumera todas las bacterias contenidas en la muestra, mientras que la técnica estándar (recuento en placas cromogénicas) enumera sólo las bacterias de *E. coli* viables que pueden crecer en las condiciones del medio y de la incubación (Cassoli et al., 2007). En particular, se utilizaron placas Petrifilm 24hs<sup>TM</sup> que poseen un medio de cultivo selectivo y diferencial para *E. coli* (Bird et al., 2020), lo que refuerza la idea de que el recuento en placa solo refleja las bacterias viables de esta especie.

En el futuro, podrían llevarse a cabo ensayos con *E. coli* marcadas con anticuerpos conjugados a fluorocromos o proteínas fluorescentes. Esta técnica permitiría la identificación selectiva de las bacterias de interés sin la necesidad de mantener condiciones estrictas de esterilidad. Asimismo, se podría reemplazar el colorante de viabilidad Efluor<sup>TM</sup> 780 por una metodología cuantitativa basada en el uso de Yoduro de Propidio (PI) y Naranja de Tiazol (TO). La combinación de estos colorantes ofrece la ventaja de diferenciar entre células vivas y muertas: el TO tiñe todas las células, mientras que el PI solo penetra en aquellas que están muertas (Gasol

& del Giorgio, 2000). Además, el uso de microesferas estándar en citometría de flujo permitiría cuantificar con mayor precisión el número de bacterias vivas, muertas y totales (BD Biosciences, 2002), facilitando así la comparación de los recuentos obtenidos mediante técnicas de cultivo en placa.

En este contexto, Banning et al. (2002) investigaron la supervivencia de *E. coli* en aguas subterráneas y efluentes, empleando una combinación de PI, la proteína fluorescente verde (GFP), y la enumeración de colonias. En su estudio, demostraron que la contratinación con PI no interfiere con la fluorescencia emitida por GFP. Además, observaron una correlación estrecha entre el número de *E. coli* viables determinadas mediante tinción con PI y el número de *E. coli* cultivables, lo que respalda la utilidad de este método en estudios de supervivencia bacteriana.

#### 6.2.4. Supervivencia de cepas *E. coli* comerciales y ambientales en microcosmos

En la **Figura 11** se demostró que una cepa comercial proveniente de un aislamiento clínico no sobrevivió en las condiciones del experimento, lo que indica que las cepas ambientales y comerciales difieren en sus mecanismos de crecimiento y supervivencia (Jang et al., 2017). Una de las posibles causas identificadas es la temperatura de los microcosmos. En el tracto intestinal, la temperatura es estable y óptima para el crecimiento de *E. coli* (36-40°C), mientras que la temperatura en el ambiente natural es generalmente más baja (<30°C). Sin embargo, la capacidad de supervivencia y crecimiento de *E. coli* en condiciones de fluctuación de temperatura puede variar según el genotipo (Jang et al., 2017).

El pH también juega un papel crucial. En el experimento, el pH varió de 9 a 9,7 en agua de laguna (**Figura 21A**). Las cepas de *E. coli* comensales son resistentes a los ácidos porque necesitan pasar a través del ambiente de pH bajo del estómago animal/humano para llegar al tracto intestinal (Jang et al., 2017). Por lo tanto, las cepas ambientales de *E. coli* podrían tener una ventaja selectiva en ambientes con pH alcalino.

La concentración de oxígeno disuelto en el agua es otro factor significativo. Valores menores de 5 mg/l pueden estresar la vida acuática y tener un efecto perjudicial sobre los organismos vivos del ecosistema acuático (Momba et al., 2006). En el intestino, las condiciones son anaeróbicas o microaerofílicas, mientras que, en muchos ambientes naturales, las condiciones pueden variar de aeróbicas a anaeróbicas. Por lo tanto, las cepas ambientales de *E. coli* pueden estar mejor adaptadas para crecer y sobrevivir en presencia de oxígeno y manejar el estrés oxidativo asociado.

Además, los componentes químicos vertidos en los sistemas acuáticos superficiales, provenientes de residuos agrícolas, animales y residuales (Marucci et al., 2011), también pueden afectar la supervivencia diferencial. Estos componentes son menos comunes en el ambiente intestinal, lo que podría explicar la menor resistencia de las cepas comerciales.

Las biopelículas formadas por *E. coli* en superficies en ambientes acuáticos son un factor bien conocido que contribuye a la persistencia de *E. coli* en ambientes naturales (Lee et al., 2006). Estas matrices protegen a las bacterias de condiciones ambientales hostiles como la radiación ultravioleta, la desecación, los depredadores protozoarios y productos químicos, incluidos antibióticos y desinfectantes (McDougald et al., 2011). Esta capacidad de formar biopelículas no solo aumenta la supervivencia de *E. coli*, sino que también les proporciona una ventaja competitiva en este entorno.

### 6.3. Análisis de la concentración de nutrientes en los microcosmos con agua de laguna

Se ha documentado una correlación positiva entre la presencia de *E. coli* y los niveles de nutrientes (amonio, PRS, PT) en arroyos urbanos (Surbeck et al., 2010), siendo principalmente los nutrientes solubles (e.g., amonio, fósforo) los que ejercen una influencia positiva sobre el crecimiento y la supervivencia de *E. coli* en estas aguas (Surbeck et al., 2010). Esta asociación sugiere que las bacterias acuáticas pueden utilizar dichos compuestos como nutrientes (Handler et al., 2006; Surbeck et al., 2010). En este estudio, se evaluó la concentración de nutrientes totales y disueltos antes y después de autoclavar el agua de la laguna (**Tabla 2**), así como al finalizar los ensayos de microcosmos realizados con dicha agua (**Tabla 4**). Durante el proceso de autoclave, se liberan nutrientes de algas y otros organismos presentes en la muestra (Suzuki et al., 2019), lo que sugiere que la concentración de nutrientes en el agua autoclavada debe ser igual o superior. Esta tendencia se evidenció en las concentraciones de PT y PRS (**Tabla 2**); sin embargo, en el caso del NKT, se observó lo contrario. Antes de la autoclave, el valor fue de 1,40 mg/l, mientras que tras el tratamiento fue de 1,10 mg/l. Aunque se registraron diferencias, no es posible determinar su significancia estadística debido a la falta de réplicas. Se sospecha que esta discrepancia podría atribuirse a errores en la manipulación de la técnica.

Por otra parte, los resultados evidenciaron un incremento en las concentraciones de nutrientes al finalizar los experimentos (**Tabla 4**) con respecto al agua autoclavada utilizada al inicio (**Tabla 2**). Esto podría atribuirse a que las bacterias descomponen la materia orgánica presente en el agua de laguna (Gocke et al., 2003), liberando nutrientes como fósforo y nitrógeno en formas más solubles. Otra posible causa sería la lisis de las células bacterianas, lo cual conllevaría a un aumento en la liberación de nutrientes intracelulares (Smakman & Hall, 2022) al medio acuático. Adicionalmente, se registró un incremento en la concentración de NTK en las muestras con cepas bacterianas en comparación con el blanco. Este aumento podría deberse a la respiración anaeróbica de las bacterias, en la cual se utilizaron nitratos como aceptores de electrones (Pianetti et al., 2005).

## 6.4. Análisis de las variables físico-químicas en los ensayos de microcosmos

### 6.4.1. pH

Según otros estudios, *E. coli* puede crecer en un amplio rango de pH, desde 4,4 hasta 9,0, con un pH óptimo de 6,0 y 7,0 (Stancik et al., 2002; Matheus et al., 2016). El rango de pH en los microcosmos de agua de laguna fue de 9,04 a 9,69 (**Figura 21A**), superiores al rango óptimo. Se observó que el pH se correlacionaba negativamente con la persistencia de *E. coli* en muestras de agua de laguna (**Figuras 22 y 23**), coincidente a lo obtenido por Pearson et al. (1987) y Ding et al. (2018). El pH del agua puede afectar indirectamente a la comunidad de *E. coli* al cambiar las propiedades físico-químicas del agua, incluida la disponibilidad de nutrientes, la solubilidad de metales catiónicos (por ejemplo, oligoelementos), las características del carbono orgánico (por ejemplo, ácidos orgánicos de bajo peso molecular) y la conductividad eléctrica, que podrían ejercer una influencia más directa sobre la estructura de la comunidad bacteriana (Leclerc et al., 2002). El pH del agua también podría estresar y seleccionar directamente diferentes taxones de bacterias acuosas. Los microbios del agua más sensibles a los cambios de pH pueden morir más rápidamente que los más tolerantes (Cabral, 2010). Los valores extremos de pH pueden suponer un estrés significativo para determinados taxones, mientras que otros pueden tener una mayor tolerancia, como se describe en trabajos relacionados (e.g., Ma et al., 2013). Esto podría respaldar la mayor supervivencia de la cepa NP en los microcosmos con agua de laguna.

Por otra parte, se ha reportado que los coliformes fecales, como *E. coli*, mueren más rápidamente cuando el pH supera los 8,50, incluso en condiciones ricas en nutrientes. Esto sugiere que el pH influye significantivamente en la supervivencia de estas cepas en los sistemas de agua (Pearson et al., 1987).

En la **Figura 21A**, se observó que el pH en los controles positivos de crecimiento en medio LB varió entre 7,30 a 9,28 y que en el último tiempo (T133) decayó a 8,50 en ambas cepas. El medio LB incluye triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio. Estos componentes tienden a mantener un pH más neutro (alrededor de 7,0 a 7,50) cuando se preparan y esterilizan (Garboza et al., 2011). Los dos ingredientes orgánicos del medio Luria-Bertani, ambos digeridos enzimáticos, son ricos en oligopéptidos. *E. coli* tiene varias permeasas de oligopéptidos y peptidasas con una amplia gama de especificidades (Miller, 1996), lo que le permite recuperar aminoácidos libres de muchos oligopéptidos. Los aminoácidos catabolizables recuperados de estos oligopéptidos son las principales fuentes de carbono en el caldo Luria-Bertani, lo que explica la alcalinización del medio durante el crecimiento (Sezonov et al., 2007). Como se ha informado anteriormente, *E. coli* cultivada en medio LB puede generar cambios graduales en el pH y la disponibilidad de azúcar. Estos cambios, a su vez, tienen un impacto significativo en la heterogeneidad celular y los perfiles de expresión genética de las poblaciones microbianas (Smith et al., 2018). Además, algunas bacterias tienen la capacidad de modificar el pH de un medio con amortiguación limitada como el medio LB por los compuestos producidos durante su

crecimiento (Buckman & Buckman, 1991), lo que significa que su pH puede fluctuar más fácilmente con la actividad bacteriana y la producción de metabolitos ácidos o alcalinos. La caída del pH a los 133 días sugiere la acumulación de productos metabólicos ácidos o una disminución en la actividad bacteriana que afecta el equilibrio químico del medio. Se ha demostrado que la toxicidad de los ácidos orgánicos es causada principalmente por la concentración de iones de hidrógeno en el medio, es decir, el pH, y en segundo lugar y el factor más importante, por la acción de la molécula no dissociada (Nyati, 2000; Phan-Thanh et al., 2000). Los ácidos no dissociados pueden penetrar en la célula, reduciendo el pH intracelular y provocando así inhibición (Houtsma et al., 1996).

Por otra parte, se observó que el blanco en este medio tuvo fluctuaciones del pH a lo largo del tiempo, llegando a aumentar de 7,30 a 9,59. En el control se esperaba un pH neutro como se describió anteriormente, sin embargo, aumento a un pH alcalino. Puede deberse a la composición del medio, la triptona y el extracto de levadura pueden descomponerse lentamente, liberando productos que alteren el pH o también puede haber evaporación de agua durante el almacenamiento, aunque mínima, podría concentrar los solutos en el medio LB, alterando su equilibrio químico y elevando el pH. Además, este aumento podría deberse a la contaminación del medio con otras bacterias.

A su vez, se observó que el pH correlacionó negativamente con la abundancia de *E. coli* en medio LB (**Figuras 24 y 25**). Se sabe que *E. coli* no puede crecer cuando el pH externo excede 9 (Neidhardt et al., 1990) ya que puede afectar la función enzimática, la permeabilidad de la membrana, la acumulación de metabolitos tóxicos, la regulación genética y la disponibilidad de nutrientes (Sánchez-Clemente et al., 2020).

#### 6.4.2. Conductividad

La conductividad eléctrica representa la capacidad del agua para conducir una corriente eléctrica, que a su vez está asociada con la concentración de sal total en solución (Kong et al., 2012). La conductividad en el agua se ve afectada por la presencia de sólidos inorgánicos disueltos como aniones cloruro, nitrato, sulfato y fosfato (iones que llevan una carga negativa) o cationes de sodio, magnesio, calcio, hierro y aluminio (iones que llevan una carga positiva) (EPA, 2012). La actividad bacteriana es sensible a los niveles de sal del agua y la salinización del agua dulce puede disminuir la supervivencia de los macroinvertebrados bentónicos y cambiar las comunidades macrobióticas (Kefford et al., 2003; Szöcs et al., 2014; Timpano et al., 2018). En este estudio la conductividad varió de 6500 a 6700 µS/cm en agua de laguna (**Figura 21B**) encontrándose dentro del rango típico para las lagunas de la región (2600 – 7210 µS/cm) (Quiroga, 2020; Schiaffino et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, la alta concentración de sales provoca la disminución de la supervivencia de *E. coli* causando estrés hiperosmótico y la inactivación de procesos celulares cruciales (Troussellier et al., 1998), lo que puede llevar a una disminución en su viabilidad y reproducción (DeVilbiss et al., 2021).

Por otra parte, las cepas pueden tener diferentes tolerancias a las condiciones de alta conductividad. Esto se evidencia en el hecho de que la cepa NP aumentó al final del ensayo y tuvo una mayor supervivencia (**Figura 21B**). Se observó que la conductividad de las cepas varió entre 18400 y 24000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en medio LB. El medio LB es rico en nutrientes (Garboza et al., 2011) y puede tener una alta conductividad inicial debido a su composición iónica (sales, extracto de levadura, triptona).

Las bacterias también liberan diversos metabolitos y productos de desecho (Sezonov et al., 2007), algunos de los cuales son iónicos y pueden incrementar la conductividad. El hecho de que los valores de conductividad en los microcosmos con *E. coli* sean ligeramente más altos en su máximo (24000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) en comparación con el blanco (23100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) sugiere que la actividad bacteriana introduce una variabilidad adicional en la composición iónica del medio.

En ambos medios, se observó que la conductividad se correlacionó negativamente con la abundancia de las cepas de *E. coli* (**Figuras 22 - 25**). Esto concuerda con He et al. (2007), quienes informaron que los altos niveles de conductividad en la corriente de agua superficial proporcionan una alta concentración de sal que inhibe el crecimiento bacteriano o incluso daña los microorganismos. Además, puede deberse a factores ya mencionados como la liberación de iones durante el metabolismo celular que aumentan la conductividad, pero también crean un ambiente inhóspito. Este aumento puede causar estrés osmótico, inhibiendo el crecimiento bacteriano (Troussellier et al., 1998). Además, la producción de sustancias tóxicas o inhibidoras como subproductos del metabolismo puede acumularse en el medio, afectando negativamente el crecimiento bacteriano.

## 7. CONCLUSIÓN

- Se demostró que las dos cepas no solo sobrevivieron en estos entornos acuáticos, sino que pudieron multiplicarse. Asimismo, la cepa NP de *E. coli* pudo adaptarse y reproducirse con más facilidad.
- Ambas cepas tuvieron la capacidad de sobrevivir y reproducirse en un medio nutricionalmente rico, aunque esta capacidad se vio restringida dentro de un período de tiempo determinado.
- La persistencia de las cepas en los ambientes acuáticos destaca la importancia del monitoreo y control de *E. coli* y cuestionan su uso como indicador de la contaminación fecal ambiental. En la medida en que las FIB crezcan en el medio ambiente, probablemente tendrán poco valor como centinelas de la contaminación fecal o como predictor de enfermedades transmitidas por agua de uso recreativo.
- La cepa comercial no sobrevivió en las condiciones del experimento, lo que indica que las cepas ambientales y comerciales difieren en sus mecanismos de supervivencia.
- La SGC permitió la identificación detallada de los genes de virulencia, serotipos y genes de resistencia a antimicrobianos de la cepa P, confirmando su género y especie. Sin embargo, para identificar

diferencias genómicas y deducir genes que podrían estar involucrados en la supervivencia, se recomienda secuenciar el genoma completo de la cepa NP y la cepa comercial pertenece a un aislamiento clínico testeada.

- La laguna El Carpincho, caracterizada como hipereutrófica, proporciona un entorno rico en nutrientes que favorece la supervivencia de *E. coli*. La esterilización del agua antes del ensayo también liberó nutrientes adicionales, contribuyendo a un ambiente aún más propicio para el crecimiento bacteriano.
- La concentración de nutrientes, el pH y la conductividad del agua de laguna estuvieron relacionados con la abundancia de *E. coli* en los microcosmos de agua de laguna.
- La citometría de flujo y la estimación de la concentración bacteriana DO<sub>600</sub> demostraron ser métodos complementarios, aunque subóptimos para cuantificar la abundancia de *E. coli* debido a su falta de selectividad para esta bacteria.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

3M Science Applied to Life™ (2019). *Guía interpretativa de la Placa de recuento rápido de coliformes/E. coli 3M Petrifilm™*. 3M Science Applied to Life™.

Adamovich, B. V., Zhukova, T. V., Mikheeva, T. M., Kovalevskaya, R. Z. & Luk'yanova E. V. (2016). Long-term variations of the trophic state index in the Narochanskie Lakes and its relation with the major hydroecological parameters. *Water Resources*, 43(5), 809-817.  
<https://doi.org/10.1134/S009780781605002X>

Adator, E. H., Cheng, M., Holley, R., McAllister, T., & Narvaez-Bravo, C. (2018). Ability of Shiga toxigenic *Escherichia coli* to survive within dry-surface biofilms and transfer to fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 269, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.014>

Adesioye, F. A., & Ogunjobi, A. A. (2013). Comparative study of persistence of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., and *Shigella* sp. in different water samples stored under various storage conditions. *World Applied Sciences Journal*, 26(2), 181-188. <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.26.02.7613>

Ager, D., Evans, S., Li, H., Lilley, A. K., & Van Der Gast, C. J. (2010). Anthropogenic disturbance affects the structure of bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 12(3), 670-678.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02107.x>

Akinrinade, O. (2016). Bioinformatic and Genomic Approaches to Study Cardiovascular Diseases. Tesis doctoral. University of Helsinki. Faculty of Medicine. Archivo digital de la Universidad de Helsinki. <https://helda.helsinki.fi/>

Allard, M. W., Bell, R., Ferreira, C. M., Gonzalez-Escalona, N., Hoffmann, M., Muruvanda, T., Ottesen, A., Ramachandran, P., Reed, E., Sharma, S., Stevens, E., Timme, R., Zheng, J., & Brown, E. W. (2018). Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety. *Current opinion in Biotechnology*, 49, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.002>

Allende, L., Tell, G., Zagarese, H., Torremorell, A., Pérez, G., Bustingorry, J., Escaray, R., & Izaguirre, I. (2009) Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganicturbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia*, 624, 45–60. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9665-9>

Alsharif, R., & Godfrey, W. (2002). Bacterial detection and live/dead discrimination by flow cytometry. *Microbial Cytometry Application Note*. BD Biosciences, Immunocytometry Systems.

Altayb, H. N., Elbadawi, H. S., Alzahrani, F. A., Baothman, O., Kazmi, I., Nadeem, M. S., Hosawi, S., & Chaieb, K. (2022). Co-Occurrence of β-Lactam and Aminoglycoside Resistance Determinants among Clinical and Environmental Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: A Genomic Approach. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(8), 1011. <https://doi.org/10.3390/ph15081011>

Aminov, R.I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2(JULY), 11234. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00158/BIBTEX>

Anderson, M. A., Whitlock, J. E., & Harwood, V. J. (2006). Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 6914–6922. <https://doi.org/10.1128/AEM.01029-06>

Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. *Nature reviews. Microbiology*, 8(4), 260–271. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319>

Andersson, D.I., Patin, S.M., Nilsson, A.I. & Kugelberg, E. (2007) The biological cost of antibiotic resistance. *Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics*, 8, 339–348. <https://doi.org/10.1128/9781555815615.ch21>

APHA (American Public Health Association). (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. America Publication Health Association, Washington D.C.

APHA (American Public Health Association). (2005). Standard Methods for the examination of waters and wastewater, 21a Ed. APHA, Washington. D.C

Ashbolt, N., Grabow, W. O., & Snozzi, M. (2001). Indicators of microbial water quality. In L. Fewtrell & J. Bartram (Eds.), *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. World Health Organization and IWA Publishing.

Avery, L. M., Williams, A. P., Killham, K., & Jones, D. L. (2008). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal-drinking troughs. *The Science of the Total Environment*, 389(2-3), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.049>

Ayukekbong, J. A., Ntemgwa, M., & Atabe, A. N. (2017). The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6, 47. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0208-x>

Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10(3), 257-263. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226125534-024>

Bai, X., Fu, S., Zhang, J., Fan, R., Xu, Y., Sun, H., He, X., Xu, J., & Xiong, Y. (2018). Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype. *Scientific Reports*, 8(1), 6756. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25233-x>

Banning, N., Toze, S., & Mee, B. J. (2002). *Escherichia coli* survival in groundwater and effluent measured using a combination of propidium iodide and the green fluorescent protein. *Journal of applied microbiology*, 93(1), 69–76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01670.x>

Barbau-Piednoir, E., Denayer, S., Botteldoorn, N., Dierick, K., De Keersmaecker, S. C. J., & Roosens, N. H. (2018). Detection and discrimination of five *Escherichia coli* pathotypes using a combinatory SYBR® Green qPCR screening system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3267–3285. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8820-0>

Barcina, I. (1995). Survival strategies of enteric bacteria in aquatic systems. *Microbiología (Madrid, Spain)*, 11(3), 389–392.

BD Biosciences (2002). *Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry*. BD Biosciences.

Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>

- Bell, R. L., Kase, J. A., Harrison, L. M., Balan, K. V., Babu, U., Chen, Y., Macarisin, D., Kwon, H. J., Zheng, J., Stevens, E. L., Meng, J., & Brown, E. W. (2021). The Persistence of Bacterial Pathogens in Surface Water and Its Impact on Global Food Safety. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1391. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111391>
- Bergstein-Ben Dan, T., Wynne, D., & Manor, Y. (1997). Survival of enteric bacteria and viruses in Lake Kinneret, Israel. *Water Resources*, 31(11), 2755–2760. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00135-8)
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., & Petit, F. (2013). Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4684–4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.00698-13>
- Berthe, T., Touron, A., Leloup, J., Deloffre, J., & Petit, F. (2008). Faecal-indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mudflats (Seine, France). *Marine Pollution Bulletin*, 57(1-5), 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.10.013>
- Beutin, L., Kaulfuss, S., Herold, S., Oswald, E., & Schmidt, H. (2005). Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:1552-1563. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.4.1552-1563.2005>
- Bianchelli, J. (2021). Dinámica temporal de *Legionella* SP. (Proteobacteria, *Legionellaceae*) en la Laguna El Carpincho (Junín, Provincia de Buenos Aires). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Bianchi, V., Varela, P., Flores, D., & Durando, P. (2014). Evaluación de *Escherichia coli* resistente a antibióticos como especie bioindicadora de contaminación fecal en agua y peces en la cuenca inferior del Río San Juan. *Natura Neotropicalis*, 45(1), 45-69. <https://doi.org/10.14409/natura.v1i45.4357>
- Bianco, M. R. (1998). El río Quinto Salado del sur. Aportes para su mejor conocimiento.
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kérourédan, M., Ferré, F., Dilasser, F., Peytavin de Garam, C., Cartier, P., Oswald, E., Gay, E., Auvray, F., & Brugère, H. (2015). Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1397–1405. <https://doi.org/10.1128/AEM.03315-14>

- Bird, P., Bastin, B., Klass, N., Crowley, E., Agin, J., Goins, D., Bakken, H., Lingle, C., & Schumacher, A. (2020). Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ Rapid E. coli/Coliform Count Plate for the enumeration of *Escherichia coli* and coliforms: Collaborative study, first action: 2018.13. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 103(2), 513–522. <https://doi.org/10.1093/jaocint/qsz013>
- Blaustein, R. A., Pachepsky, Y., Hill, R. L., Shelton, D. R., & Whelan, G. (2013). *Escherichia coli* survival in waters: temperature dependence. *Water Research*, 47(2), 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.027>
- Boi, P., Amalfitano, S., Manti, A., Semprucci, F., Sisti, D., Rocchi, M. B., Balsamo, M., & Papa, S. (2016). Strategies for water quality assessment: a multiparametric analysis of microbiological changes in river waters. *River Research and Applications*, 32(3), 490–500. <https://doi.org/10.1002/rra.2872>
- Boletín Integrado de Vigilancia Nº 463-SE 34/2019. (2019). Ministerio de Salud y Desarrollo Social. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv\\_463\\_cuatrimestral.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_463_cuatrimestral.pdf)
- Buckman, S. J., & Buckman, J. D. (1991). Microbiología. En J. P. Casey (Comp.), *Pulpa y papel, química y tecnología química* (Vol. 2). LIMUSA. México.
- Bustamante, A. V., Sanso, A. M., Parma, A. E., & Lucchesi, P. M. A. (2012). Subtyping of STEC by MLVA in Argentina. *Frontiers in Microbiology*, 2, 111. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2012.00111/BIBTEX>
- Buysschaert, B., Byloos, B., Leys, N., Van Houdt, R., & Boon, N. (2016). Reevaluating multicolor flow cytometry to assess microbial viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21), 9037–9051. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7837-5>
- Byappanahalli, M. N., Whitman, R. L., Shively, D. A., Sadowsky, M. J., & Ishii, S. (2006). Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environmental Microbiology*, 8(3), 504–513. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00916.x>
- Cabral J. P. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Cangelosi, G. A., & Meschke, J. S. (2014). Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 5884–5891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01763-14>
- Cantet, F., Hervio-Heath, D., Caro, A., Le Mennec, C., Monteil, C., Quéméré, C., Jolivet-Gougeon, A., Colwell R. R., & Monfort, P. (2013). Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio*

*cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. *Research in Microbiology*, 164(8), 867-874. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.06.005>

Carvalho, P., Thomaz, S. M., & Bini, L. M. (2003). Effects of water level, abiotic and biotic factors on bacterioplankton abundance in lagoons of a tropical floodplain (Paraná River, Brazil). *Hydrobiologia*, 510(1), 67-74. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000008532.71152.38>

Cassoli, L. D., Machado, P. F., De Oliveira Rodrigues, A. C., & Coldebella, A. (2007). Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count. *International Journal of Dairy Technology*, 60(1), 44-48. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00297.x>

Chekabab, S. M., Paquin-Veillette, J., Dozois, C. M., & Harel, J. (2013). The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiology Letters*, 341(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12078>

Clark, J. A., & el Shaarawi, A. H. (1993). Evaluation of commercial presence-absence test kits for detection of total coliforms, *Escherichia coli*, and other indicator bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 380–388. <https://doi.org/10.1128%2Faem.59.2.380-388.1993>

Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., & Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes*, 3(2), 71–87. <https://doi.org/10.4161/gmic.19182>

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>

Conover, W. J. (1999). *Practical Nonparametric Statistics* (3rd ed.). Wiley, New Jersey.

Conzonno, V. H., & Claverie, E. F. (1990). Chemical characteristics of the water of Chascomús Pond (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Limnological implications. *Revista Brasilera de Biología*, 50(1), 15-21.

Cooper, V. S., & Lenski, R. E. (2000). The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature*, 407(6805), 736–739. <https://doi.org/10.1038/35037572>

Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2009). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>

- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Włodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Dang, S. T. T., & Dalsgaard, A. (2012). *Escherichia coli* contamination of fish raised in integrated pig-fish aquaculture systems in Vietnam. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1317-1319. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-501>
- Daza Pérez, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22, 57-67.
- De Mello Santos, A. C., Fernandes Santos, F., Silva, N., Rocha, L. B., Ladeira, R. M., Reis, S. F., & Elias, W. P. (2020). Diversity of hybrid- and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 339. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>
- Deekshit, V. K., & Srikumar, S. (2022). 'To be, or not to be'-The dilemma of 'silent' antimicrobial resistance genes in bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 133(5), 2902–2914. <https://doi.org/10.1111/jam.15738>
- Desnues, B., Cuny, C., Grégori, G., Dukan, S., Aguilaniu, H., & Nyström, T. (2003). Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO reports*, 4(4), 400–404. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.embor799>
- DeVilbiss, S. E., Steele, M. K., Krometis, L. A. H., & Badgley, B. D. (2021). Freshwater salinization increases survival of *Escherichia coli* and risk of bacterial impairment. *Water Research*, 191, 116812. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116812>
- Dias, D., Costa, S., Fonseca, C., Baraúna, R., Caetano, T., & Mendo, S. (2022). Pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from wildlife: Should we care?. *Science of The Total Environment*, 812, 152324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152324>
- Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, M. A., & García, J. L. (2001). Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 65(4), 523–569. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.523-569.2001>

- Ding, M., Li, J., Liu, X., Li, H., Zhang, R., & Ma, J. (2018). Exploring links between water quality and *Escherichia coli* O157:H7 survival potential in well waters from a rural area of southern Changchun City, China. *Journal of Water and Health*, 16(2), 300–310. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.162>
- Djordjevic, S. P., Jarocki, V. M., Seemann, T., Cummins, M. L., Watt, A. E., Drigo, B., Wyrsch, E. R., Reid, C. J., Donner, E., & Howden, B. P. (2024). Genomic surveillance for antimicrobial resistance - a One Health perspective. *Nature Reviews Genetics*, 25(2), 142–157. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00649-y>
- Douëllou, T., Delannoy, S., Ganet, S., Fach, P., Loukiadis, E., Montel, M. C., & Sergentet-Thevenot, D. (2017). Molecular characterization of O157:H7, O26:H11 and O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 253, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.010>
- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., & Benade, S. (2011). Virulence factors and antibiotic susceptibility among verotoxic non O157: H7 *Escherichia coli* isolates obtained from water and wastewater samples in Cape Town, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 10(64). <https://doi.org/10.5897/AJB11.1534>
- Dublan, M. A., & Galizio, R. I. (2020). El agente causal principal del SUH es un grupo de *Escherichia coli* capaces de producir toxina Shiga, conocidas como STEC (*E. coli* shigatoxigénicas). En Dossier-Síndrome-Uremico-Hemolítico-2020 (pp. 1-10). FAA.
- Duffitt, A. D., Reber, R. T., Whipple, A., & Chauret, C. (2011). Gene Expression during Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Soil and Water. *International Journal of Microbiology*, 2011, 340506. <https://doi.org/10.1155/2011/340506>
- Dufour, A. P. (1984). Health effects criteria for fresh recreational waters: Cincinnati, Ohio, U.S. Environmental Protection Agency, EPA. 600/1-84-004, 33pp.
- Durso, L. M., Smith, D., & Hutkins, R. W. (2004). Measurements of fitness and competition in commensal *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6466–6472. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6466-6472.2004>
- Edberg, S. C., Allen, M. J., & Smith, D. B. (1991). Defined substrate technology method for rapid and specific simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from water: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 74(3), 526–529. <https://doi.org/10.1093/jaoac/74.3.526>

- Eklund, M., Scheutz, F., & Siitonen, A. (2001). Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 39:2829-2834. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.8.2829-2834.2001>
- Elena, S. F., & Lenski, R. (2003). Evolution experiments with bacteria: The long-term effects of selection. *Evolution*, 57(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8246.2003.t01-1-00001.x>
- El-Leithy, M.A., El-Shatoury, E.H., Abou-Zeid, M.A., Hemdan, B.A., Samhan, F.A., & El-Taweel, G.E. (2014). Survival of enterotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 strains in different water sources. *International Journal of Environment*, 3, 212–220.
- El-Shafai, S. A., Gijzen, H. J., Nasr, F. A., & El-Gohary, F. A. (2004). Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. *Environmental Research*, 95(2), 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.01.002>
- EPA. Environmental Protection Agency. (2012). Water: Monitoring & Assessment. U.S. EPA, Washington DC.
- Ericsson, M., Hanstorp, D., Hagberg, P., Enger, J., & Nyström, T. (2000). Sorting out bacterial viability with optical tweezers. *Journal of Bacteriology*, 182(19), 5551–5555. <https://doi.org/10.1128/JB.182.19.5551-5555.2000>
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., & Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 190-212. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>
- Fermani, P., Torremorell, A., Lagomarsino, L., Escaray, R., Unrein, F., & Pérez, G. (2015). Microbial abundance patterns along a transparency gradient suggest a weak coupling between heterotrophic bacteria and flagellates in eutrophic shallow Pampean lakes. *Hydrobiologia*, 752(1), 103-123. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2019-x>
- Fernandez, C., Salerno, C. M., Paoloni, J. D., & Laurent, G. C. (2007). Water quality in a lagoon in the southeast pampa region of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 39, 51-56. <http://www.scielo.org.ar/img/revistas/ram/v39n1/html/v39n1a13.htm>
- Flint K. P. (1987). The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *The Journal of Applied Bacteriology*, 63(3), 261–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb04945.x>

Florentino Lopez, O. C., Duverne, L. B., Mazieres, J. O., & Salibián, A. (2013). Microbiological pollution of surface water in the upper-middle basin of the Reconquista river (Argentina): 2010–2011 monitoring. *International Journal of Environment and Health*, 6:3, 276-289. <https://doi.org/10.1504/IJENHVH.2013.054087>

Fujioka, R. S., & Byappanahalli, M. N. (2003). Proceedings and report: tropical water quality indicator workshop, SR-2004-01, p. 1-95. University of Hawaii, Water Resources Research Center, Honolulu, Hawaii. [Online.] <http://www.wrcc.hawaii.edu/tropindworkshop.html>

Gabellone, N. A., Claps, M. C., Solari, L. C., & Neschuk, N. C. (2005). Nutrients, conductivity and plankton in a landscape approach to a Pampean saline lowland river (Salado River, Argentina). *Biogeochemistry*, 75(3), 455–477. <https://doi.org/10.1007/s10533-005-3273-9>

Gallinat, A. S., Primack, R. B., & Wagner, D. L. (2015). Autumn, the neglected season in climate change research. *Trends in ecology & evolution*, 30(3), 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.01.004>

Garboza, F., Frontado, R., Noguera, N., Ávila, H., Ojeda, L., Ramírez, N., Triana, J., & Triana, F. (2011). Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(2), 138-143.

García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J., & Blanch, A. R. (2005). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiology Letters*, 246(1), 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.038>

García-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J., & Blanch, A. R. (2004). Prevalence of the *stx<sub>2</sub>* gene in coliform populations from aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3535–3540. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3535-3540.2004>

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*, 51(supl.3), 422-430. <https://doi:10.2114/spm.51supl3.09422>

Gasol, J. M., & del Giorgio, P. A. (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 64, 197-224.

Geraldi, A. M., Piccolo, M. C., Perillo, G. M. E. (2011). El rol de las lagunas bonaerenses en el paisaje pampeano. *Ciencia Hoy*, 21(123), 9-14.

- Gharibi, H., Sowlat, M. H., Mahvia, A. H., Mahmoudzadeh, H., Arabalibeik, H., Keshavarz, M., Karimzadeh, N., & Hassani, G. (2012). Development of a dairy cattle drinking water quality index (DCWQI) based on fuzzy inference systems. *Ecoogical Indicators*, 20, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.02.015>
- Gocke, K., Mancera Pineda, J. E., & Vallejo, A. (2003). Heterotrophic microbial activity and organic matter degradation in coastal lagoons of Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 51(1), 85-98.
- Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., Ferreira, L. C., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47 Suppl 1(Suppl 1), 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gravel, J., Paradis-Bleau, C., & Schmitzer, A. R. (2017). Adaptation of a bacterial membrane permeabilization assay for quantitative evaluation of benzalkonium chloride as a membrane-disrupting agent. *MedChemComm*, 8(7), 1408–1413. <https://doi.org/10.1039/c7md00113d>
- Gravel, R. A., Chaput-Molinier, L., عفريت, M., & Tran, H. N. (2017). Rapid and accurate estimation of bacterial growth using spectrophotometry. *Journal of Microbiology and Methods*, 140, 17-20. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.004>
- Guo, S., Tay, M. Y. F., Aung, K. T., Seow, K. L. G., Ng, C. L., Purbojati, R. W., Drautz-Moses, D. I., Schuster, S. C., & Schlundt, J. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from ready-to-eat food in Singapore using disk diffusion, broth microdilution and whole genome sequencing methods. *Food Control*, 99, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.043>
- Gutiérrez-Escobar, M., García-Fernández, J. M., Gil-Ortiz, M., & Ramos, J. L. (2019). Random mutations and the evolution of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2159. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02159>
- Guzmán, M. C., Bistoni, M., Tamagnini, L. M., & González, R. D. (2004). Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. *Water Research*, 38(9), 2368-2374. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.02.016>
- Hamilton, M. J., Hadi, A. Z., Griffith, J. F., Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2010). Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. *Water Research*, 44(18), 5463–5473. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.058>

- Handler, N. B., Paytan, A., Higgins, C. P., Luthy, R. G. & Boehm, A. B. (2006). Human development is linked to multiple water body impairments along the California coast. *Estuaries and Coasts: J ERF*, 29, 860–87. <https://doi.org/10.1007/BF02786537>
- Hastings, J., & Wilson, T. (1976). Bioluminescence and chemiluminescence. *Photochemistry and Photobiology*, 23(6), 461-473. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1976.tb07282.x>
- He, L., Lu, J., & Shi, W. (2007). Variability of fecal indicator bacteria in flowing and ponded waters in southern California: implications for bacterial TMDL development and implementation. *Water Research*, 41 14, 3132-40. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.014>
- Heinikainen, S., Pohjanvirta, T., Eklund, M., Siitonen, A., & Pelkonen, S. (2007). Tracing shigatoxigenic *Escherichia coli* O103, O145, and O174 infections from farm residents to cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11), 3817-3820. <https://doi.org/10.1128/JCM.00198-07>
- Hilt, E. E., & Ferrieri, P. (2022). Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. *Genes*, 13(9), 1566. <https://doi.org/10.3390/genes13091566>
- Houtsma, P. C., Kant-Muermans, M. L., Rombouts, F. M., & Zwietering, M. H. (1996). Model for the combined effects of temperature, pH, and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and Bologna-type sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1616–1622. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1616-1622.1996>
- Instituto Nacional del Agua. (2012). Evaluación de las inundaciones y las obras de drenaje en la cuenca del Salado (Prov. Buenos aires) mediante modelación numérica. Proyecto LHA, 331.
- Ishii, S., & Sadowsky, M.J. (2008). *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*, 23(2), 101–108. <https://doi.org/10.1264/JSME2.23.101>
- Ishii, S., Ksoll, W. B., Hicks, R. E., & Sadowsky, M. J. (2006). Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 612–621. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.612-621.2006>
- Ishii, S., Yan, T., Vu, H., Hansen, D. L., Hicks, R. E., & Sadowsky, M. J. (2010). Factors Controlling Long-Term Survival and Growth of Naturalized *Escherichia coli* Populations in Temperate Field Soils. *Microbes and Environments*, 25(1), 8–14. <https://doi.org/10.1264/JSME2.ME09172>
- Jameson, D. M., Croney, J. C., & Moens, P. D. (2003). Fluorescence: basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. *Methods in Enzymology*, 360, 1–43. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(03\)60105-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(03)60105-9)

- 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>
- Jin, H., & Zhu, X. (2016). Optical properties of microbial cell suspensions and their applications in microbial ecology and biogeochemistry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 232, 31-48. <https://doi.org/10.1016/j.colins.2016.03.007>
- Kaper, J., Nataro, J., & Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karama, M., Johnson, R. P., Holtslander, R., & Gyles, C. L. (2008). Phenotypic and genotypic characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* O103: H2 isolates from cattle and humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), 3569-3575. <https://doi.org/10.1128/jcm.01095-08>
- Karmali, M. A., Gannon, V., & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., & Kaper, J. B. (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 4930–4940. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.4930-4940.2003>
- Keifford, B. J., Papas, P. J., & Nugegoda, D. (2003). Relative salinity tolerance of macroinvertebrates from the Barwon River, Victoria, Australia. *Marine and Freshwater Research*, 54, 755-765. <https://doi.org/10.1071/MF02081>
- Kekre, M., Arevalo, S. A., Valencia, M. F., Lagrada, M. L., Macaranas, P. K. V., Nagaraj, G., Oaikhena, A. O., Olorosa, A. M., Aanensen, D. M., & NIHR Global Health Research Unit on Genomic Surveillance of Antimicrobial Resistance (2021). Integrating Scalable Genome Sequencing Into Microbiology Laboratories for Routine Antimicrobial Resistance Surveillance. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(Suppl\_4), S258–S266. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab796>
- Khan, M. M. T., Pyle, B. H., & Camper, A. K. (2010). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable Gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10), 5088-5096. <https://doi.org/10.1128/AEM.02932-09>

Kime, L., Randall, C. P., Banda, F. I., Coll, F., Wright, J., Richardson, J., Empel, J., Parkhill, J., & O'Neill, A. J. (2019). Transient silencing of antibiotic resistance by mutation represents a significant potential source of unanticipated therapeutic failure. *mBio*, 10(5), e01755-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01755-19>

Kong, P., Lea-Cox, J. D., & Hong, C. X. (2012). Effect of electrical conductivity on survival of *Phytophthora alni*, *P. kernoviae* and *P. ramorum* in a simulated aquatic environment. *Plant pathology*, 61(6), 1179-1186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02614.x>

Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jenkins, C., Malorny, B., Ribeiro Duarte, A. S., Torpdahl, M., da Silva Felício, M. T., Guerra, B., Rossi, M., & Herman, L. (2019). Scientific Opinion on the whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms. *EFSA Journal*, 17(12), 5898. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5898>

Krumperman P. H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 165–170. <https://doi.org/10.1128/aem.46.1.165-170.1983>

Kudva, I. T., Blanch, K., & Hovde, C. J. (1998). Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3166–3174. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3166-3174.1998>

Kumar, S., Tripathi, V. R., & Garg, S. K. (2012). Physicochemical and microbiological assessment of recreational and drinking waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 2691–2698. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2144-1>

Lacher, D. W., Gangiredla, J., Patel, I., Elkins, C. A., & Feng, P. C. (2016). Use of the *Escherichia coli* Identification Microarray for Characterizing the Health Risks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Foods. *Journal of Food Protection*, 79(10), 1656–1662. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-176>

Leclerc, H. (2003). Relationships between common water bacteria and pathogens in drinking water. En J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker, & A. Glasmacher (Eds.), *Heterotrophic plate counts and drinking water safety: The significance of HPCs for water quality and human health* (Cap. 6, pp. 80–118). IWA Publishing.

- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., & Dei-Cas, E. (2002). Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 371–409. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046768>
- Lee, C. M., Lin, T. Y., Lin, C. C., Kohbodi, G. A., Bhatt, A., Lee, R., & Jay, J. A. (2006). Persistence of fecal indicator bacteria in Santa Monica Bay beach sediments. *Water Research*, 40(14), 2593–2602. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.032>
- Lienau, E. K., Strain, E., Wang, C., Zheng, J., Ottesen, A. R., Keys, C. E., Hammack, T. S., Musser, S. M., Brown, E. W., Allard, M. W., Cao, G., Meng, J., & Stones, R. (2011). Identification of a salmonellosis outbreak by means of molecular sequencing. *The New England Journal of Medicine*, 364(10), 981–982. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1100443>
- Lillebø, A. I., Teixeira, H., Morgado, M., Martínez-López, J., Marhubi, A., Delacámarra, G., Strosser, P., & Nogueira, A. J. A. (2019). Ecosystem-based management planning across aquatic realms at the Ria de Aveiro Natura 2000 territory. *The Science of the Total Environment*, 650(Pt 2), 1898–1912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.317>
- Ma, J., Ibekwe, A. M., Yang, C. H., & Crowley, D. E. (2013). Influence of bacterial communities based on 454-pyrosequencing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(3), 542–554. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12083>
- Maal-Bared, R., Bartlett, K. H., Bowie, W. R., & Hall, E. R. (2013). Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. *Science of the Total Environment*, 443, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.106>
- Maizels, P., Etchepare, E., Chornomaz, E., Bustingorry, J., Escaray, R., & Conzonno, V. H. (2003). Parámetros abióticos y biomasa planctónica en la Laguna Chascomús (Provincia de Buenos Aires). *Biología Acuática*, 20, 6–11. <https://revistas.unlp.edu.ar/bacuatica/article/view/6800>
- Mardis E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>
- Marker, A. F. H., Nusch, A., Rai, H., & Riemann, B. (1980). The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Archiv für Hydrobiologie Beihefte Ergebnisse Limnology*, 14: 91–106.

- Marucci, P. L., Olivera, N. L., Brugnoni, L. I., Sica, M. G., & Cubitto, M. A. (2011). The occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bathing water of the Sierra de la Ventana region, Buenos Aires Province, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 175(1-4), 1–8.  
<https://doi.org/10.1007/s10661-010-1488-2>
- Massicotte, R., Mafu, A. A., Ahmad, D., Deshaies, F., Pichette, G., & Belhumeur, P. (2017). Comparison between Flow Cytometry and Traditional Culture Methods for Efficacy Assessment of Six Disinfectant Agents against Nosocomial Bacterial Species. *Frontiers in Microbiology*, 8, 112.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00112>
- Matheus, P., Ramírez, E., Araque, J., Belandria, O., & Durán, J. (2016). Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta como una herramienta para estudiar el crecimiento de las cepas ATCC 25922 y ATCC 35218 de *Escherichia coli*. *Acta Bioclínica*, 6(11), 44-59.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2011). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- McGee, P., Bolton, D. J., Sheridan, J. J., Earley, B., Kelly, G., & Leonard, N. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 706–713. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01752.x>
- Miliwebsky, E., Deza, N., Zolezzi, G., Baschkier, A., Carbonari, C., Manfredi, E., D'Astek, B., Chinen, B., & Rivas, M. (2019). *Manual de procedimientos: Escherichia coli productor de toxina Shiga en el marco de la detección de E. coli diarreigénico*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: ANLIS Dr. C. G. Malbrán. (ANLIS/INEI/MPY ARG; 2019). <http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/1682>
- Miller, C. G. (1996). Protein degradation and proteolytic modification. En F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, & H. E. Umbarger (Eds.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (pp. 938–954). ASM Press. Washington, D.C.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miretzky, P. S. (2001). Procesos geoquímicos en la Cuenca baja del río Salado, provincia de Buenos Aires. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. <https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/>

- Moe, C.L. (2002). Waterborne transmission of infectious agents, in Hurst, C.J. (Eds.), Manual of environmental microbiology (2d ed., pp. 184–204). ASM Press.
- Mohamed Hatha, A. A., Jabir, T., Akhil Prakash, E., & Krishnan, K. P. (2021) Microcosm studies on the survival of *Escherichia coli* in the Kongsfjorden, an Arctic fjord. *Polar Science*, 30:100722. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2021.100722>
- Momba, M.N.B., Osode, A.N., & Sibewu, M. (2006). The impact of inadequate wastewater treatment on the receiving water bodies-case study: Buffalo City and Nkokonbe Municipalities of the Eastern Cape Province. *Water SA*, 32:5, 787 <https://doi.org/10.4314/wsa.v32i5.47854>
- Muniesa, M., & Jofre, J. (1998). Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2443–2448. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2443-2448.1998>
- Muniesa, M., Lucena, F., & Jofre, J. (1999). Comparative survival of free shiga toxin 2-encoding phages and *Escherichia coli* strains outside the gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5615–5618. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5615-5618.1999>
- Mylius, M., Dreesman, J., Pulz, M., Pallasch, G., Beyerer, K., Claußen, K., Allerberger, F., Fruth, A., Lang, C., Prager, R., Flieger, A., Schlager, S., Kalhöfer, D., & Mertens, E. (2018). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 outbreak in Germany after school trip to Austria due to raw cow milk, 2017 - The important role of international collaboration for outbreak investigations. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 308(5), 539–544. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.05.005>
- Nadon, C., Van Walle, I., Gerner-Smidt, P., Campos, J., Chinen, I., Concepcion-Acevedo, J., Gilpin, B., Smith, A. M., Kam, K. M., Perez, E., Trees, E., Kubota, K., Takkinen, J., Nielsen, E. M., Carleton, H., & FWD-NEXT Expert Panel. (2017). PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Euro Surveillance*, 22(23), 30544. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30544>
- Nautiyal, C. S. (2009). Self-purificatory Ganga water facilitates death of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Current Microbiology*, 58(1), 25–29. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9260-3>
- Neidhardt, F. C., & Birch, M. A. (1989). Processes in microbial cell division. En *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (Vol. 2, pp. 1651-1686). American Society for Microbiology. Washington, DC.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., & Schaechter, M. (1990). *Physiology of the Bacterial Cell*. Sinauer Associates.

[https://doi.org/10.1016/0307-4412\(92\)90139-D](https://doi.org/10.1016/0307-4412(92)90139-D)

Nilsson, A. I., Berg, O. G., Aspevall, O., Kahlmeter, G., & Andersson, D. I. (2003). Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2850–2858. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2850-2858.2003>

Nioh, I. & Furusaka. C. (1968). Growth of bacteria in the heat-killed cell suspensions of the same bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, 14:373–85.  
<https://doi.org/10.2323/jgam.14.373>

Nuozzi G., Sagua M.I., Brandone A., Suarez J., Machaín M., Schiaffino M.R. (2021). Identificación de bacterias entéricas en sistemas acuáticos de la provincia de Buenos Aires, Argentina. VII Jornadas de Jóvenes Investigadores. 24-25 junio 2021, Junín, BA, Argentina (virtual).

Nuozzi, G., Chinen, I., Miliwebsky, E., Sagua, M., Quiroga, M.P., & Schiaffino, M.R. (2023). Isolation of pathogenic *Escherichia coli* in two rivers of Argentina. *SILnews*, 82, 20–21.

Nyati H. (2000). Survival characteristics and the applicability of predictive mathematical modelling to *Listeria monocytogenes* growth in sous vide products. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2-3), 123–132. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00193-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00193-2)

Orsi, R. H., Stoppe, N. C., Sato, M. I., Gomes, T. A., Prado, P. I., Manfio, G. P., & Ottoboni, L. M. (2007). Genetic variability and pathogenicity potential of *Escherichia coli* isolated from recreational water reservoirs. *Research in Microbiology*, 158(5), 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.02.009>

Pachepsky, Y., Shelton, D. R., McLain, J. E., Patel, J., & Mandrell, R. E. (2011). Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Advances in Agronomy*, 113, 75-141.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386473-4.00002-6>

Palese, A. M., Pasquale, V., Celano, G., Figliuolo, G., Masi, S., & Xiloyannis, C. (2009). Irrigation of olive groves in Southern Italy with treated municipal wastewater: Effects on microbiological quality of soil and fruits. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 129: 43–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.07.003>

Park, J., Kim, J. S., Kim, S., Shin, E., Oh, K. H., Kim, Y., Kim, C. H., Hwang, M. A., Jin, C. M., Na, K., Lee, J., Cho, E., Kang, B. H., Kwak, H. S., Seong, W. K., & Kim, J. (2018). A waterborne outbreak of multiple diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections associated with drinking water at a school

- camp. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 66, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.09.021>
- Parveen, S., Murphree, R. L., Edmiston, L., Kaspar, C. W., Portier, K. M., & Tamplin, M. L. (1997). Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2607–2612. <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2607-2612.1997>
- Paton, A. W., & Paton, J. C. (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 598–602. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.598-602.1998>
- Pearson, H. W., Mara, D. D., Mills, S. W., & Smallman, D. J. (1987). Physico-chemical parameters influencing faecal bacterial survival in waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, 19(12), 145–152. <https://doi.org/10.2166/wst.1987.0139>
- Pellegrini, M. C., Okada, E., González Pasayo, R. A., & Ponce, A. G. (2022). Prevalence of *Escherichia coli* strains in horticultural farms from Argentina: antibiotic resistance, biofilm formation, and phylogenetic affiliation. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(16), 23225–23236. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17523-1>
- Peluso, F., Grosman, F., & Gonzalez Castelain, J. (2009). Health risk by organochlorine pesticides in waters of an Argentine pampean shallow lake. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 43(2), 233–240. <https://www.webofscience.com/wos/WOSCC/full-record/000207966500009>
- Perry, J. D. (2017). A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 30. <https://doi.org/10.1128/cmr.00097-16>
- Petersen, F., & Hubbart, J. A. (2020). Physical Factors Impacting the Survival and Occurrence of *Escherichia coli* in Secondary Habitats. *Water*, 12(6):1796. <https://doi.org/10.3390/w12061796>
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., & Aligé, S. (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00167-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00167-7)
- Pianetti, A., Falcioni, T., Bruscolini, F., Sabatini, L., Sisti, E., & Papa, S. (2005). Determination of the viability of *Aeromonas hydrophila* in different types of water by flow cytometry, and comparison with classical methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 7948–7954. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7948-7954.2005>

- Polifroni, R., Etcheverría, A., Arroyo, G. H., & Padola, N. (2014). Supervivencia de VTEC O157 y no-O157 en agua de bebederos y materia fecal de bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 10 46(2), 126–132. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70061-6](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70061-6)
- Polifroni, R., Etcheverría, A., Padola, N., & Parma, A. (2009). *Escherichia coli verocitotoxigénico (VTEC). Características de virulencia y persistencia en el medio ambiente*. SciELO Argentina. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982009000100007&script=sci\\_arttext&tlang=pt](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982009000100007&script=sci_arttext&tlang=pt)
- Prager, R., Liesegang, A., Voigt, W., Rabsch, W., Fruth, A., & Tschape, H. (2002). Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2/H<sup>-</sup> in Germany. *Infection Genetics and Evolution*, 1:265-275. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00032-1)
- Pyle, B. H., Broadaway, S. C., & McFeters, G. A. (1999). Sensitive detection of *Escherichia coli* O157 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1966-1972. <https://doi.org/10.1128%2Faem.65.5.1966-1972.1999>
- Quainoo, S., Coolen, J. P. M., van Hijum, S. A. F. T., Huynen, M. A., Melchers, W. J. G., van Schaik, W., & Wertheim, H. F. L. (2017). Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(4), 1015–1063. <https://doi.org/10.1128/CMR.00016-17>
- Quiroga, M. P. (2020). Diversidad de bacterias planctónicas en lagunas pampeanas utilizadas con fines recreativos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina.
- Quirós, R. (2005). La ecología de las lagunas de las Pampas. *Investigación y Ciencia*, 1(6), 1-13. <https://www.agro.uba.ar/users/quiros/Drafts/EcologialagunasPampas.pdf>
- Quirós, R., & Drago, E. (1999). The environmental state of Argentinean lakes: an overview. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 4(1-2), 55-64. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1770.1999.00076.x>
- Quirós, R., Renella, A. M., Boveri, M. B., Rosso, J. J., Sosnovsky, A. (2002). Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral*, 12(2), 175-185. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1667-782X2002000200011&lng=es&tlang=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2002000200011&lng=es&tlang=es).
- Quirós, R., Rosso, J. J., Rennella, A. M., Sosnovsky, A., & Boveri, M. (2002). Análisis del estado trófico de las lagunas pampeanas (Argentina). *Interciencia*, 27(11), 584-591.

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442002001100002&lng=es&nrm=iso&tlang=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442002001100002&lng=es&nrm=iso&tlang=es)

Ramírez Agudelo, M. E., & Rojas López, M. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23(2), 8-19. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.11130>

Ray, R., & Singh, P. (2022). Prevalence and implications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in farm and wild ruminants. *Pathogens*, 11(11), 1332. <https://doi.org/10.3390/pathogens1111332>

Renella, A. M. (2007). Relevancia de las interacciones tróficas en la determinación de la estructura del zooplancton en grandes lagunas pampeanas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

Renella, A. M., & Quirós, R. (2006). The effects of hydrology on plankton biomass in shallow lakes of the Pampa Plain. *Hydrobiologia*, 556, 181–191. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-0318-y>

Rennella, A. M., & Quirós, R. (2002). Relations between planktivorous fish and zooplankton in two very shallow lakes of the Pampa Plain. *Verhandlungen der Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 28, 887-891. <https://doi.org/10.1080/03680770.2001.11901842>

Ringuelet, R. A., Salibián, A., Claverie, E., & Ilhero, S. (1967). Limnología química de las lagunas pampásicas (Provincia de Buenos Aires). *Physis*, 27(74), 201-221. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/130488>

Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldán, C. D., Balbi, L., García, B., Fiorilli, G., Sosa-Estani, S., Kincaid, J., Rangel, J., Griffin, P. M., & Case-Control Study Group (2006). Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 88–96. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.88>

Rochelle-Newall, E., Nguyen, T. M. H., Le, T. P. Q., Sengtaheuanghoun, O., & Ribolzi, O. (2015). A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: Knowledge gaps and future directions. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00308/FULL>

Rompre, A., Servais, P., Baudart, J., de Roubin, M. R., & Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49(1), 31–54. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00351-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00351-7)

Rozen, Y., & Belkin, S. (2001). Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 513-529. [https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7\\_4](https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7_4)

Rumball, N. A., Alm, E. W., & McLellan, S. L. (2023). Genetic Determinants of *Escherichia coli* Survival in Beach Sand. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(1), e0142322.

<https://doi.org/10.1128/aem.01423-22>

Sagua, M., Nuozzi, G., & Schiaffino, M. R. (2021). Shallow lakes from the Salado River basin (Buenos Aires, Argentina): effects of anthropogenic activities. *SIL News*, (78), 18-19. <https://limnology.org/wp-content/uploads/2021/07/SILNews78.pdf>

Sagua, M., Nuozzi, G., Perdomo, S., Sánchez, M. L., Bianchelli, J., Ipucha, D., & Schiaffino, M. R. (2020). Bacteriological and Environmental state of Pampean shallow lakes associated to the Salado River (Argentina). Unity in Diversity – International Society of Microbial Ecology.

Sagua, M., Nuozzi, G., Sánchez, M. L., Huber, P., Perdomo, S., & Schiaffino, M. R. (2023). Unraveling the effect of land use on the bacterioplankton community composition from highly impacted shallow lakes at a regional scale. *FEMS Microbiology Ecology*, 99(10), fiad109. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad109>

Sagua, M., Quiroga, M. P., & Schiaffino, M. R. (2018). Análisis bacteriológico y ambiental de lagunas pampeanas utilizadas con fines recreativos, pertenecientes a la cuenca superior del Río Salado (Provincia de Buenos Aires). V Jornadas Interdisciplinarias: Ciclo del Agua en Agroecosistemas. Facultad de Ciencias Veterinarias UBA, Buenos Aires, Argentina.

Saima, U., Alam, M. & Akter, S. (2021). Survival of *escherichia coli* in Water Microcosm Study and Rethinking its Use as Indicator. *Microbiology*, 90, 247–260. <https://doi.org/10.1134/S0026261721020107>

Sánchez, M. L., Schiaffino, M. R., Graziano, M., Huber, P., Lagomarsino, L., Minotti, P., Zagarese, H., Izaguirre, I. (2021). Effect of land use on the phytoplankton community of Pampean shallow lakes of the Salado River basin (Buenos Aires Province, Argentina). *Aquatic Ecology*, 55(2), 417-435.

Sánchez-Clemente, R., Guijo, M. I., Nogales, J., & Blasco, R. (2020). Carbon Source Influence on Extracellular pH Changes along Bacterial Cell-Growth. *Genes*, 11(11), 1292.

<https://doi.org/10.3390/genes1111292>

Saraceno, M., Lugo, S. G., Ortiz, N., Gómez, B. M., y García, C. A. S., Frankel, N., Graziano, M. (2021). Unraveling the ecological processes modulating the population structure of *Escherichia coli* in a highly polluted urban stream network. *Scientific Reports*, 11(1), 1- 14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94198-1>

Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx

nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 2951–2963.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>

Schiaffino, M. R., Huber, P., Sagua, M., Sabio Y García, C. A., & Reissig, M. (2020). Covariation patterns of phytoplankton and bacterioplankton in hypertrophic shallow lakes. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(11), fiaa161. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa161>

Schink, S. J., Biselli, E., Ammar, C., & Gerland, U. (2019). Death Rate of *Escherichia coli* during Starvation Is Set by Maintenance Cost and Biomass Recycling. *Cell Systems*, 9(1), 64–73.e3.  
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.06.003>

Schraft, H., & Watterworth, L. (2005). Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: Comparison of 3M™ Petrifilm™ plates with standard plating procedures. *Journal of Microbiological Methods*, 60(3), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.10.008>

Seleim, S. M., Mostafa, M. S., Ouda, N. H., & Shash, R. Y. (2022). The role of pmrCAB genes in colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 12(1), 20951. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25226-x>

Seoane Rocha, C. (2018). Estructura y dinámica del bacteriplancton en la cuenca superior en inferior de río Salado. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

Servain-Viel, S., Aknin, M. L., Domenichini, S., Perlemuter, G., Cassard, A. M., Schlecht-Louf, G., & Moal, V. L. (2024). A flow cytometry method for safe detection of bacterial viability. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 105(2), 146–156.  
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.24794>

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>

Shapiro, H. M. (1988). *Practical flow cytometry*. Wiley-Liss.

Shapiro, H.M. (1995). *Practical flow cytometry*. Third Edition. Wiley-Liss.

Smakman, F., & Hall, A. R. (2022). Exposure to lysed bacteria can promote or inhibit growth of neighboring live bacteria depending on local abiotic conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(2), fiac011.  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiac011>

- Smith, A., Kaczmar, A., Bamford, R. A., Smith, C., Frustaci, S., Kovacs-Simon, A., O'Neill, P., Moore, K., Paszkiewicz, K., Titball, R. W., & Pagliara, S. (2018). The Culture Environment Influences Both Gene Regulation and Phenotypic Heterogeneity in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1739. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01739>
- Sohier, D., Pavan, S., Riou, A., Combrisson, J., & Postollec, F. (2014). Evolution of microbiological analytical methods for dairy industry needs. *Frontiers in Microbiology*, 5, 72168. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00016>
- Šolić, M., & Krstulović, N. (1992). Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 24:411-416. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(92\)90503-X](https://doi.org/10.1016/0025-326X(92)90503-X)
- Soriano, A. (1992). Río de la Plata Grasslands. In Coupland, RT (Ed) *Ecosystem of the world 8A. Natural Grasslands. Introduction and Western Hemisphere*. (pp. 367–407). Elsevier. New York.
- Spina, T. L. B. (2015). Avaliação dos patótipos de *Escherichia coli* circulantes no rebanho bovino e identificação das cepas de STEC isoladas no estado de São Paulo. [Tesis de Maestría, UNESP]. Aleph, 1 CD-ROM. <https://doi.org/10.17616/R31NJN39>
- Ståhl, P. L., & Lundeberg, J. (2012). Toward the single-hour high-quality genome. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 359–378. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060410-094158>
- Stancik, L.M., Stancik, D.M., Schmidt, B.F., Barnhart, D., Yoncheva, Y., & Slonczewski, J.L. (2002). pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184, 4246 - 4258. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4246-4258.2002>
- Stasiak, M., Maćkiw, E., Kowalska, J., Kucharek, K., & Postupolski, J. (2021). Silent Genes: Antimicrobial Resistance and Antibiotic Production. *Polish Journal of Microbiology*, 70(4), 421–429. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-040>
- Steinhaus, E. A., & Birkeland, J. M. (1939). Studies on the Life and Death of Bacteria: I. The Senescent Phase in Aging Cultures and the Probable Mechanisms Involved. *Journal of Bacteriology*, 38(3), 249–261. <https://doi.org/10.1128/jb.38.3.249-261.1939>
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación – SRHN. (2003). Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente correspondientes a *Escherichia coli*/ Enterococos.

- Sun, F., Chen, M., & Chen, J. (2011). Integrated Management of Source Water Quantity and Quality for Human Health in a Changing World. *Encyclopedia of Environmental Health*, 254–265. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:128238742>
- Surbeck, C. Q., Jiang, S. C., & Grant, S. B. (2010). Ecological control of fecal indicator bacteria in an urban stream. *Environmental Science & Technology*, 44(2), 631–637. <https://doi.org/10.1021/es903496m>
- Suzuki, Y., Hashimoto, R., Xie, H., Nishimura, E., Nishiyama, M., Nukazawa, K., & Ishii, S. (2019). Growth and antibiotic resistance acquisition of *Escherichia coli* in a river that receives treated sewage effluent. *The Science of the Total Environment*, 690, 696–704. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.050>
- Szöcs, E., Coring, E., Bäthe, J., & Schäfer, R. B. (2014). Effects of anthropogenic salinization on biological traits and community composition of stream macroinvertebrates. *The Science of the Total Environment*, 468-469, 943–949. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.058>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., ... WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Takahata, S., Ida, T., Hiraishi, T., Sakakibara, S., Maebashi, K., Terada, S., Muratani, T., Matsumoto, T., Nakahama, C., & Tomono, K. (2010). Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.011>
- Takano, S., Pawlowska, B. J., Gudelj, I., Yomo, T., & Tsuru, S. (2017). Density-Dependent Recycling Promotes the Long-Term Survival of Bacterial Populations during Periods of Starvation. *mBio*, 8(1), e02336-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02336-16>
- Tamburini, E., & Mastromei, G. (2000). Do bacterial cryptic genes really exist?. *Research in Microbiology*, 151(3), 179–182. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)00137-6](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)00137-6)
- Tan, B., Ng, C., Nshimyimana, J. P., Loh, L. L., Gin, K. Y., & Thompson, J. R. (2015). Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1027. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01027>

- They, N. H., Ferreira, L. M. H., Marins, L. F., & Abreu, P. C. (2015). Bacterial community composition and physiological shifts associated with the El Niño Southern Oscillation (ENSO) in the Patos Lagoon Estuary. *Microbial Ecology*, 69(3), 525-534. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0511-5>
- Timpano, A. J., Schoenholtz, S. H., Soucek, D. J., & Zipper, C. E. (2018). Benthic macroinvertebrate community response to salinization in headwater streams in Appalachia USA over multiple years. *Ecological indicators*, 91, 645-656. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.031>
- Tiwari, A., Oliver, D. M., Bivins, A., Sherchan, S. P., & Pitkänen, T. (2021). Bathing Water Quality Monitoring Practices in Europe and the United States. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5513. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115513>
- Torremorell, A., Bustigorry, J., Escaray, R., & Zagarese, H. E. (2007). Seasonal dynamics of a large, shallow lake, laguna Chascomús: The role of light limitation and other physical variables. *Limnologica*, 37(1), 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.09.002>
- Torremorell, A., Pérez, G., Lagomarsino, L., Huber, P., Queimaliños, C., Bustingorry, J., Fermani, P., Llames, M.E., & Unrein, F. (2014). Microbial pelagic metabolism and CDOM characterization in a phytoplankton-dominated versus a macrophyte-dominated shallow lake. *Hydrobiologia*, 752, 203–221. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2057-4>
- Tozzi, A. E., Caprioli, A., Minelli, F., Gianviti, A., De Petris, L., Edefonti, A., Montini, G., Ferretti, A., De Palo, T., Gaido, M., Rizzoni, G., & the Hemolytic Uremic Syndrome Study Group. (2003). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 106-108. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020266>
- Tracogna M. F., Losch L. S., Alonso J. M., Merino L. A. (2013). Detection and characterization of *Salmonella* spp. in recreational aquatic environments in the Northeast of Argentina. *Ambi-Agua, Taubaté*, 8(2), 18-26. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1145>
- Troussellier, M., Bonnefont, J.-L., Courties, C., Derrien, A., Dupray, E., Gauthier, M., Gourmelon, M., Joux, F., Lebaron, P., Martin, Y. & Pommeuy, M. (1998). Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. *Oceanologica Acta*, 21(6), 965-981. [https://doi.org/10.1016/S0399-1784\(99\)80019-X](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(99)80019-X)
- Tymensen, L. D., Pyrdok, F., Coles, D., Koning, W., McAllister, T. A., Jokinen, C. C., Dowd, S. E., & Neumann, N. F. (2015). Comparative accessory gene fingerprinting of surface water *Escherichia coli* reveals

genetically diverse naturalized population. *Journal of Applied Microbiology*, 119(1), 263–277.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12814>

Tyson, S., Peterson, C. L., Olson, A., Tyler, S., Knox, N., Griffiths, E., Dooley, D., Hsiao, W., Cabral, J., Johnson, R. P., Laing, C., Gannon, V., Lynch, T., Van Domselaar, G., Brinkman, F., & Graham, M. (2019). Eleven High-Quality Reference Genome Sequences and 360 Draft Assemblies of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human, Food, Animal, and Environmental Sources in Canada. *Microbiology Resource Announcements*, 8(41), e00625-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00625-19>

Valderrama, J. C. (1981). The simultaneous analysis of total Nitrogen and total Phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10, 109-122.

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, 5(2), 173–183. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>

Vasavada, P. C., & White, C. H. (1993). Symposium: developing methodology for microbial evaluation of milk and dairy products. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 3099-3100. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77648-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77648-1)

Velicer, G. J., & Lenski, R. (2009). Evolution of social cooperation in microbes. *Nature Reviews Microbiology*, 7(12), 335-345. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2193>

Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G. L., Rodríguez, P., Mugni, H., & Pizarro, H. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19(4), 710-721. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0446-7>

Verthé, K., & Verstraete, W. (2006). Use of flow cytometry for analysis of phage-mediated killing of *Enterobacter aerogenes*. *Research in Microbiology*, 157(7), 613-618. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.02.007>

Vk, D., Srikumar, S., Shetty, S., van Nguyen, S., Karunasagar, I. & Fanning, S. (2019) Silent antibiotic resistance genes: a threat to antimicrobial therapy. *International Journal of Infectious Diseases*, 79, 20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.063>

- Vrede, K. (2005). Nutrient and temperature limitation of bacterioplankton growth in temperate lakes. *Microbial Ecology*, 49(2), 245-256. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0259-4>
- Vrede, K., Vrede, T., Isaksson, A., & Karlsson, A. (1999). Effects of nutrients (phosphorous, nitrogen, and carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton—a seasonal study. *Limnology and Oceanography*, 44(7), 1616-1624. <https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.7.1616>
- Wang, J., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, L., & Li, G. (2018). Effect of culture conditions on the relationship between optical density and bacterial concentration. *Journal of Environmental Microbiology*, 20(3), 544-550. <https://doi.org/10.1128/AEM.02142-17>
- Wang, S., & Levin, R. E. (2006). Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.023>
- Warburton, D. W., Austin, J. W., Harrison, B. H., & Sanders, G. (1998). Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated bottled water. *Journal of Food Protection*, 61(8), 948–952. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.8.948>
- Wei, T., Simko, V., Levy, M., Xie, Y., Jin, Y., Zemla, J., Freidank, M., Cai, J., & Protivinsky, T. (2021). *corrplot: Visualization of a Correlation Matrix*. R package version 0.92. <https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/index.html>
- WHO. (2012). Animal Waste, Water Quality and Human Health. In Water Intelligence Online (Vol. 12). <https://doi.org/10.2166/9781780401249>
- Winfield, M. D., & Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3687–3694. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3687-3694.2003>
- Wolfe, A. J., & Wolfe, R. S. (2013). The role of metabolites in the absorption of light by *Escherichia coli*. *Photochemistry and Photobiology*, 89(4), 881-887. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2013.01523.x>
- Wu, Q. L., Zwart, G., Schauer, M., Kamst-van Agterveld, M. P., & Hahn, M. W. (2006). Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5478–5485. <https://doi.org/10.1128/AEM.00767-06>

- Xavier, K. B., Rahme, L. G., & Foster, J. W. (2009). Quantifying the role of cooperation in bacterial infections. *Nature*, 460(7253), 1150-1153. <https://doi.org/10.1038/nature08156>
- Yang, H. H., Vinopal, R. T., Grasso, D., & Smets, B. F. (2004). High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1528–1536. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1528-1536.2004>
- Zambrano, M. M., & Kolter, R. (1996). GASPing for life in stationary phase. *Cell*, 86(2), 181-184. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80089-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80089-6)
- Zhang, Q., Eichmiller, J. J., Staley, C., Sadowsky, M. J., & Ishii, S. (2016). Correlations between pathogen concentration and fecal indicator marker genes in beach environments. *The Science of the Total Environment*, 573, 826–830. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.122>
- Zhang, S., Li, X., Wu, J., Coin, L., O'Brien, J., Hai, F., & Jiang, G. (2021). Molecular Methods for Pathogenic Bacteria Detection and Recent Advances in Wastewater Analysis. *Water*, 13(24), 3551. <https://doi.org/10.3390/w13243551>
- Zinser, E. R., & Kolter, R. (1999). Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 181(18), 5800-5807. <https://doi.org/10.1128/jb.181.18.5800-5807.1999>
- Zinser, E. R., & Kolter, R. (2004). *Escherichia coli* evolution during stationary phase. *Research in Microbiology*, 155(5), 328-336. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.014>