



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

Tesina de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

**“Análisis fenotípico y genotípico de una colección de cepas de
Escherichia coli aisladas de agua de playas de Montevideo”**

Ludmila Berrueta

Tutora: Dra. Ma. Fernanda Azpiroz.

Sección Fisiología y Genética Bacterianas, Facultad de Ciencias

Tribunal: Ma. Fernanda Azpiroz, Silvia Batista y Ma. Eloísa Poey.

**Montevideo,
Uruguay 2024**

Resumen

La resistencia antibiótica es un tema prioritario para la Organización Mundial de la Salud, siendo incluido dentro de la estrategia “Una Salud”. Un aspecto relevante es la presencia y diseminación de bacterias resistentes y de genes de resistencia antibiótica en el ambiente. En este sentido, las plantas de tratamiento de aguas residuales se identifican como sitios críticos, ya que allí confluyen una alta carga de microorganismos entéricos junto con concentraciones subterapéuticas de antibióticos y de otras sustancias tóxicas. El vertimiento de los efluentes de los sistemas de tratamiento a cuerpos de agua usados para actividades recreativas, tales como las playas, constituye un riesgo potencial para la salud humana.

Previamente, en la Sección se realizó un análisis preliminar de la presencia de enterobacterias resistentes a antibióticos en aguas de tres playas de Montevideo. Esta zona del Río de la Plata presenta un fuerte impacto antrópico al recibir aguas residuales pretratadas, fundamentalmente de Montevideo. Se obtuvo una colección de 21 aislamientos de *Escherichia coli*, una de las bacterias indicadoras de contaminación fecal del agua. En esta tesina se realizó un análisis fenotípico y genotípico de la colección enfocado en el perfil de susceptibilidad antibiótica y en la capacidad de transferencia horizontal de los genes de resistencia. Concretamente, se determinó el perfil de resistencia de los aislamientos a seis familias de antibióticos por su crecimiento en placas con antibióticos incorporados al medio y por disco-difusión. Posteriormente, se realizaron experimentos de conjugación de las resistencias antibióticas encontradas para determinar si eran transferidas horizontalmente. Adicionalmente, se buscaron indicios del posible potencial de virulencia portado por los aislamientos, determinando el grupo filogenético al cual pertenecían y la capacidad de producir microcinas de clase II, un grupo de péptidos antibióticos propuestos como factores de virulencia de cepas uropatógenas de *E. coli*. Las resistencias a ampicilina y a estreptomicina fueron las más representadas, seguidas por las correspondientes a tetraciclina y a sulfametoxazol. Alrededor de la mitad de los aislamientos fueron multirresistentes, i.e. refractarios a tres o más familias de antibióticos. Se demostró la transferencia conjugativa a *E. coli* K12 de los genes de resistencia portados por aislamientos recuperados de las tres playas. Se determinó la asociación entre los distintos genes de resistencia de cada aislamiento, obteniendo evidencia de su localización en plásmidos grandes, conjugativos o movilizables. Los cuatro grupos filogenéticos estuvieron representados; la mayoría de los aislamientos fueron de los grupos A y B1, usualmente asociados a cepas comensales. Cinco aislamientos, distribuidos en las tres playas, produjeron microcinas de clase II, llegando a identificar la microcina en cuatro de ellos.

En suma, en este trabajo se evidencia por primera vez la presencia de aislamientos de *E. coli* resistentes a antibióticos, con capacidad de transferir dichos genes de resistencia, en aguas de playas de Montevideo.

ÍNDICE

1. Introducción	3
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. Materiales y Métodos	12
3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	12
3.2. Antibiograma	12
3.3. Transferencia de plásmidos por conjugación	13
3.3.1. En medio sólido: "Cross-streaking"	13
3.3.2. En medio líquido	13
3.4. Prueba de producción antibiótica	14
3.5. Manipulación y análisis del ADN	14
4. Resultados	16
4.1. Análisis del perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos	16
4.2. Transferencia conjugativa de genes de resistencia antibiótica	20
4.3. Análisis del grupo filogenético y de la producción de microcinas de clase II de los aislamientos	26
5. Discusión	31
6. Conclusiones	37
7. Referencias	38

1. Introducción

Los antibióticos son compuestos producidos por microorganismos que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos, constituyendo en la naturaleza una estrategia de competencia. En la clínica, algunos de estos compuestos se emplean como agentes quimioterápicos para el tratamiento de infecciones. En 1928 se descubrió el antibiótico penicilina y, en los siguientes 40 años, se desarrollaron diversas líneas de investigación dedicadas al descubrimiento de nuevos antibióticos antibacterianos, a la producción de derivados químicamente modificados de dichos compuestos naturales (semisintéticos) y a la síntesis química de nuevas moléculas (sintéticos) (Leisner 2020; Giménez et al., 2024). Estos tres tipos de compuestos se denominan comúnmente antibióticos, clasificándose según su mecanismo de acción en: (i) aquéllos que inhiben la síntesis de la pared celular (betalactámicos y glicopéptidos), (ii) los que inhiben la síntesis proteica (aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas, lincosamidas y oxazolidinonas), (iii) los que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos (quinolonas y rifamicinas), (iv) los que actúan como análogos metabólicos (sulfamidas, trimetoprim e isoniazida) y (v) los que alteran la membrana celular (polimixinas) (Walsh, 2003; Munita & Arias 2016). Esta opción terapéutica, presente desde hace menos de 100 años, incrementó considerablemente la esperanza de vida de la humanidad al permitir tratar las principales infecciones bacterianas que padecía el ser humano y disminuir el riesgo de muerte en muchos procedimientos de salud.

Si bien la antibioterapia es uno de los grandes logros del siglo XX, hoy en día se ve amenazada por la presencia de bacterias multirresistentes, i.e. que son refractarias a varias familias distintas de antibióticos (Murray et al., 2022). Este problema ha adquirido importancia global debido al amplio uso de los antibióticos para el tratamiento de las infecciones bacterianas en humanos y como agentes terapéuticos, profilácticos y promotores del crecimiento en animales. Tan es así que la resistencia antibiótica es uno de los temas prioritarios en la agenda de la Organización Mundial de la Salud, siendo incluido dentro de la estrategia global denominada “Una Salud”. En este marco, se plantea la necesidad de considerar la salud humana, animal y ambiental como un conjunto para poder definir estrategias de detección, prevención y mitigación de amenazas a la salud mundial (World Health Organization, 2024). Según un estudio del 2019, la resistencia antibiótica sería la causa principal de muerte en el planeta, reportándose aproximadamente 1.3 millones de muertes causadas directamente por bacterias multirresistentes ese año. Las bacterias responsables del 80% de esas muertes pertenecen a seis especies: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp (Murray et al., 2022).

Las bacterias presentan tres mecanismos eficientes que las tornan resistentes: (i) expulsión del antibiótico al medio extracelular por bombas de eflujo, (ii) inactivación (degradación o modificación) enzimática del antibiótico y (iii) modificación de la diana del antibiótico. A su vez, estos mecanismos pueden estar potenciados por una disminución de la permeabilidad de la envoltura, la formación de biofilms o la alteración de circuitos metabólicos. Cabe mencionar que los mecanismos de resistencia pueden ser específicos para un determinado antibiótico o abarcar la resistencia a varios de ellos, estar codificados por uno o más genes, y expresarse simultáneamente en un microorganismo (Blair et al., 2014). Las bacterias adquieren resistencia antibiótica de dos formas: por mutaciones espontáneas aleatorias o por la adquisición de genes de resistencia mediante mecanismos de transferencia horizontal (conjugación, transducción o transformación). En el primer caso, ocurren mutaciones puntuales en genes específicos, como los codificantes para la diana del antibiótico, y esas bacterias mutantes proliferan exitosamente como consecuencia de la presión selectiva ejercida por la presencia del antibiótico. Estos eventos pueden involucrar tanto bacterias comensales como patógenas, e implican cambios permanentes que se mantienen en el linaje bacteriano. En cuanto a la segunda forma, la adquisición de genes de resistencia por parte de las bacterias ha sido un evento que se detectó a poco del inicio del empleo terapéutico de los antibióticos. Estos genes de resistencia se han diseminado en las bacterias que conviven con los humanos (patógenas o no), incluso alcanzando distintos ambientes. Esto se debe a que dichos determinantes genéticos se localizan usualmente en elementos genéticos móviles (MGEs), como los plásmidos, capaces de transferirse horizontalmente de una bacteria a otra, incluso entre bacterias filogenéticamente distantes (Aminov, 2011). En este sentido, la conjugación es reconocida como el mecanismo de transferencia horizontal más exitoso en la naturaleza, siendo particularmente frecuente en las bacterias del intestino de humanos y animales (Baquero et al., 2021). Requiere el contacto entre las células participantes y está mediada por un plásmido conjugativo que codifica para todas las funciones de la transferencia (región *tra*). Además de poder transferirse a sí mismo, un plásmido conjugativo puede movilizar consigo otros plásmidos que carezcan de la región *tra* completa (denominados plásmidos movilizables) e incluso segmentos del cromosoma bacteriano (Lawley et al., 2014). Es importante destacar que generalmente un mismo MGE porta más de un gen de resistencia, incluso múltiples, por lo que basta que exista la presión de selección asociada a un único gen del MGE para que la bacteria adquiera los demás genes de resistencia y se obtenga así un clon resistente a varios antibióticos distintos. Concretamente, los genes de resistencia se asocian generalmente a transposones, islas genómicas o casetes génicos capturados por integrones que, al ser incorporados por MGEs, adquieren la capacidad de ser transferidos horizontalmente. Dentro de los elementos genéticos portadores de genes de resistencia, los

integrines y los transposones son los más relevantes (Aminov et al., 2011; Baquero et al., 2021). Los primeros poseen un sistema de recombinación específica de sitio capaz de integrar y expresar genes de resistencia portados por estructuras modulares llamadas casetes génicos. Los integrines se clasifican en distintos tipos en base al gen codificante para la integrasa, siendo los de clases 1 y 2 los que se vinculan mayormente a las resistencias antibióticas portadas por aislamientos clínicos (Cambray et al., 2010). En cuanto a los transposones, se trata de elementos genéticos capaces de saltar al azar de un sitio a otro en el genoma mediante recombinación ilegítima. Para ello, su estructura básica consta de un gen codificante para una transposasa, enzima que cataliza el salto, y de secuencias repetidas invertidas cortas en sus extremos. Un tipo de elemento transponible, los transposones compuestos, portan adicionalmente una región variable que, en muchos casos, contiene genes de resistencia antibiótica (Muñoz-López & García-López 2010; Babakhani & Oloomi 2018).

El intestino de los humanos y animales se considera uno de los ambientes más propicios para el surgimiento de bacterias resistentes, ya que alberga una microbiota abundante y diversa en la que se ha detectado una alta presencia de MGEs, tales como plásmidos conjugativos (Bengtsson-Palme et al., 2021). La presencia de antibióticos en el intestino hace posible seleccionar microorganismos resistentes, ya sea por la aparición de mutaciones o por la adquisición de MGEs portadores de genes de resistencia mediante transferencia horizontal (Baquero et al., 2021; Bengtsson-Palme et al., 2021). Asimismo, es un ambiente que puede albergar bacterias patógenas que contengan genes de resistencia y/o que tengan el potencial de adquirir nuevos de sus contrapartes. Es así que los sistemas de tratamiento de aguas residuales son sitios críticos para la diseminación de la resistencia antibiótica al ambiente, ya que allí confluyen fundamentalmente las aguas de saneamiento de las ciudades, i.e. con muy alta carga de microorganismos entéricos junto con concentraciones subterapéuticas de antibióticos y otras sustancias tóxicas. Numerosos estudios describen la presencia de bacterias resistentes, de genes de resistencia y de sus MGEs asociados en diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015; Yan et al., 2017; Karkman et al., 2018). Más aún, si bien los tratamientos clásicos de estas aguas (ej. cloración y radiación UV) disminuyen la carga de bacterias y de genes de resistencia, se ha detectado que no la eliminan completamente y que además ocurre la selección de ciertas resistencias antibióticas que perduran en los efluentes (Rizzo et al., 2013; Karkman et al., 2018). Por lo tanto, el señalamiento de estos sitios como críticos en la diseminación ambiental de la resistencia ha llevado a que en los últimos años se estén desarrollando proyectos de monitoreo de la resistencia a escala global en las plantas de tratamiento de aguas residuales mediante un abordaje metagenómico (Hendriksen et al., 2019; Karkman et al., 2019).

La llegada de aguas residuales a cuerpos de agua usados para desarrollar actividades recreativas constituye un riesgo potencial para la salud humana, ya que posibilita la presencia de bacterias resistentes, patógenas o no, y/o de genes de resistencia antibiótica en dichas aguas (Rizzo et al., 2013; Yan et al., 2017; Giménez et al., 2024). Clásicamente, el control de calidad sanitaria de las aguas recreativas se realiza mediante la cuantificación de bacterias indicadoras de contaminación fecal. Inicialmente, los microorganismos indicadores utilizados fueron los denominados coliformes totales, grupo compuesto por los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*. Posteriormente, se sustituyó por un subgrupo de éstos, llamados coliformes fecales, integrado por algunas especies de *Klebsiella* y de cepas de *Escherichia coli* termotolerantes. Hoy en día, *E. coli* es una de las bacterias empleadas como indicador de contaminación fecal puesto que se encuentra exclusivamente en las heces de humanos y animales homeotermos. No obstante, es un microorganismo cuya viabilidad se ve notoriamente afectada por las condiciones ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y el grado de salinidad del agua (Troussellier et al., 2004; Ghaderpour et al., 2014). Es así que en ambientes de salinidad variable el género *Enterococcus* se suma como indicador de contaminación fecal. Este género bacteriano habita la microbiota intestinal de diversos animales además del humano y también se puede encontrar en el ambiente. No obstante, se caracteriza por presentar mayor resistencia a condiciones ambientales adversas (Larrea-Murell 2013; Ghaderpour et al., 2014). Cabe mencionar además que *E. coli* y *E. faecalis* (la especie de enterococos más abundante en la microbiota intestinal humana) están bastante bien caracterizadas en cuanto a la adquisición de genes de resistencia antibiótica (Rizzo et al., 2013). En este sentido, ha sido fundamental el aporte de las técnicas moleculares y la metagenómica para monitorear la presencia y abundancia de genes de resistencia, de las estructuras genéticas que los albergan así como de genes que identifican ciertos taxones bacterianos. Es así que algunos genes de resistencia se han propuesto como indicadores de contaminación en base a su relevancia clínica, su asociación a MGEs, y a su presencia en entornos ambientales con impacto antrópico. Dentro de los genes indicadores se incluye el gen codificante para la integrasa del integrón de clase 1 (*intI1*), como marcador de la presencia de una plataforma de adquisición de genes de resistencia (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015).

Los estuarios son uno de los ambientes acuáticos con fuerte impacto antrópico ya que reciben con frecuencia los efluentes de los sistemas de tratamiento de aguas residuales que provienen de las ciudades ubicadas en sus márgenes. Estos ambientes son ecotonos entre los ríos y océanos que exhiben propiedades físicas y químicas singulares, entre las que se destaca la variación continua de salinidad. Es así que el grado de contaminación de este ambiente acuático dependerá de la carga de microorganismos que se vierten y de que las

condiciones fisicoquímicas del agua permitan la permanencia de las bacterias entéricas en ella. Teniendo en cuenta que en los estuarios comúnmente se desarrollan actividades recreativas, la presencia de bacterias entéricas puede significar un riesgo sanitario. Más allá de la cuantificación de las bacterias indicadores de contaminación fecal, existen varios estudios que analizan los atributos de virulencia y de resistencia antibiótica de aislamientos de *E. coli* recuperados de estos ambientes. En efecto, se ha descrito la presencia de aislamientos de *E. coli* portadores de resistencias antibióticas, incluso multirresistentes, en varios estuarios (Lourenco et al., 2007; Henriques et al., 2008; Laroche et al., 2009; Chen et al., 2013; Pereira et al., 2013; Diab et al., 2018; Guo et al., 2018; Divya & Hatha, 2019; Cohen et al., 2020). Más aún, en dos de ellos se identificó que los clones resistentes eran linajes patógenos de *E. coli* (Diab et al., 2018; Divya & Hatha, 2019) y en uno se demostró la transferencia conjugativa de genes de resistencia a tetraciclina portados por los aislamientos (Henriques et al., 2008).

Si bien *E. coli* es una especie comensal del intestino de humanos y animales, existen algunos linajes patógenos tanto intestinales como extraintestinales causantes de diversas enfermedades tales como diarreas, infecciones urinarias, septicemia y meningitis neonatal (Kaper et al., 2004). Por lo tanto, dado que dentro de la microbiota intestinal residen las cepas comensales así como los linajes diarreogénicos y patógenos extraintestinales de *E. coli*, cabe la posibilidad de que las aguas residuales reciban todos estos linajes. En este sentido, el análisis filogenético de las cepas de *E. coli* puede aportar indicios acerca de su potencial de virulencia. Las distintas cepas se clasifican básicamente en cuatro grupos filogenéticos, A, B1, B2, y D, perteneciendo mayormente las comensales a los dos primeros grupos y los linajes extraintestinales a los grupos B2 y D. En cuanto a los linajes diarreogénicos de esta especie, no se ha establecido una relación clara con algún grupo filogenético en particular (Aguirre-Sánchez et al., 2022; Clermont et al., 2000; Mosquito et al., 2015). Otro posible aporte sobre la virulencia de *E. coli* lo constituye la producción de unos antibióticos peptídicos, denominados microcinas de mayor masa molecular. Este grupo de antibióticos ha sido profundamente estudiado por nuestro grupo, siendo propuesto como un factor de virulencia de cepas extraintestinales de *E. coli* causantes de infecciones urinarias (UPEC) (Azpiroz & Laviña, 2007; Azpiroz et al., 2009). Actualmente se describen 10 microcinas de esta familia, todas producidas por enterobacterias, y mayormente por distintas cepas de *E. coli*, las que se han renombrado como microcinas de clase II (Parker & Davies, 2022). Si bien se encuentran ampliamente distribuidas en las cepas de *E. coli*, su presencia se asocia mayormente a linajes patógenos. Concretamente, se han identificado en aislamientos clínicos de *E. coli* procedentes de pacientes sin o con gastroenterocolitis, bacteriemia, infecciones urinarias y con enfermedades neoplásicas de la mucosa intestinal. Se trata de un grupo de antibióticos peptídicos de síntesis ribosómica, de bajo peso

molecular (5-10 kDa), que se divide en dos clases: las microcinas no modificadas y las modificadas por la adición de un sideróforo de tipo catecol a su extremo carboxilo terminal. Todas las microcinas utilizan la vía de captación de los sideróforos de tipo catecol para ingresar a la célula diana, distinguiéndose en cuanto al tipo de receptor de membrana externa que emplean. Concretamente, las microcinas modificadas utilizan cualquiera de los tres receptores de membrana externa (Cir, Fiu y FepA) y la vía TonB para su ingreso, mientras que las microcinas no modificadas emplean únicamente el receptor Cir, junto con la vía TonB. La producción antibiótica está codificada en un sistema genético que contiene el gen codificante para el péptido antibiótico, un gen de inmunidad que confiere protección a la célula productora, genes para el sistema de secreción del antibiótico y, en el caso de las microcinas modificadas, genes cuyos productos imprimen las modificaciones postraduccionales al péptido precursor. Los sistemas genéticos que codifican para las microcinas modificadas se localizan en el cromosoma bacteriano, y aquéllos que hacen posible la producción de las no modificadas, se encuentran en plásmidos (Parker & Davies, 2022). Cabe mencionar que la microcina V (MccV), que compone la clase no modificada, ha sido la más analizada hasta entonces, siendo objeto de estudio en varias investigaciones de nuestro grupo (Azpiroz & Laviña 2007; Poey et al., 2006; Poey et al., 2012).

El Río de la Plata es un estuario que reúne aguas de los Ríos Uruguay y Paraná (agua dulce) y del océano Atlántico (agua marina), en cuyas márgenes se localizan varias ciudades de Uruguay y de Argentina. Es así que este ecosistema presenta impacto antrópico dentro del que se incluye el vertimiento de aguas servidas. En este sentido, la red de saneamiento de la ciudad de Montevideo vierte las aguas residuales a este estuario luego de un proceso de pretratamiento de las mismas, que consiste en quitar físicamente los residuos sólidos, las grandes partículas en suspensión y las grasas (desbaste, desarenado y desengrase), no incluyendo un tratamiento para eliminar los microorganismos. Estos vertimientos llegan a las aguas estuarinas mediante los emisarios de Punta Carretas (2 km de la costa en el área sur de la ciudad) y de Punta Yeguas (2 km de la costa en el área oeste de la ciudad), este último puesto en funcionamiento a partir de setiembre de 2020 (Intendencia de Montevideo, 2020a; Intendencia de Montevideo, 2020b) (Figura 1). Por lo tanto, la falta de un proceso completo de tratamiento del efluente que se vierte al río permite que enterobacterias y, dentro de éstas, probablemente linajes patógenos y/o portadores de resistencia antibiótica puedan alcanzar las playas de Montevideo. Esta situación generaría el riesgo de adquisición y transmisión de infecciones en humanos y animales que frecuentan estas aguas recreativas.

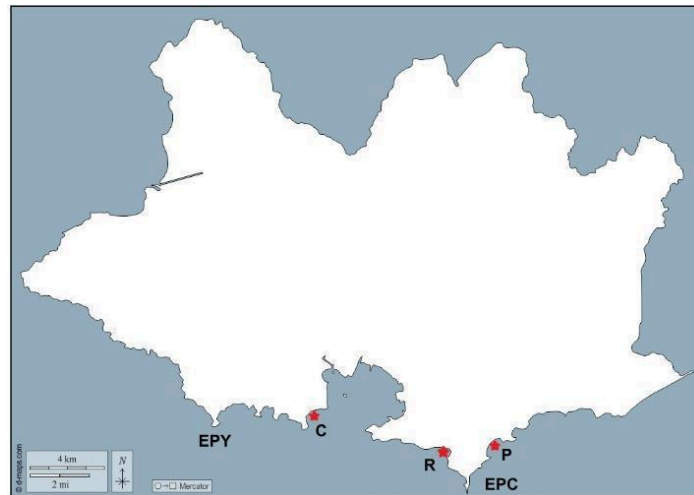


Figura 1. Mapa del departamento de Montevideo. Se indica la ubicación de los emisarios Punta Yeguas (EPY) y Punta Carretas (EPC), y de las playas donde se recolectaron muestras de agua (C: Cerro, R: Ramírez, P: Pocitos).

La Intendencia de Montevideo realiza el monitoreo continuo de las playas de la ciudad cuantificando coliformes termotolerantes o fecales en base a lo que determina si las playas están aptas para uso recreativo (Informe IM, 2022-2023). En este caso no se analizan los aislamientos obtenidos en cuanto a su carga de virulencia y/o de resistencia. Sin embargo, existen dos estudios en el ámbito científico al respecto. Concretamente, en el año 2019 se realizó un análisis metagenómico de muestras de agua de todas las playas de Montevideo así como de vertederos de saneamiento de la zona oeste de la ciudad, todas recolectadas en 2016. Se llevó a cabo la caracterización de la comunidad microbiana en ambos tipos de muestras, así como la búsqueda de genes de virulencia y de resistencia antibiótica (Fresia et al., 2019). Si bien no se detectaron bacterias de la microbiota intestinal en las playas, sí aparecieron algunos pocos genes de resistencia y de virulencia pero en ningún caso se pudo vincular a clones patógenos. Cabe señalar que en todas las playas se encontraron genes codificantes para betalactamasas de espectro extendido así como un gen que codifica para una fosfotransferasa que modifica e inactiva aminoglucósidos. Asociado a este estudio, se obtuvo una colección de aislamientos bacterianos procedentes de distintos puntos vinculados al saneamiento de la ciudad, que incluyó además aislamientos de la playa Ramírez (Antelo et al., 2018). Estos últimos pertenecieron a diferentes especies de *Pseudomonas*, una bacteria no entérica ubicua del ambiente, excepto dos que correspondieron a la enterobacteria *E. cloacae*. Es importante mencionar que en este estudio no se incluyó un análisis del potencial de virulencia y/o resistencia antibiótica de los aislamientos. Más recientemente, el mismo grupo realizó un nuevo estudio metagenómico que abarcó las muestras de 2016 analizadas previamente así como nuevas recolectadas en 2017, incluyendo en estas últimas nuevos puntos de la red de saneamiento y de agua de

tres playas de Montevideo (Buceo, Pocitos y Santa Catalina) (Salazar et al., 2022). En este caso se encontró que, al igual que las muestras de la red de saneamiento pero de forma menos pronunciada, las tres playas exhibían un mayor impacto antrópico que en 2016, i.e. presencia de bacterias de la microbiota intestinal y de genes de resistencia antibiótica. Más aún, el incremento de la resistencia a betalactámicos en las muestras tomadas en 2017 se asoció con un clon de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemes que generó un brote hospitalario ese año.

En este marco, se inició en la Sección un estudio experimental para analizar la presencia de enterobacterias resistentes a antibióticos en las playas de Montevideo. Concretamente, en el contexto de un proyecto PAIE, se tomaron muestras de agua de tres playas de Montevideo, elegidas en base a su cercanía al emisario de Punta Carretas (playas Ramírez y Pocitos) y a la bahía del Puerto de Montevideo (playa Cerro), unos días antes de la puesta en funcionamiento del emisario de Punta Yeguas. Se realizó la búsqueda de coliformes y, en particular de *E. coli*, resistentes a antibióticos a partir de las tres muestras de agua. Teniendo en cuenta que previamente se detectaron genes de resistencia a betalactámicos y a aminoglucósidos en las playas de Montevideo (Fresia et al., 2019), se eligió acotar el relevamiento en base a la resistencia a betalactámicos ya que son los antibióticos de mayor uso en la clínica. Concretamente, se seleccionaron aislamientos resistentes a ampicilina y se identificaron los que pertenecían a la especie *E. coli* a través de la detección de la enzima β -D-glucuronidasa, exclusiva de este taxón. Posteriormente a un grupo de aislamientos, mayormente de *E. coli*, se le realizó un análisis preliminar de susceptibilidad antibiótica en base a su crecimiento en medio nutriente adicionado de distintos antibióticos. Se evaluaron aquellas familias antibióticas para las que típicamente se reporta resistencia en las cepas de la clínica así como en los aislamientos recuperados de estuarios (Poey et al., 2012; Pereira et al., 2013; Divya & Hatha et al., 2019; Papa-Ezdra et al., 2021). Se detectaron aislamientos resistentes a varios antibióticos y se generó una colección de 21 cepas de *E. coli*, representativa de cada playa (Acuña et al., 2021).

En esta tesina se continuó analizando fenotípica y genotípicamente la colección de 21 cepas de *E. coli* de las playas. Concretamente, se corroboró el perfil de resistencia antibiótica de los aislamientos y se estudió la capacidad de los genes de resistencia de ser transferidos horizontalmente por conjugación. Asimismo, se incluyó el análisis del grupo filogenético al que pertenecían los aislamientos y la capacidad de producir unas bacteriocinas denominadas microcinas de clase II.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Caracterizar fenotípica y genotípicamente la colección de cepas de *E. coli* aisladas de agua de playas, con un énfasis en las resistencias antibióticas y en su transferencia horizontal.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar el perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos.
2. Analizar la transferencia conjugativa de los genes de resistencia antibiótica portados por los aislamientos.
3. Determinar el grupo filogenético al que pertenecen los aislamientos.
4. Analizar la producción de microcinas de clase II en los aislamientos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se trabajó con una colección previamente obtenida de 21 aislamientos de *E. coli* procedentes de agua de tres playas de Montevideo: siete de la playa Cerro (consignadas con “C”), ocho de la playa Pocitos (consignadas con “P”) y seis de la playa Ramírez (consignadas con “R”) (Acuña et al., 2020). Se emplearon algunos aislamientos de UPEC así como estirpes de *E. coli* K12 de la colección del laboratorio para llevar a cabo las diferentes metodologías, según se detalla en cada una de ellas. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: medios nutrientes LB (Luria-Bertani) y TSA (Agar Tripticasa Soja), medio mínimo M63 adicionado de glucosa y vitamina B1, y medio Müller-Hinton (Miller, 1992; Mueller & Hinton, 1941). Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a los medios a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (AMP) (100µg/mL), sulfametoxazol (SMX) (500µg/mL), trimetoprim (TMP) (100µg/mL), cotrimoxazol (SXT) -fórmula combinada sulfametoxazol/trimetoprim- (500/100µg/mL), tetraciclina (TET) (15µg/mL), kanamicina (KAN) (30µg/mL), estreptomicina (STR) (10µg/mL), ácido nalidíxico (NAL) (40µg/mL) y cloranfenicol (CHL) (60µg/mL).

Las cepas se incubaron siempre a 37°C durante 18-24hs. El crecimiento de los cultivos se realizó en LB y se monitorizó por medidas de DO₆₀₀ y recuento de viables. En el último caso, se sembraron alícuotas de las diluciones 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ en placas de medio nutriente (LB o TSA), contando unidades formadoras de colonias en las diluciones 10⁻⁶ y/o 10⁻⁷.

3.2. Antibiograma

Se realizó la técnica de disco difusión para estudiar el perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos, siguiendo el protocolo estándar (Bauer et al., 1966). Se utilizaron discos (Oxoid) de 10 antibióticos diferentes: ampicilina (AMP) (10µg), ceftazidima (CAZ) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg), imipenem (IPM) (10µg), cotrimoxazol (SXT) (25µg), tetraciclina (TET) (30µg), amikacina (AMK) (30µg), gentamicina (GEN) (10µg), ciprofloxacina (CIP) (5µg) y cloranfenicol (CHL) (30µg). *E. coli* ATCC25922 se utilizó como cepa de referencia. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las pautas del CLSI 2023 (M100, CLSI 2023). De esta forma, los aislamientos se catalogaron como sensibles (S), de resistencia intermedia (I) o resistentes (R) a cada antibiótico.

3.3. Transferencia de plásmidos por conjugación

3.3.1. En medio sólido: “Cross-streaking”

Se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Aznárez, 2020). Brevemente, se preparan placas de LB suplementadas con una mezcla de dos antibióticos que permita la selección y contraselección, de modo de obtener clones transconjugantes. Como cepa receptora se utilizó la estirpe *E. coli* K12 BZB1011 $\Delta hsdR::kan$, deficiente para la restrictasa HsdR del sistema de modificación/restricción de *E. coli* K12, por la inserción de un cassette de resistencia a kanamicina (*kan*) (Poey & Laviña 2018). Los aislamientos sensibles a kanamicina que portaban resistencias antibióticas se emplearon como cepas donantes. A partir de estrías frescas, se siembra en forma de listón una suspensión de la cepa receptora y se estrían las cepas donantes perpendicularmente hacia el listón. Luego de la incubación, la presencia de clones transconjugantes se evidencia por la aparición de colonias en la zona de cruce entre las cepas donante y receptora. La validez del resultado está dada por la ausencia de crecimiento fuera de la zona de contacto entre los parentales.

3.3.2. En medio líquido

Se empleó la misma cepa receptora que en el ensayo de cross-streaking y tres aislamientos de playa como donantes. A partir de estrías frescas de las cepas parentales, se realizan cultivos estáticos hasta fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente, se hacen subcultivos (dilución 1/50 del cultivo anterior) hasta fase logarítmica avanzada de las cepas donante y receptora, la primera se incuba sin agitación para preservar la integridad del pelo conjugativo, y la segunda con agitación. El crecimiento de dichos subcultivos se monitoriza por medidas de DO_{600} y recuento de viables. A partir de allí, se ponen juntos 4mL de subcultivo de receptora (ca: DO_{600} = 0,6) con 1mL de subcultivo de donante (ca: DO_{600} = 0,4) y la mezcla se incuba sin agitación durante 18-24hs a 37°C. Cumplido el tiempo, se rompen los pares conjugativos con fuerte agitación y se siembran alícuotas de la mezcla en placas de LB adicionadas de los antibióticos que permiten la selección y contraselección. Como controles, los parentales se procesan por separado, en paralelo y de igual forma que la mezcla experimental. La eficiencia de conjugación se calcula como el cociente entre el número de transconjugantes y el número de células donantes puestas en la mezcla de conjugación.

3.3. Prueba de producción antibiótica

Se analizó la producción de microcinas de clase II por parte de los aislamientos mediante un test de picada sobre tapiz, según se describió previamente (Azpiroz et al., 2009). Para ello, se siembra en una placa de medio mínimo un tapiz de una cepa indicadora y sobre él se inoculan por picada cada uno de los aislamientos. Luego de la incubación, la producción antibiótica se evidencia por la aparición de halos de inhibición del crecimiento del tapiz. Como cepas indicadoras se emplearon la estirpe de *E. coli* K12 MC4100, sensible a todas las microcinas, y dos derivados mutantes para los receptores de captación de estos antibióticos (Azpiroz & Laviña 2007). Concretamente, FGB1876 (*cir*, *fiu*, *fepA*), resistente a todas las microcinas por carecer de sus tres receptores de captación, y FGB202 (*cir*), resistente a MccV por ser deficiente para su receptor de captación exclusivo Cir (Poey et al., 2006; Azpiroz & Laviña 2007). Como cepas control se utilizan: *E. coli* H47 y *E. coli* CFT073, ambas productoras de dos microcinas de clase II modificadas, y MC4100 (pUCYC5-MccV), productora de MccV al portar un plásmido recombinante con el sistema genético clonado (Azpiroz et al., 2009; Flórez 2022).

3.4. Manipulación y análisis del ADN

Se analizó el grupo filogenético al cual pertenecían los aislamientos, según lo descrito en Clermont et al., 2000. Concretamente, se realiza un PCR triple que amplifica un fragmento de ADN anónimo, denominado TSPE4C2, y dos genes, *chuA*, codificante del receptor de hemo, e *yjaA*, cuya función se desconoce. Este método permite clasificar las cepas de *E. coli* en cuatro grupos filogenéticos: A (ausencia de bandas o *yjaA*⁺), B1 (TSPE4C2⁺), B2 (*chuA*⁺ e *yjaA*⁺ o *chuA*⁺, *yjaA*⁺ y TSPE4C2⁺) y D (*chuA*⁺ o *chuA*⁺ y TSPE4C2⁺) (Clermont et al., 2000). Por otro lado, para confirmar la producción de microcina V, se amplificó un fragmento del gen *cvaC*, que codifica para el péptido antibiótico, empleando los cebadores descritos previamente (Azpiroz et al., 2009).

En todos los casos, se empleó como molde 10µL de lisado celular obtenido a partir de una ansada de una estría fresca, la cual se suspendió en agua y se incubó a 80°C por 30 minutos. Siempre se incluyó un control blanco, el cual carecía de lisado celular. Las amplificaciones fueron realizadas a un volumen final de 30µL, empleando la polimerasa DFS-Taq (#101005) de Bioron y siguiendo el protocolo del fabricante. Los cebadores usados junto a la temperatura de hibridación y el tamaño esperado del amplicón se especifican en la Tabla 1. Las reacciones de PCR se revelaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, empleando GoodView (#HGV-II) para la tinción. En cada gel se agregó el marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (#N3231S) de Biolabs. Para extraer el ADN plasmídico

se utilizó el kit NucleoSpin Plasmid (#740588) de Macherey-Nagel. Alícuotas de las extracciones se analizaron en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con GoodView. Se empleó el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (#N3232S) de Biolabs.

Tabla 1. Oligonucleótidos de síntesis empleados en este trabajo

Gen/locus	Oligonucleótido*	Secuencia (5'-3')	Extensión del amplicón	Temperatura de hibridación	Referencia
chuA	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279 pb	57°C	Clermont et al. 2000
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
yjaA	YjaA.1	TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG	211 pb		
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
TSPE4C2	TspE4C2.1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152 pb		
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			
cvaC	cvaC1	ATGAGAACTCTGACTCTAAATGAAT	302 pb	50°C	Azpiroz et al. 2009
	cvaC2	ACATCACTAAGATTATTTGGACT			

*Los oligonucleótidos de síntesis se encontraban disponibles en la Sección.

4. Resultados

En este trabajo se estudió con mayor profundidad la colección de 21 aislamientos de *E. coli* procedente de tres playas de Montevideo, obtenida previamente. A continuación se describen los resultados del análisis fenotípico y genotípico llevado a cabo en esta tesina.

4.1. Análisis del perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos

En primer lugar, se corroboró el perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos, realizando estrías en placas de medio nutriente adicionadas con distintos antibióticos. Éstos fueron los mismos que se emplearon en el estudio preliminar del PAIE, sumando ahora los antibióticos antifólicos. Concretamente, se usaron nueve antibióticos pertenecientes a seis familias diferentes: ampicilina (betalactámico), tetraciclina (tetraciclinas), estreptomina y kanamicina (aminoglucósidos), ácido nalidíxico (quinolona), cloranfenicol (fenicoles), y sulfametoxazol, trimetoprim y su combinación cotrimoxazol (antifólicos). Se consideró que un aislamiento era resistente a un antibiótico cuando presentaba un crecimiento confluyente y presencia de colonias aisladas, y sensible cuando exhibía mínima o completa ausencia de crecimiento. Como controles se incluyeron estrías de *E. coli* ATCC25922, sensible a todos los antibióticos, y de tres aislamientos de la colección de UPEC del laboratorio: 11 (resistente a AMP, SXT, STR y CHL), 74P3 (resistente a AMP, SXT, TET, STR y NAL) y 32P2 (resistente a AMP, SXT, TET, STR, KAN, CHL) (Poey et al., 2012).

Considerando que el criterio de selección de los aislamientos había sido la resistencia a ampicilina, se esperaba en todos los casos confirmar dicho fenotipo. Sin embargo, se observó la pérdida del mismo en ocho de los 21 aislamientos. Cabe notar que se intentaron recuperar células resistentes a ampicilina sembrando alícuotas de los cultivos criopreservados en placas adicionadas de este antibiótico. Sin embargo, en ninguno de los ocho casos hubo crecimiento. Muy probablemente la pérdida de la resistencia se debió a que los genes que la codifican estuvieran albergados en plásmidos que no se mantuvieron en los cultivos obtenidos para criopreservar estos aislamientos. A juzgar por los datos preliminares de resistencia antibiótica obtenidos previamente (Acuña et al., 2020), tres de estos aislamientos exhibían resistencia a estreptomina, la que ahora tampoco fue preservada en ninguno de ellos. Se confirmó además que los ocho aislamientos eran sensibles a todos los demás antibióticos ensayados (Figura 2) (Tabla 2).

De los trece aislamientos resistentes a ampicilina, la mayoría exhibió resistencia a estreptomina (11/13 85%) y a tetraciclina (9/13 70%) (Figura 2) (Tabla 2). En cuanto a la resistencia a los antifolatos, se obtuvieron ocho aislamientos (62%) resistentes a sulfametoxazol de los cuales cinco fueron también resistentes a trimetoprim y por ende a cotrimoxazol. Cabe mencionar que el 85% de los aislamientos (11/13) presentó un perfil de

multirresistencia, incluso uno (C7) exhibió resistencia a antibióticos de las seis familias relevadas. Para todos los antibióticos siempre hubo al menos un aislamiento que evidenció resistencia (Tabla 2).

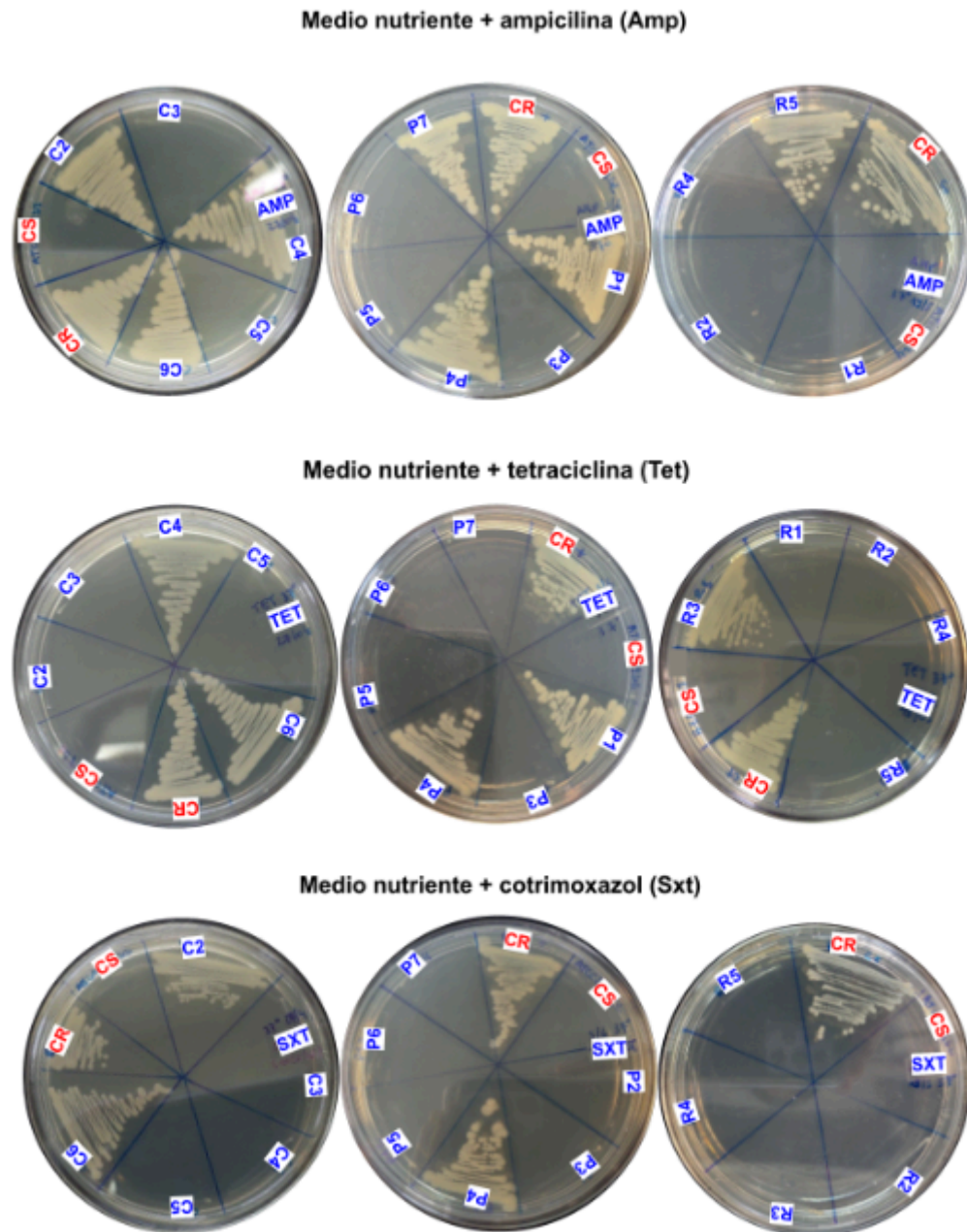


Figura 2. Estrías de algunos de los aislamientos de la colección en placas de medio nutriente adicionadas de distintos antibióticos. CS: control sensible, *E. coli* ATCC25922; CR: control resistente, UPEC 11 en placas con ampicilina y cotrimoxazol, y UPEC 74P3 en placas con tetraciclina.

Tabla 2. Perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos por la técnica de crecimiento en placa adicionada de antibiótico

	Aislamientos	Resistencia a:								
		Betalactámicos	Antifolatos			Tetraciclinas	Aminoglucósidos		Quinolonas	Cloranfenicol
		AMP	SMX	TMP	SXT	TET	STR	KAN	NAL	CHL
CERRO	C1	R	R	R	R	R	R	S	S	R
	C2	R	R	R	R	S	R	S	S	S
	C3	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	C4	R	S	S	S	R	R	S	S	S
	C5	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	C6	R	R	R	R	R	R	R	S	S
	C7	R	R	S	S	R	R	S	R	R
POCITOS	P1	R	S	S	S	R	R	S	S	S
	P2	R	R	S	S	S	R	R	R	R
	P3	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	P4	R	R	R	R	R	R	S	S	R
	P5	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	P6	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	P7	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	P8	R	S	S	S	R	R	S	R	R
RAMIREZ	R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R3	R	S	S	S	R	S	S	S	S
	R4	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R5	R	R	S	S	S	R	S	S	S
	R6	R	R	R	R	R	R	S	S	S

R: resistente, crecimiento de una estría completa; S: sensible, ausencia o mínimo crecimiento.

Para complementar el estudio de resistencia antibiótica y obtener resultados que tuvieran un valor clínico, se realizó un antibiograma para los 21 aislamientos. Concretamente, se evaluó la resistencia a las seis familias estudiadas previamente mediante el método de disco difusión. Este método permitió caracterizar el comportamiento de cada aislamiento frente a los distintos antibióticos según el diámetro del halo de inhibición del crecimiento obtenido, clasificándolos en sensibles, de resistencia intermedia o resistentes a cada antibiótico.

En este caso, los discos empleados no coincidieron exactamente con los antibióticos ensayados previamente. Para la elección se tuvieron en cuenta los estudios anteriores

sobre resistencia antibiótica de aislamientos de *E. coli* recuperados de aguas estuarinas, así como la posibilidad de confirmar y ampliar el perfil de resistencia para algunas familias antibióticas (Laroche et al., 2009; Pereira et al., 2013; Guo et al., 2018; Divya & Hatha 2019). Es así que se incluyeron otros betalactámicos (ceftazidima, cefotaxima e imipenem), aminoglucósidos (gentamicina y amikacina) y un derivado semisintético de quinolonas (ciprofloxacina). Los antibiogramas coincidieron con los datos obtenidos del crecimiento en placa para la mayoría de los antibióticos comunes a ambos ensayos (Figura 3) (Tabla 3). Además, se pudo ampliar el perfil de resistencia de algunos aislamientos a nuevos antibióticos de tres de las familias ensayadas: tres aislamientos AMP^R tuvieron un perfil extendido de resistencia, dos a cefotaxima y uno a ceftazidima; un aislamiento STR^R exhibió resistencia a gentamicina, y tres aislamientos NAL^R presentaron algún nivel de resistencia a ciprofloxacina. Asimismo, se detectaron fenotipos exclusivos de resistencia a antibióticos de dos familias: el aislamiento C3 reveló resistencia a gentamicina y el aislamiento C6 presentó una resistencia intermedia a ciprofloxacina. Cabe mencionar que ningún aislamiento exhibió resistencia a amikacina ni a imipenem, este último un antibiótico betalactámico usado como último recurso en la clínica (Bábic et al., 2006).

Es importante notar también que cuatro aislamientos que no crecían en placas con ampicilina exhibieron un halo de antibiosis con colonias dentro, lo que se interpretó como resistente (C5, P3 y P5) o intermedio (R4). Además, uno de ellos, el aislamiento P3, reveló una resistencia intermedia a tetraciclina, si bien había sido sensible a este antibiótico en la prueba de crecimiento en placa (Tablas 2 y 3).

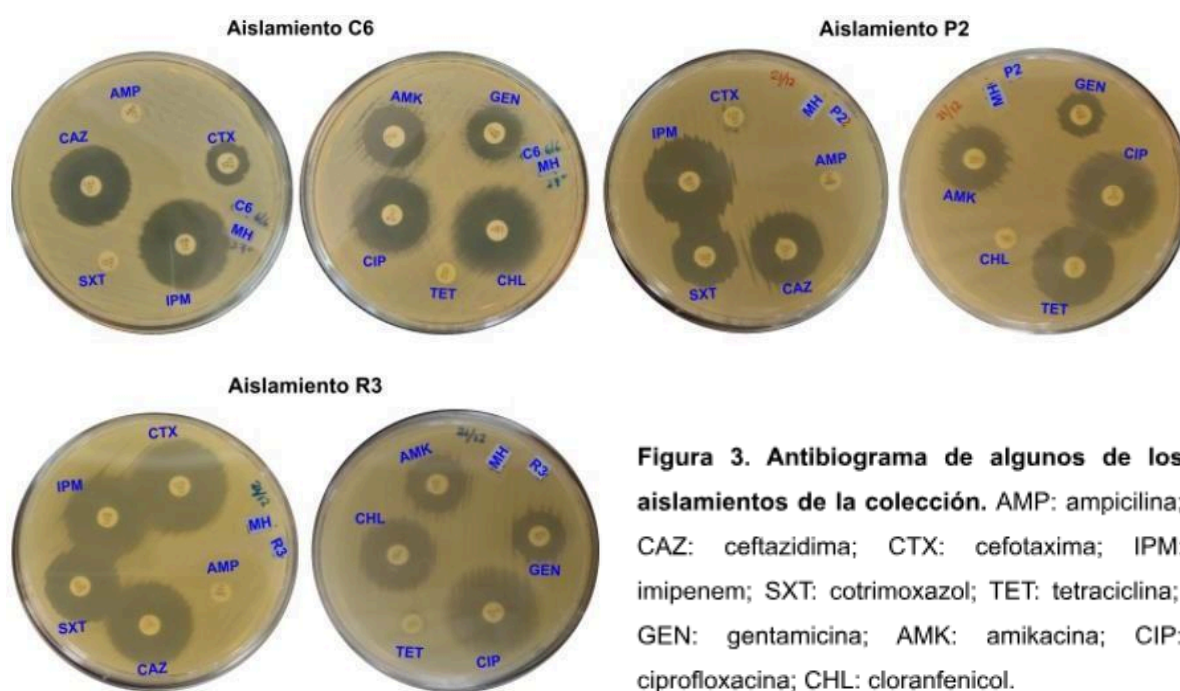


Figura 3. Antibiograma de algunos de los aislamientos de la colección. AMP: ampicilina; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; IPM: imipenem; SXT: cotrimoxazol; TET: tetraciclina; GEN: gentamicina; AMK: amikacina; CIP: ciprofloxacina; CHL: cloranfenicol.

Tabla 3. Perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos por la técnica de disco-difusión

	Aislamientos	Resistencia a:									
		Betalactámicos				Antifolatos	Tetraciclinas	Aminoglucósidos		Fluoroquinolonas	Cloranfenicol
		AMP	CTX	CAZ	IPM	SXT	TET	AMK	GEN	CIP	CHL
CERRO	C1	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
	C2	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	C3	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	C4	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
	C5	R*	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	C6	R	R	S	S	R	R	S	S	I	S
	C7	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R
POCITOS	P1	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
	P2	R	R	S	S	S	S	S	R	I	R
	P3	R*	S	S	S	S	I*	S	S	S	S
	P4	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
	P5	R*	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	P6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	P7	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	P8	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R
RAMIREZ	R1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R3	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S
	R4	I*	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R6	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S

R: resistente; I: resistencia intermedia; S: sensible

*: resultado discordante con el perfil de susceptibilidad antibiótica obtenido por la técnica de crecimiento en placa adicionada de antibiótico

4.2. Transferencia conjugativa de genes de resistencia antibiótica

Posteriormente, se evaluó si la resistencia antibiótica exhibida por los aislamientos estaba codificada por genes de resistencia contenidos en elementos genéticos móviles. Concretamente, se estudió si los aislamientos portaban plásmidos de resistencia capaces de ser transferidos por conjugación.

Como receptora se utilizó la cepa *E. coli* K12 BZB1011 $\Delta hsdR::kan$, que posee tres características útiles para el experimento de conjugación: i) deriva de W3110, una cepa cuyo genoma está totalmente secuenciado (AC: AP009048), careciendo de plásmidos; ii) es deficiente para la degradación de ADN no metilado ($\Delta hsdR$), por lo que hace posible la adquisición de material genético foráneo carente de dicha modificación, y iii) posee en su cromosoma una mutación en *gyrA*, que le otorga resistencia a ácido nalidíxico, y la inserción de un cassette de resistencia a kanamicina (*kan*) sustituyendo al gen *hsdR*, proveyendo así de dos marcadores de contraselección para los experimentos de conjugación (NAL^R y KAN^R). Se utilizó la resistencia a kanamicina como contraselección en todos los casos, por lo que los aislamientos resistentes a este antibiótico no fueron analizados (C6 y P2). Asimismo, los aislamientos NAL^R C7 y P8 se estudiaron en cuanto a la transferencia de sus resistencias, excepto la correspondiente a ácido nalidíxico, por ser la cepa receptora resistente a este antibiótico.

Primero, se realizó un relevamiento de la transferencia conjugativa de todas las resistencias de cada aislamiento, de modo de tener un panorama general acerca de la localización de los genes de resistencia en elementos genéticos móviles. Para ello, se empleó la técnica de cross-streaking, sembrando por duplicado las parejas aislamiento-cepa receptora en distintas placas, cada una suplementada con kanamicina más uno de los antibióticos para los que ese aislamiento era resistente. Por ejemplo, para el aislamiento R3 (AMP^R, TET^R) se hicieron dos placas de cross-streaking: LB KAN AMP, y LB KAN TET. Cabe señalar que la transferencia de resistencia a antifolatos se realizó empleando trimetoprim como antibiótico de selección. Aunque en este caso la cepa receptora era capaz de crecer unas pocas generaciones ("leaky"), el crecimiento de un clon resistente se diferenció claramente. En aquellos experimentos en los que surgieron colonias en la zona de cruce entre ambos parentales, se tomaron entre dos y cinco para evaluar si se trataban de verdaderos transconjugantes (Figura 4). Primero, se realizaron estrías a partir de estas colonias en placas con la correspondiente doble presión antibiótica (selección y contraselección), junto con estrías de las cepas parentales. Se consideró que se trataba de un clon transconjugante cuando la estría presentó un crecimiento confluyente y presencia de colonias aisladas frente a la ausencia de crecimiento de los parentales. Además, estos clones se ensayaron para su crecimiento en LB NAL, de modo de confirmar que las resistencias se encontraban en el contexto genético BZB1011 $\Delta hsdR::kan$. Cabe señalar que esta última prueba no pudo realizarse para los transconjugantes derivados de P8 ya que este aislamiento era NAL^R.

Se confirmó el surgimiento de transconjugantes a partir de cuatro aislamientos (C2, P7, P8 y R3) y, excepto para P8, aparecieron colonias para todas las resistencias exhibidas por cada aislamiento. Cabe señalar que en todos los casos los transconjugantes presentaron muy

buen crecimiento. Concretamente, se obtuvieron transconjugantes: AMP^R, STR^R y TMP^R derivados de C2 (denominados Tc C2); AMP^R derivados de P7 (denominados Tc P7), y AMP^R y TET^R derivados de R3 (denominados Tc R3). En el caso del aislamiento P8, si bien presentaba resistencia a AMP, TET, STR y CHL, solo se obtuvieron transconjugantes AMP^R. Posteriormente, se realizó un chequeo cruzado de las resistencias antibióticas de los transconjugantes, i.e. cada tipo de transconjugante fue evaluado para las otras resistencias antibióticas portadas por el aislamiento que le dio origen. Este análisis se llevó a cabo para tres de los cuatro tipos de transconjugantes, ya que el aislamiento P7 sólo exhibió resistencia a AMP. Dado que C2 es SXT^R, los tres Tc C2 (AMP^R, TMP^R, STR^R) se estriaron en medio con este antibiótico, resultando ser todos SXT^R, o sea SMX^R además de TMP^R. Asimismo, todos fueron AMP^R y STR^R, i.e. los Tc C2 AMP^R fueron STR^R, y los Tc C2 STR^R fueron AMP^R. En el caso de los Tc P8 AMP^R, todos fueron TET^R y STR^R, pero mantuvieron la sensibilidad a CHL de la cepa receptora. Por último, los Tc R3 AMP^R y los Tc R3 TET^R fueron resistentes a TET y a AMP, respectivamente.

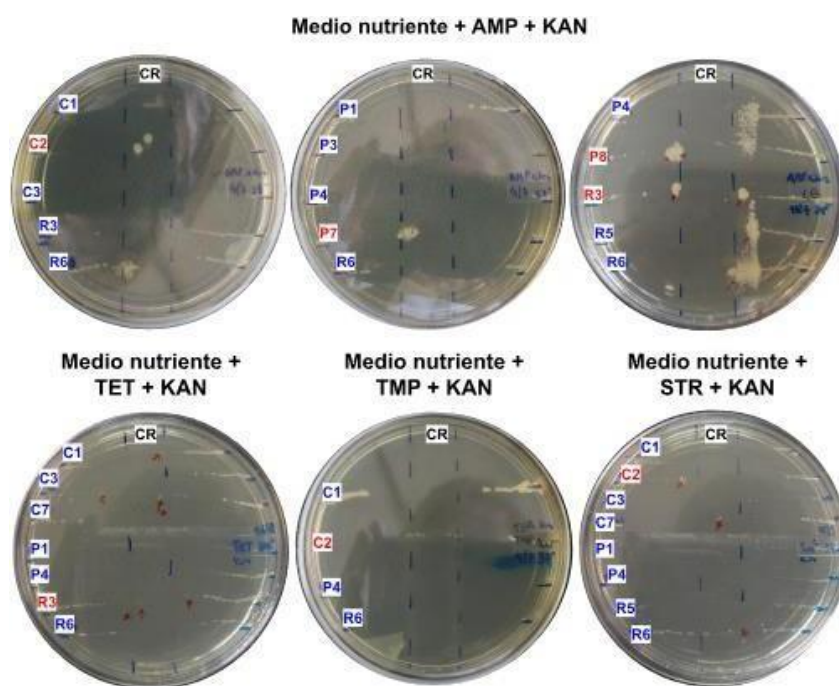


Figura 4. Análisis de la transferencia conjugativa de los genes de resistencia portados por los aislamientos mediante el método de cross-streaking. CR: cepa receptora BZB1011 Δ hsdR::kan, sembrada como listón. En rojo se indican los aislamientos a partir de los que se obtuvieron transconjugantes.

Una vez evidenciada la transferencia conjugativa de genes de resistencia en algunos aislamientos de la colección, se profundizó su estudio en tres de ellos, asegurando un representante de cada playa. Para ello, se realizaron experimentos de conjugación a partir

de cultivos de las cepas parentales, según se describe en materiales y métodos. El análisis de la transferencia de cada resistencia antibiótica se realizó sembrando alícuotas (50-100µL) del experimental y de los dos controles en una misma placa para la correspondiente selección (Figura 5). Cabe señalar que al estar sembrando un número elevado de células parentales (más de 10^6 ufc/mL) fue necesario incrementar la concentración de algunos antibióticos en las placas para impedir su crecimiento. Es así que, se usó siempre 60µg/mL (2x) de kanamicina, marcador de contraselección, 20µg/mL (2x) de estreptomina y 200µg/mL (2x) de trimetoprim. Para ampicilina y tetraciclina se mantuvo la concentración empleada en el cross-streaking, ya que era suficiente para impedir el crecimiento de los parentales. Para cada experimento se monitorizó el crecimiento de los cultivos parentales por DO_{600} y al llegar a la densidad óptica estipulada se realizó un recuento de viables de cada uno y se procedió a realizar la conjugación (Tabla 4).

En el caso de la conjugación C2 x BZB1011 $\Delta hsdR::kan$, se obtuvo un importante número de transconjugantes para las tres resistencias portadas por C2 (AMP^R , STR^R , TMP^R). Fue necesario entonces realizar diluciones de la mezcla experimental para poder contar el número de transconjugantes, el que fue similar para cada tipo de selección (Figura 5) (Tabla 4). Por lo tanto, la eficiencia de conjugación para cada marcador del aislamiento C2 fue parecida y alta, del orden de uno a dos transconjugantes cada 100 células donantes (Tabla 4). Se purificaron 10 clones transconjugantes de cada selección mediante dos estrías sucesivas en el mismo medio en el que fueron obtenidos, para luego corroborar su resistencia a NAL. Se realizó el chequeo cruzado de las resistencias no seleccionadas, evaluando, al igual que en el cross-streaking, la resistencia a ambos antifolatos (TMP y SMX) por el crecimiento en LB SXT. Los transconjugantes de cada selección portaron las tres resistencias antibióticas (AMP^R , SXT^R , STR^R) (Tabla 4).

En cuanto a la conjugación P7 x BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ se obtuvieron transconjugantes AMP^R en alta cantidad, siendo necesario sembrar una dilución de la mezcla experimental para realizar el conteo (Figura 5). La eficiencia de conjugación estimada se encontró en el orden de seis transconjugantes cada 10 mil donantes (Tabla 4). Si bien aquí el aislamiento donante tenía una sola resistencia y no procedía hacer un chequeo cruzado, se purificaron cinco clones y se analizó su resistencia a NAL, confirmando que eran transconjugantes.

Por último, la conjugación de R3 x BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ generó clones transconjugantes para las dos resistencias portadas por R3 (AMP^R , TET^R) (Figura 5). En este caso no fue necesario hacer diluciones ya que crecieron unas pocas decenas de transconjugantes, y por lo tanto la eficiencia fue baja, estimándose un transconjugante cada un millón de células donantes (Tabla 4). Se purificó y corroboró la resistencia a NAL de nueve clones de cada selección, y se realizó el chequeo cruzado. Los Tc R3 AMP^R fueron todos TET^R y los Tc R3 TET^R fueron todos AMP^R .

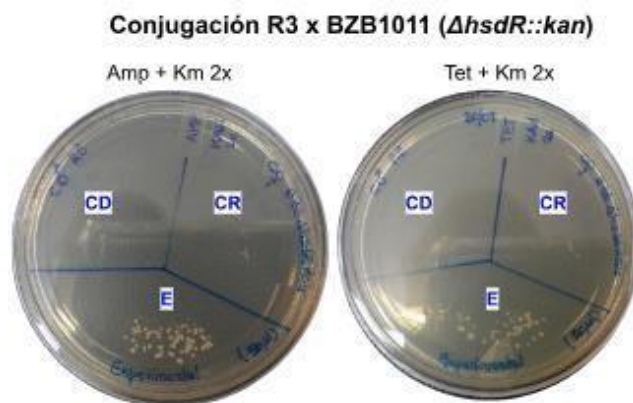
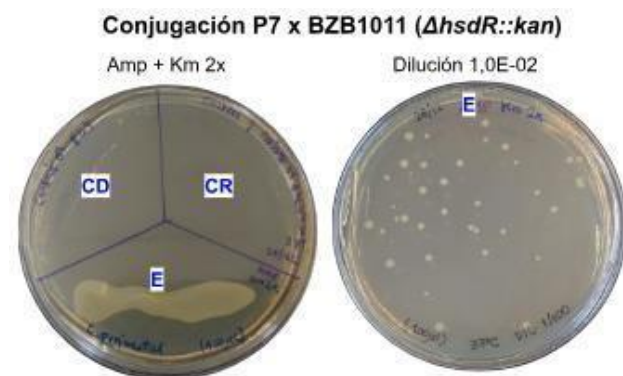
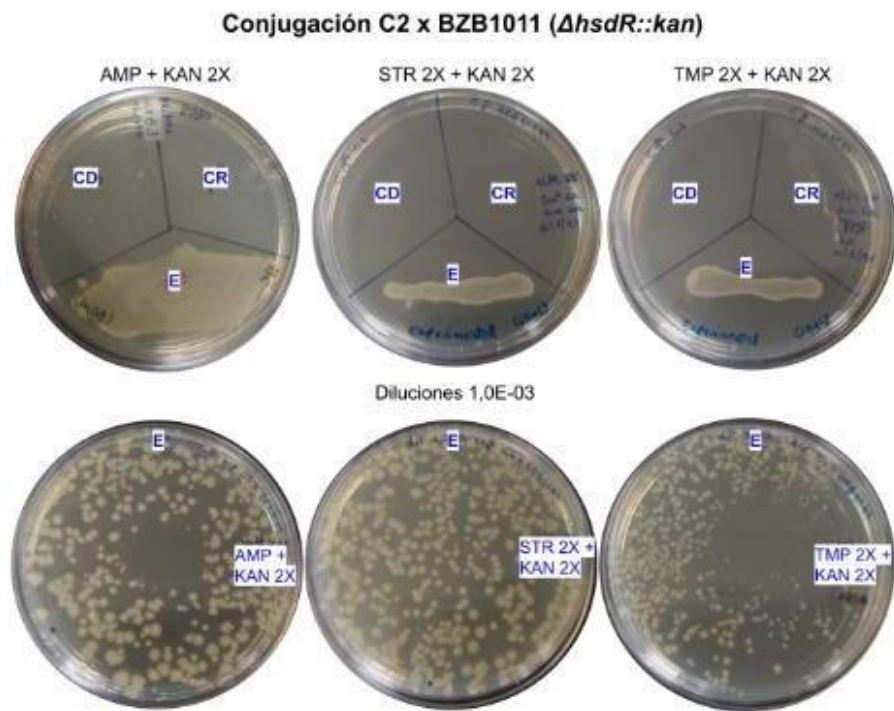


Figura 5. Transferencia conjugativa de genes de resistencia antibiótica portados por tres aislamientos. CD: aislamiento donante en la conjugación, CR: BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ cepa receptora en la conjugación, E: experimental, mezcla de cepas parentales (CD y CR).

Tabla 4. Transferencia conjugativa de genes de resistencia antibiótica de tres aislamientos

Aislamiento (resistencias antibióticas)	Selección	Resistencias antibióticas transferidas	ufc/mL de receptora puestos a conjugar ^(a)	ufc/mL de donantes puestos a conjugar ^(b)	ufc/mL de transconjugantes	Frecuencia de conjugación ^(c)
C2 (AMP, STR, SXT)	AMP ^R	AMP, STR, SXT	3,00E+08	2,00E+08	3,30E+06	1,65E-02
	STR ^R				3,40E+06	1,70E-02
	TMP ^R				3,20E+06	1,60E-02
P7 (AMP)	AMP ^R	AMP		6,00E+07	3,80E+04	6,30E-04
R3 (AMP, TET)	AMP ^R	AMP, TET		1,40E+09	1,50E+03	1,07E-06
	TET ^R				9,20E+02	6,57E-07

^(a)4 x ufc/mL de cultivo de receptora/volumen total de conjugación (5mL); ^(b)ufc/mL de cultivo de donante/volumen total de conjugación (5mL); ^(c)ufc/mL de transconjugantes/ufc/mL de donantes puestos a conjugarse.

En suma, los resultados obtenidos en estos experimentos generaron datos acerca de la frecuencia de transferencia de la resistencia de los tres aislamientos estudiados. Además, se observó una total asociación de las resistencias antibióticas en C2 y R3.

Para obtener indicios acerca de los elementos móviles responsables de la transferencia, se llevó a cabo el análisis del contenido plasmídico de los transconjugantes. Concretamente, se realizó una extracción plasmídica a partir de cultivos en LB AMP de un clon transconjugante de cada tipo derivado de los aislamientos C2, P7 y R3. Como controles se incluyeron extracciones plasmídicas a partir de cultivos de la cepa receptora (en LB) y de los aislamientos donantes (todos en LB AMP). Como era esperado, BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ no evidenció ninguna banda en los geles, ya que carece de plásmidos. En el caso de los Tc C2, los clones de las tres selecciones (AMP^R, STR^R, SXT^R) en principio mostraron el mismo perfil plasmídico que el aislamiento donante: se observaron bandas de poca migración (Figura 6). En el caso de Tc P7, se observó el mismo perfil plasmídico que el donante: se trataría de uno o más plásmidos grandes (Figura 6). Por último, los Tc R3 de ambas selecciones (AMP^R, TET^R) retuvieron parcialmente el perfil plasmídico de su correspondiente donante: presentaron sólo la banda de mayor tamaño observada en R3 (Figura 6).

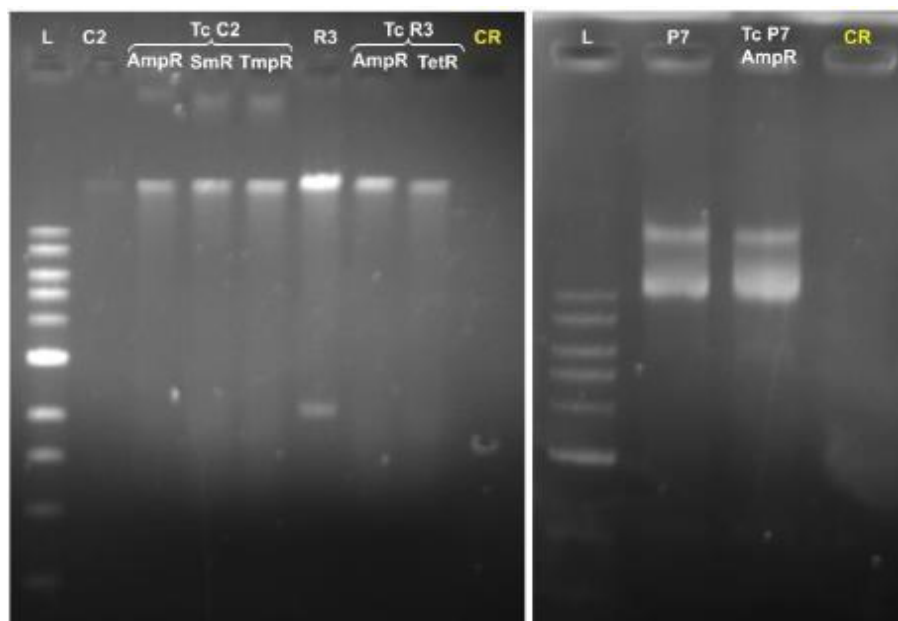


Figura 6. Perfil plasmídico de los aislamientos donantes y sus correspondientes transconjugantes. Geles de agarosa de 0,8%, se resuelven 15µL de cada extracción plasmídica. L: 1kb DNA Ladder; CR: BZB1011 Δ hsdR::kan.

4.3. Análisis del grupo filogenético y de la producción de microcinas de clase II de los aislamientos

Como se mencionó en la introducción, dentro de la microbiota intestinal pueden residir patógenos intestinales y extraintestinales de *E. coli*, por lo que en este trabajo se incluyó un análisis que diera indicios acerca del posible potencial de virulencia portado por los aislamientos de la colección. Se eligió analizar el grupo filogenético al cual pertenecían los aislamientos así como su capacidad de producir microcinas de clase II, un atributo de urovirulencia postulado por nuestro grupo (Azpiroz et al., 2009). En este sentido, en la Sección se ha estudiado con profundidad una colección de aislamientos de *E. coli* causantes de infecciones del tracto urinario (UPEC), por lo que se disponía de herramientas biológicas y moleculares para realizar los dos análisis elegidos (Poey et al., 2012).

En cuanto al grupo filogenético, la mayor cantidad de aislamientos fueron A o B1, mientras que dos se asignaron al grupo D y sólo uno al B2 (Figura 7). Cabe mencionar que fue necesario poner a punto la PCR múltiple, repitiendo la reacción varias veces en el caso de algunos aislamientos, para confirmar los resultados.

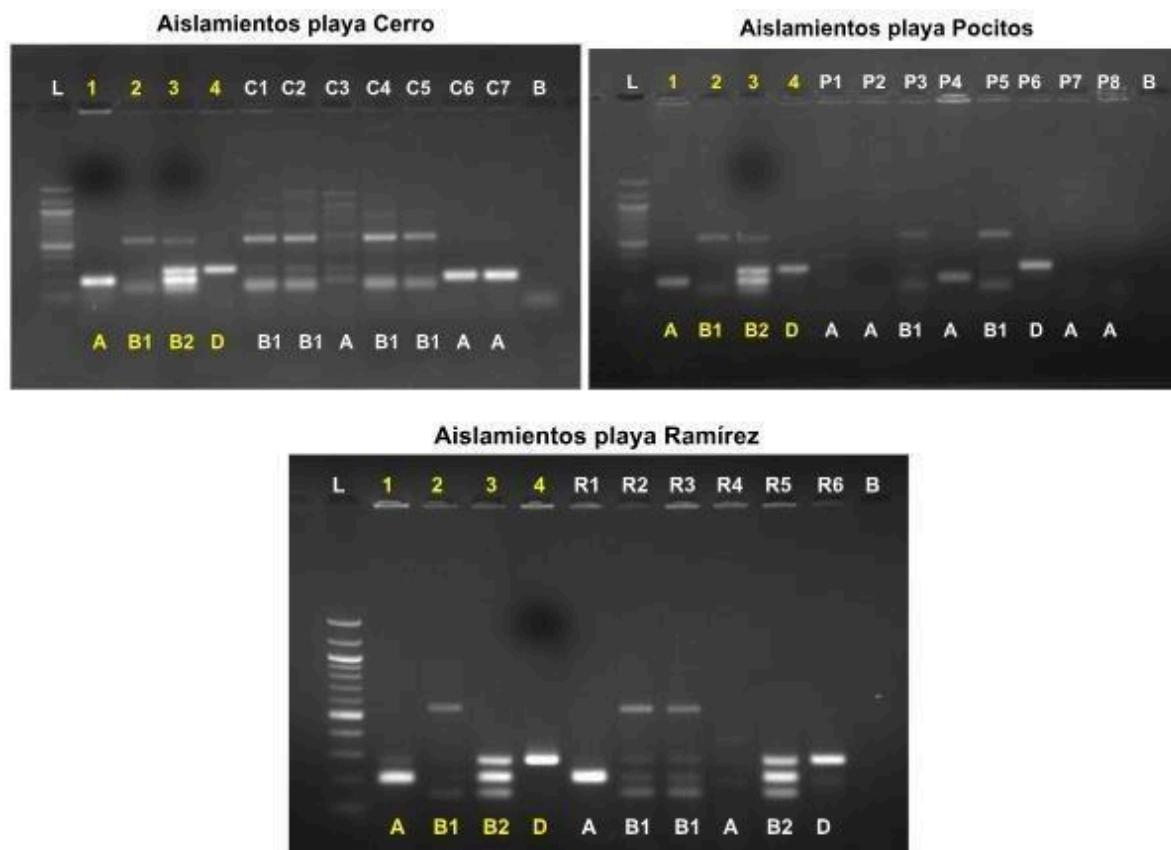


Figura 7. Filogenia de los aislamientos de la colección. Geles de agarosa de 2%; se resuelven 15µL de cada reacción. Amplificación de los fragmentos *chuA*, *yjaA* y TSPE4C2, según se consigna en materiales y métodos. En amarillo (pocillos 1-4) se indican las cepas control para cada grupo filogenético. L: 100bp DNA Ladder (2µL); B: control blanco.

Teniendo en cuenta que las microcinas de clase II emplean la vía de captación de los sideróforos de tipo catecol, su análisis se basó en detectar la vía de ingreso de las producciones antibióticas a las células susceptibles. Para ello, se realizaron en paralelo picadas de todos los aislamientos sobre tres tapices indicadores que diferían en los receptores para catecoles: MC4100 (Cir⁺, Fiu⁺, FepA⁺), FGB1876 (Cir⁻, Fiu⁻, FepA⁻) y FGB202 (Cir⁻, Fiu⁺, FepA⁺) (Figura 8). El primero permitió evaluar si los aislamientos producían alguna bacteriocina, ya sea microcinas de clase II u otras. Cinco aislamientos, distribuidos en las tres playas, generaron halos de inhibición del crecimiento del tapiz MC4100, evidenciando su capacidad de producir antibiótico (Figura 8). Este resultado fue validado por las tres cepas control productoras de microcinas de clase II que generaron halos de antibiosis. El tapiz triple mutante de receptores FGB1876 dio información acerca de si alguna de las producciones correspondía a una microcina de clase II. Tal cual se esperaba, las cepas control productoras de este tipo de bacteriocinas no generaron halos de antibiosis ya que el tapiz carecía de los receptores para su captación. Dentro de los

cinco aislamientos productores, cuatro no generaron halo de antibiosis, y uno dio lugar a un halo menor sobre el tapiz triple mutante de receptores (Figura 8). Este resultado indicó que los cinco aislamientos producían alguna microcina de clase II: C4, C6, C7 y R3 de forma exclusiva, mientras que P2 lo haría junto con una bacteriocina no perteneciente a este grupo. Por último, a través de la prueba sobre el tapiz FGB202, Cir⁻, se pudo determinar si se estaba en presencia de una microcina modificada o no modificada. Cabe recordar que las primeras utilizan cualquiera de los tres receptores de catecoles, mientras que las segundas ingresan exclusivamente por el receptor Cir. La ausencia de halo de antibiosis sobre esta cepa mutante evidenciaría la producción de una microcina no modificada, mientras que de continuar observándose un halo se estaría en presencia de una microcina modificada. En el caso de las cepas control *E. coli* H47 y *E. coli* CFT073, productoras de microcinas modificadas, se generó un halo de antibiosis dado que eran captadas por los receptores Fiu y FepA. Por su parte, MC4100 (pUCYC5-MccV) evidenció la ausencia total de halo, ya que MccV utiliza únicamente el receptor Cir para ser captada. En relación a los aislamientos, hubo una completa ausencia de halo de inhibición del crecimiento sobre el tapiz de FGB202 en el caso de C6, C7 y R3, con lo cual estarían produciendo una microcina de clase II no modificada. El aislamiento P2 generó un halo de antibiosis menor al observado sobre el tapiz triple mutante, lo que indicaría que produce una microcina no modificada, además de una bacteriocina diferente a las microcinas de clase II. En cuanto al aislamiento C4, se generó un halo menor al obtenido sobre el tapiz salvaje, lo que indicaría que produce una microcina modificada (Figura 8). Por último, se analizó para los aislamientos C6, C7, P2 y R3 si la microcina no modificada que producían era MccV, dado que se trata de una microcina distribuida ampliamente en cepas de *E. coli*, y para la que se disponía de herramientas de detección en el laboratorio. Concretamente, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento del gen *cvaC*, que codifica para el péptido antibiótico (Azpiroz et al. 2009). En esta reacción se incluyó la amplificación a partir de una cepa no productora y de una productora de MccV. Tanto MC4100 (pUCYC5-MccV) como C6, C7, P2 y R3 generaron el amplicón *cvaC* de 302pb, concluyendo que los cuatro aislamientos eran productores de microcina V (Figura 9).

Dado que el aislamiento R3, productor de microcina V, fue capaz de transferir por conjugación sus resistencias antibióticas, se evaluó si también transfería horizontalmente la producción de la microcina. Para ello se realizó un análisis de producción de los transconjugantes en el que todos ellos (los AMP^R y los TET^R) generaron halos de antibiosis, i.e. habían adquirido por conjugación el sistema genético MccV.

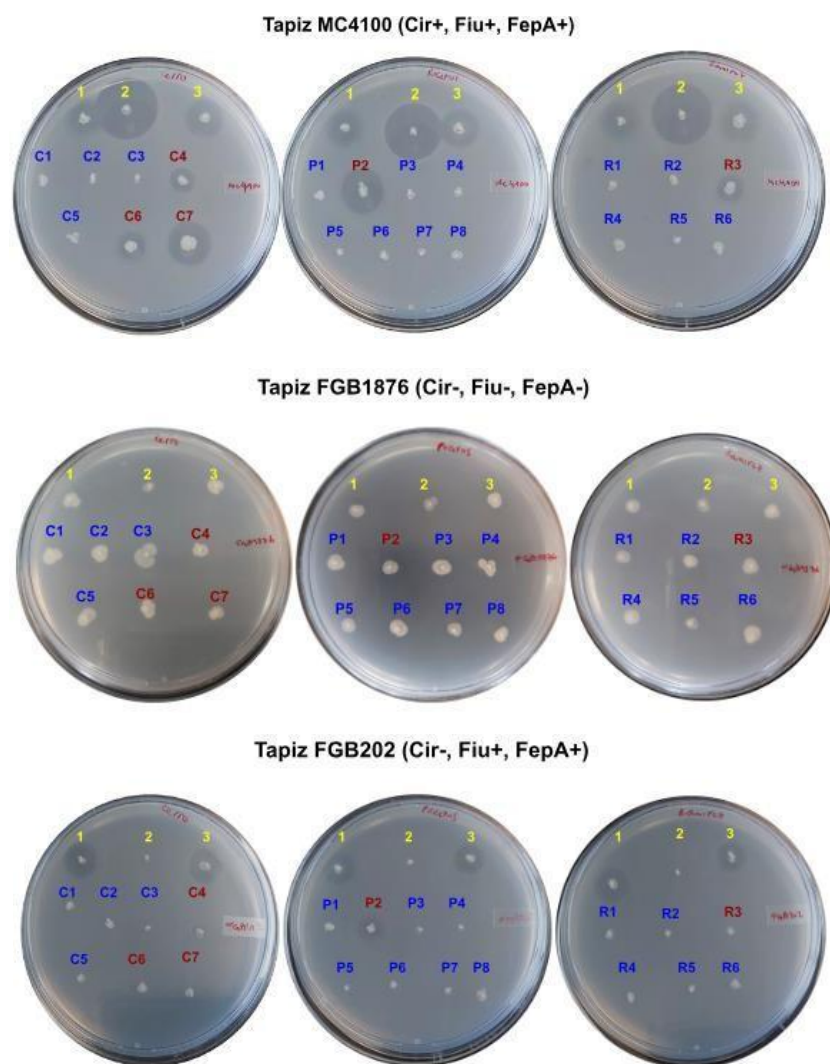


Figura 8. Análisis de la producción de microcinas de clase II en los aislamientos de la colección.

Test de picada sobre tapiz de distintas cepas indicadoras de *E. coli* K12. Picadas de cepas control: (1) *E. coli* H47 (productora de microcina modificada), (2) MC4100 (pUCYC5-MccV) (productora de la microcina no modificada MccV) y (3) *E. coli* CFT073 (productora de microcina modificada). En rojo se indican los aislamientos que generaron halo de antibiosis sobre alguno de los tapices.

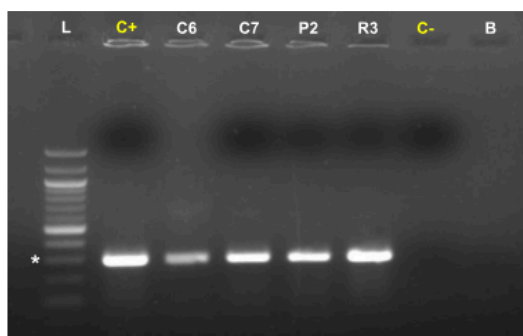


Figura 9. Amplificación del gen *cvaC*. Gel de agarosa de 2%; se resuelven 15µL de cada reacción. L: 100bp DNA Ladder (2µL); C+: MC4100 (pUCYC5-MccV); C-: BZB1011 ($\Delta hsdR::kan$); B: blanco; *: 300pb.

En suma, en este trabajo se caracterizó una colección de aislamientos de *E. coli* recuperada de agua de tres playas de Montevideo. Concretamente, se determinó el perfil de resistencia antibiótica, el potencial de diseminación horizontal de los genes de resistencia, el grupo filogenético y la producción de microcinas de clase II de los aislamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Características de la colección de aislamientos de *E. coli*

	Aislamientos	Resistencias antibióticas	Grupo filogenético	Producción de bacteriocinas
CERRO	C1	AMP, SXT, TET, STR, CHL	B1	-
	C2	AMP, SXT, STR	B1	-
	C3	GEN	A	-
	C4	AMP, TET, STR	B1	Mcc
	C5	AMP	B1	-
	C6	AMP, CTX, SXT, TET, STR, KAN	A	MccV
	C7	AMP, SMX, TET, STR, NAL, CIP, CHL	A	MccV
POCITOS	P1	AMP, TET, STR	A	-
	P2	AMP, CTX, SMX, STR, KAN, GEN, NAL, CHL	A	X + MccV
	P3	AMP	B1	-
	P4	AMP, SXT, TET, STR, CHL	A	-
	P5	AMP	B1	-
	P6	-	D	-
	P7	AMP	A	-
	P8	AMP, TET, STR, NAL, CIP, CHL	A	-
RAMIREZ	R1	-	A	-
	R2	-	B1	-
	R3	AMP, CAZ, TET	B1	MccV
	R4	AMP	A	-
	R5	AMP, SMX, STR	B2	-
	R6	AMP, SXT, TET, STR	D	-

X: bacteriocina no perteneciente a la familia de microcinas de clase II; Mcc: microcina de clase II no identificada; verde: resistencias antibióticas transferidas por conjugación.

5. Discusión

En este trabajo se realizó el análisis de una colección de aislamientos de *E. coli* procedentes de aguas del Río de la Plata, a nivel de las playas de Montevideo. Fundamentalmente, el estudio se enfocó en determinar el perfil de resistencia antibiótica de los aislamientos y evaluar posteriormente la capacidad de transferencia horizontal de los correspondientes genes de resistencia. Esta información nos resultaba interesante ya que las playas de Montevideo reciben aguas residuales procedentes de la red de saneamiento de la ciudad luego de ser sometidas a un proceso de pretratamiento. Existen numerosos estudios que dan cuenta de que los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales son una de las fuentes más importantes de diseminación de bacterias resistentes y de genes de resistencia en el ambiente (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015; Yan et al., 2017; Karkman et al., 2018). Es así que, bacterias de la microbiota intestinal de humanos y animales, así como antibióticos y otros agentes tóxicos, estarían siendo vertidos al Río de la Plata, alcanzando las playas de Montevideo. Dado que se trata de un ambiente donde se desarrollan actividades recreativas, las autoridades municipales realizan el control sanitario de las playas para informar a la población si están o no habilitadas para baño (Informe IM, 2022-2023). Dicho relevamiento se limita a un recuento de bacterias indicadoras de contaminación fecal, no habiendo hasta el momento un estudio que analice la resistencia antibiótica de los aislamientos recuperados. No obstante, existen dos estudios metagenómicos que analizaron la presencia de bacterias del microbioma intestinal, de genes de resistencia antibiótica y de virulencia tanto en puntos de la red de saneamiento como en las playas de Montevideo (Fresia et al., 2019; Salazar et al., 2022). En ambos casos se evidenció una alta carga de genes de resistencia y de virulencia en las muestras procedentes del saneamiento, e incluso en el último trabajo se asoció un aumento en la abundancia de genes codificantes para betalactamasas con un brote hospitalario de un clon de *K. pneumoniae* multirresistente. En relación a las playas, en Fresia et al. si bien no se evidenció una alteración de la comunidad bacteriana propia de este ambiente, sí se detectaron algunos genes de resistencia antibiótica y de virulencia. Cabe señalar que a partir de este estudio se obtuvieron de la playa Ramírez dos aislamientos clasificados como *E. cloacae*, siendo reportado que el genoma de uno de ellos fue secuenciado (Antelo et al., 2018). No obstante, dicha secuencia no tiene asignado un número de acceso en los bancos de datos por lo que no es posible analizar si contiene genes de virulencia y/o de resistencia antibiótica. En el caso del segundo trabajo, se detectó un incremento del impacto antrópico en las muestras recolectadas en 2017 de tres playas en relación a las previas de 2016. Es así entonces que el presente trabajo constituye el primer estudio experimental en el que se aíslan bacterias entéricas con resistencia antibiótica en aguas de playas de la ciudad. Cabe señalar que es un análisis preliminar ya que está acotado al estudio de una pequeña

colección de aislamientos de *E. coli* obtenida a partir de agua de tres playas de Montevideo, recolectada y procesada un único día en 2020. Además, la colección relevada fue seleccionada por su resistencia a ampicilina, por lo que no se puede determinar el porcentaje que representa del total de cepas de *E. coli* presentes en esas muestras (ya sea sensibles o resistentes a otros antibióticos). Sumado a esto, al iniciar el estudio detectamos que ocho de los veintiún aislamientos habían perdido la resistencia a ampicilina por lo que se habían tornado sensibles. A pesar de ello, los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo con los estudios llevados a cabo en otros estuarios con impacto antrópico (Lourenco et al., 2007; Laroche et al., 2009; Pereira et al., 2013; Diab et al., 2018; Guo et al., 2018; Divya & Hatha, 2019). Al igual que en la mayoría de estas descripciones, el perfil de resistencia de nuestra colección fue amplio, abarcando diferentes familias de antibióticos y detectando aislamientos multirresistentes (Tablas 2 y 3). En particular, un alto número de los aislamientos resistentes a ampicilina fueron también resistentes a estreptomicina, tetraciclina y sulfametoxazol, lo que coincide con la alta prevalencia de la resistencia a antibióticos de estas cuatro familias en aislamientos de *E. coli* recuperados de otros estuarios así como de la microbiota intestinal de pacientes enfermos y de distintos animales de cría de nuestro país (Pereira et al., 2013; Divya & Hatha, 2019; Coppola et al., 2020; Papa-Ezdra et al., 2021).

Si bien en este estudio no se analizaron los mecanismos de resistencia desarrollados por los aislamientos, ciertos fenotipos permiten inferir algunos de ellos. En primer lugar, se encontró resistencia a ampicilina y a las cefalosporinas de tercera generación cefotaxima y ceftazidima, lo que estaría evidenciando la expresión de una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) por parte de algunos aislamientos (Tabla 3). Este resultado experimental concuerda con la detección previa de genes codificantes para betalactamasas de espectro extendido en las playas de Montevideo (Fresia et al., 2019). Sin embargo, no se encontró indicios de la presencia de carbapenemasas ya que ninguno de los aislamientos de la colección exhibió resistencia a imipenem (Tabla 3). Cabe recordar que genes para dichas betalactamasas fueron detectados en muestras de playa y de saneamiento del 2017, y asociado a un brote hospitalario de un clon multirresistente de *K. pneumoniae* (Salazar et al., 2022). En cuanto a los aminoglucósidos, en la colección se encontró resistencia para tres de los cuatro antibióticos analizados de esta familia: la mayoría de los aislamientos fueron resistentes a estreptomicina y algunos pocos a kanamicina y gentamicina (Tablas 2 y 3). Dado que el perfil de resistencia a los distintos aminoglucósidos denota la acción de diferentes enzimas modificadoras (Ramírez et al., 2010), muy probablemente dentro de la colección haya aislamientos que portan genes codificantes para enzimas que alteran de diferente forma la molécula antibiótica. En este sentido, en el estudio metagenómico se detectó el gen que codifica para una fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina

y a neomicina (Fresia et al., 2019). En relación a los antibióticos antifólicos, la resistencia conjunta a sulfamida y trimetoprim exhibida por varios aislamientos podría indicar la presencia de genes *sul* y *dfrA*, respectivamente (Sköld, 2001; De los Santos, 2021). En el caso de las quinolonas, un aislamiento (C6) sensible al ácido nalidíxico exhibió resistencia intermedia a ciprofloxacina, lo que sugiere que dicho fenotipo puede estar dado por la expresión de una enzima modificadora de la fluoroquinolona (gen *aac (6')-Ib-cr*), o por la acción de una bomba de eflujo de tipo QepA (Robicsek et al., 2005; Perichon et al., 2007). En cuanto a la interpretación de la susceptibilidad a ampicilina para los aislamientos C5, P3, P5 y R4, la diferencia se podría adjudicar a los distintos niveles cuantitativos de antibiótico empleados en ambos ensayos (Tablas 2 y 3). Cabe mencionar que, a excepción de los genes para betalactamasas de espectro extendido y aminoglucósidos, no se registró la presencia de genes de resistencia para ninguno de los otros antibióticos en el análisis metagenómico de las muestras de agua de playas de 2016 (Fresia et al., 2019). No obstante, en dicho estudio se detectaron genes de resistencia a elfamicina de forma exclusiva en las playas. Este antibiótico, producido por cepas de *Streptomyces* sp. que inhibe la síntesis proteica, no se usa como quimioterápico antimicrobiano en la clínica pero sí como promotor de crecimiento de animales de granja (Butaye et al., 2003; Prezioso et al., 2017). No se descarta que en nuestra colección pueda haber aislamientos resistentes a este antibiótico para lo cual sería necesario realizar una búsqueda de los correspondientes genes de resistencia, ya que no se dispone comercialmente de discos con este antibiótico. En cuanto al relevamiento de las playas en 2017, no es posible hacer una comparación con nuestros resultados ya que, si bien se detectaron genes de resistencia para las familias antibióticas aquí analizadas, no se muestra específicamente cuáles fueron encontrados en cada sitio muestreado (Salazar et al., 2022).

Luego de constatar la presencia de aislamientos de *E. coli* resistentes a varios tipos diferentes de antibióticos en las playas, el trabajo se enfocó en estudiar la capacidad de transferencia horizontal de los genes de resistencia. Este análisis nos resultaba interesante dado que la localización de genes de resistencia en elementos genéticos móviles daría información acerca del potencial de diseminación horizontal de los mismos. Este aspecto está poco estudiado en el caso de aislamientos de *E. coli* resistentes a antibióticos recuperados del agua de estuarios. Se encontró un solo reporte en el que se demuestra la transferencia conjugativa de genes de resistencia a tetraciclina localizados en plásmidos portados por aislamientos de aguas estuarinas (Henriques et al., 2008). En nuestro trabajo se demuestra que algunos aislamientos de *E. coli* fueron capaces de transferir por conjugación todos o la mayoría de sus genes de resistencia a una cepa de *E. coli* K12. Más aún, se analizó la frecuencia de transferencia, resultando ser alta para dos de los tres aislamientos ensayados (C2 y P7). No obstante, no se descarta que la baja eficiencia

observada en el caso del aislamiento R3, productor de MccV, se deba al efecto bactericida del antibiótico sobre BZB1011 $\Delta hsdR::kan$, disminuyendo así las células receptoras en esta conjugación. Además, se constató la asociación entre resistencias antibióticas: todos los transconjugantes Tc C2 y Tc R3 fueron resistentes a los demás antibióticos transferidos, independientemente de la resistencia seleccionada (Tabla 4). En el caso del aislamiento R3 se obtuvo más información: el sistema genético MccV fue transferido por conjugación junto con ambas resistencias antibióticas ya que todos los transconjugantes fueron productores. Estas asociaciones entre resistencias antibióticas, e incluso entre resistencias y la producción de microcina, indicarían que muy probablemente los genes involucrados están contenidos en un mismo plásmido, ya sea conjugativo o movilizable, o en diferentes plásmidos que se co-moviliza con alta frecuencia. En este sentido, el análisis del contenido plasmídico de los donantes y de sus correspondientes transconjugantes nos dio indicios acerca de la localización de los genes transferidos: en todos los casos estarían formando parte de plásmidos grandes (Figura 6). Además, se demostró que el plásmido pequeño portado por R3 no está vinculado a sus resistencias (AMP y TET), ya que el perfil plasmídico de los transconjugantes no lo contuvo. Si bien los transconjugantes derivados de un mismo aislamiento (C2 y R3) presentaron a priori el mismo perfil plasmídico independientemente de la resistencia seleccionada, se deben llevar a cabo más estudios para precisar la localización de los genes transferidos.

Estas asociaciones de genes de resistencia que se movilizan como una unidad harían posible que en un único evento de transferencia horizontal la bacteria receptora adquiriera varios atributos de resistencia antibiótica. Cabe señalar que en este trabajo como en el de Henriques et al. los experimentos de conjugación se realizaron en condiciones de laboratorio. Es así entonces que no se puede inferir a priori que pueda estar ocurriendo diseminación horizontal de la resistencia en condiciones naturales, i.e. en el agua de las playas. En este sentido, existen algunos trabajos que analizan cómo afectan los factores abióticos y bióticos (temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad, materia orgánica, etc.) la transferencia conjugativa en aislamientos de *E. coli* de aguas (Altherr et al., 1982; Mach & Grimes, 1982; Trevors & Oddie, 1986; Fernández et al., 1992). Éstos dan cuenta de que la conjugación puede llevarse a cabo en un amplio rango de condiciones, incluso en aquellas adversas como ausencia de nutrientes y bajas temperaturas. Por lo tanto, no se descarta que la transferencia conjugativa pueda estar ocurriendo al menos entre cepas de *E. coli* presentes en el agua de playa.

Como información adicional, se estudió el grupo filogenético al que pertenecían los aislamientos y la capacidad de producir unos antibióticos peptídicos catalogados como factores de virulencia de UPEC (Clermont et al., 2000; Azpiroz et al., 2009). Como ocurre en colecciones estudiadas de otros estuarios, la mayoría de los aislamientos pertenecieron a

los grupos filogenéticos A y B1, clásicamente asociados a cepas comensales de *E. coli* residentes de la microbiota intestinal de humanos y animales (Clermont et al., 2000; Pereira et al., 2013; Mosquito et al., 2015; Diab et al., 2018; Divya & Hatha, 2019). No obstante, dos aislamientos fueron asignados al grupo D y uno al B2, por lo que no se descarta que pertenezcan a algún linaje patógeno de *E. coli*. En este sentido, algunos estudios han detectado la presencia de cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* en agua de estuarios (Diab et al., 2018; Divya & Hatha, 2019). Por otra parte, la resistencia antibiótica parece ser independiente del grupo filogenético al cual pertenecen los aislamientos, lo cual está en acuerdo con relevamientos llevados a cabo en otros estuarios, i.e. si bien hay una tendencia a asociarse al grupo filogenético D, no se ha podido establecer una correlación directa (Pereira et al., 2013; Diab et al., 2018; Divya & Hatha, 2019). En cuanto a la capacidad de producir microcinas de clase II, se identificaron aislamientos productores de MccV procedentes de las tres playas analizadas (Figura 8). Cabe señalar que el sistema genético para esta microcina es plasmídico y, en particular, se ha descrito en algunos plásmidos que además albergan genes de resistencia portados mayormente por linajes intestinales y extraintestinales de *E. coli* (Jeziorowski & Gordon, 2007; Poey et al., 2012). En este sentido, los cuatro aislamientos productores exhibieron resistencia a varios antibióticos (Tabla 2 y 3). Por lo tanto, estos resultados pueden ser un indicio de la presencia de aislamientos con alguna carga de virulencia, eventualmente asociada a la resistencia, en nuestra colección. Cabe notar que este análisis no ha sido realizado en ninguna de las descripciones que estudian aguas estuarinas.

Un aspecto a puntualizar es que no disponemos de datos sobre los parámetros fisicoquímicos del agua el día en que se tomaron las muestras, i.e. temperatura, salinidad, concentración de oxígeno disuelto, etc. Esta información es importante ya que *E. coli* es una especie cuya viabilidad se ve fuertemente afectada por las condiciones ambientales. Concretamente, existen algunas descripciones que realizan análisis in situ en agua estuarina, así como in vitro simulando dichas condiciones, que muestran que la supervivencia de *E. coli* es afectada por varios factores fisicoquímicos y bióticos, siendo la temperatura una de las más relevantes (Faust et al., 1975; Vasconcelos & Swartz, 1976; Anderson et al., 1983; Troussellier et al., 2004; Ghaderpour et al., 2014). Teniendo esto en cuenta, se tomó la precaución de que la toma de las muestras se realizara distante al menos una semana del último episodio de precipitaciones con la premisa de que las condiciones del agua no fueran las más propicias para la viabilidad de *E. coli*, i. e. que no hubiera una gran proporción de agua dulce que disminuyera de forma muy pronunciada la salinidad. En este mismo sentido, es propio mencionar que la IM no recomienda el uso de las playas para baño antes de las 24 horas posteriores a un episodio de precipitaciones (Informe IM, 2022-2023). Suponemos entonces que estos resultados representan una

situación alejada de las condiciones más favorables para la supervivencia de *E. coli* en el agua de playa, en la que se pueden estar llevando a cabo actividades recreativas.

Otro aspecto a mencionar es que el agua de playa analizada tanto en este relevamiento como en los dos estudios metagenómicos realizados previamente fueron recolectadas antes de la puesta en funcionamiento del emisario de Punta Yeguas. Este avance en la red de saneamiento de la ciudad implicó un cambio sustancial en la forma en la que las aguas residuales se vierten al estuario en la zona oeste de Montevideo, i.e. se pasó de volcar directamente las aguas residuales en las playas a llevar a cabo un pretratamiento de las mismas para luego verter el efluente a una cierta distancia de la costa (2 km). No sabemos entonces cómo puede estar impactando este nuevo escenario en la presencia y diseminación de bacterias entéricas resistentes a antibióticos en las playas del oeste de Montevideo.

6. Conclusiones

- Se caracterizó una colección de 21 aislamientos de *E. coli* recuperadas del agua de tres playas de Montevideo (Cerro, Pocitos y Ramírez) en cuanto a su perfil de susceptibilidad antibiótica y a la capacidad de diseminación horizontal de los genes de resistencia.
- Más de la mitad de los aislamientos de la colección exhibió resistencia a alguno de los antibióticos evaluados, siendo en su mayoría multirresistentes.
- Se demostró la transferencia conjugativa de genes de resistencia desde aislamientos procedentes de las tres playas a una cepa de *E. coli* K12 en condiciones estándar de laboratorio.
- La mayoría de los aislamientos pertenecieron a grupos filogenéticos que suelen asociarse a cepas comensales de *E. coli* residentes de la microbiota intestinal de humanos y animales. No obstante, se detectaron tres aislamientos cuyo grupo filogenético podría indicar que pertenecen a linajes patógenos.
- Se identificó que algunos aislamientos producían un péptido antibiótico que integra una familia de bacteriocinas postuladas como un factor de virulencia de cepas uropatógenas de *E. coli*.
- En este trabajo se obtiene evidencia experimental de la presencia de bacterias entéricas resistentes a antibióticos, con el potencial de diseminar horizontalmente los genes de resistencia, en el agua de tres playas de Montevideo.

7. Referencias

1. Acuña, V., Camacho, M.A., Elizalde, V. (2021). Análisis del perfil de resistencias antibióticas de bacterias entéricas aisladas de agua de playa. PAIE, CSIC.
2. Aguirre-Sánchez, J. R., Valdez-Torres, J. B., Del Campo, N. C., et al. (2022). Phylogenetic group and virulence profile classification in *Escherichia coli* from distinct isolation sources in Mexico. *Infect. Genet. Evol.*, 106, 105380.
3. Altherr, M., R. & Kasweck, K., L. (1982). In situ studies with membrane diffusion chambers of antibiotic resistance transfer in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*, 44(4), 838-843.
4. Aminov, R. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.*, 2.
5. Anderson, I. C., Rhodes, M., & Kator, H. (1983). Seasonal variation in survival of *Escherichia coli* exposed in situ in membrane diffusion chambers containing filtered and nonfiltered estuarine water. *Appl Environ Microbiol.*, 45(6), 1877-1883.
6. Antelo, V., Salazar, C., Martínez, A., et al. (2018). First release of the bacterial biobank of the urban environment (BBUE). *Microbiol Resour Announc.*, 7(16).
7. Aznárez Torrendell, D. (2020). Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a trimetoprim en *Escherichia coli* uropatógeno. Tesis de grado. Montevideo: Udelar. FC.
8. Azpiroz, F., & Laviña, M. (2007). Modular structure of microcin H47 and colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(7), 2412-2419.
9. Azpiroz, F., Poey, M. E., & Laviña, M. (2009). Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.*, 47(5), 274-280.
10. Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J. Basic Microbiol.*, 58(11), 905-917.
11. Babić, M., Hujer, A. M., & Bonomo, R. A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist. Updat.*, 9(3), 142-156.
12. Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., et al. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45(4-ts), 493-496.
13. Baquero, F., Martínez, J. L., Lanza, V. F., et al. (2021). Evolutionary pathways and trajectories in antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 34(4).
14. Bengtsson-Palme, J., Jönsson, V., & Heß, S. (2021). What is the role of the environment in the emergence of novel antibiotic resistance genes? A modeling approach. *Environ. Sci. Technol.*, 55(23), 15734-15743.
15. Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., et al. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.*, 13(5), 310-317.

16. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., et al. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 13(1), 42-51.
17. Butaye, P., Devriese, L., & Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16(2), 175-188.
18. Cambray, G., Guérout, A., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annu. Rev. Genet.*, 44(1), 141-166.
19. Chen, B., Yang, Y., Liang, X., et al. (2013). Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes (ARGs) between human impacted estuary and deep ocean sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 47(22), 12753-12760.
20. Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, É. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(10), 4555-4558.
21. Cohen, R., Paikin, S., Rokney, A., et al. (2020). Multidrug-resistant enterobacteriaceae in coastal water: an emerging threat. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 9(1).
22. Coppola, N., Freire, B., Umpiérrez, A., et al. (2020). Transferable resistance to highest priority critically important antibiotics for human health in *Escherichia coli* strains obtained from livestock feces in Uruguay. *Front. Vet. Sci.*, 7.
23. De los Santos, E., Laviña, M., & Poey, M. E. (2021). Strict relationship between class 1 integrons and resistance to sulfamethoxazole in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.*, 161, 105206.
24. Diab, M., Hamzé, M., Bonnet, R., et al. (2018). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in water sources in Lebanon. *Vet. Microbiol.*, 217, 97-103.
25. Divya, S. P., & Hatha, A. M. (2019). Screening of tropical estuarine water in south-west coast of India reveals emergence of ARGs-harboring hypervirulent *Escherichia coli* of global significance. *J. Hyg. Environ.*, 222(2), 235-248.
26. Faust, M. A., Aotaky, A. E., & Hargadon, M. T. (1975). Effect of physical parameters on the in situ survival of *Escherichia coli* MC-6 in an estuarine environment. *Appl. Microbiol.*, 30(5), 800-806.
27. Fernández-Astorga, A. Muela, A., Cisterna, R., et al. (1992). Biotic a abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.*, 58(1), 392-398.
28. Flórez Cardona, V. (2022). Evaluación de la secreción heteróloga de dos variantes hormonales por parte de exportadores ABC bacterianos. Tesis de maestría. Montevideo : Udelar. FC - PEDECIBA.

29. Fresia, P., Antelo, V., Salazar, C., et al. (2019). Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. *Microbiome*, 7(1).
30. Ghaderpour, A., Nasori, K. N. M., Chew, L. L., et al. (2014). Detection of multiple potentially pathogenic bacteria in Matang mangrove estuaries, Malaysia. *Mar. Pollut. Bull.*, 83(1), 324-330.
31. Giménez, M., Azpiroz, F., Vera, J., et al. (2024). Antimicrobial resistance and the environment. En *Elsevier eBooks* (pp. 643-651).
32. Guo, X., Yang, Y., Lu, D., et al. (2018). Biofilms as a sink for antibiotic resistance genes (ARGs) in the Yangtze Estuary. *Water Res.*, 129, 277-286.
33. Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., et al. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat. Commun.*, 10(1).
34. Henriques, I., Fonseca, F., Alves, A., et al. (2008). Tetracycline-resistance genes in Gram-negative isolates from estuarine waters. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47(6), 526-533.
35. Intendencia de Montevideo, 2020 a. Sistema de saneamiento <https://montevideo.gub.uy/areas-tematicas/ambiente/saneamiento/sistema-de-saneamiento>
36. Intendencia de Montevideo, 2020 b. Sistema de disposición final oeste <https://montevideo.gub.uy/noticias/medio-ambiente-y-sostenibilidad/inauguramos-el-sistema-de-disposicion-final-oeste-0>
37. Intendencia de Montevideo (2022-2023). Informe de monitoreo de playas de Montevideo. <https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/informemonitoreodeaguasycostas2022-2023.pdf>
38. Jeziorowski, A., & Gordon, D. M. (2007). Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 189(19), 7045-7052.
39. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2(2), 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
40. Karkman, A., Pärnänen, K., & Larsson, D. G. J. (2019). Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat. Commun.*, 10(1).
41. Karkman, A., Thuy, T., Walsh, F., et al. (2018). Antibiotic-resistance genes in wastewater. *Trends Microbiol.*, 26(3), 220-228.
42. Larrea-Murrell, J. A., Badía, M. M. R., Romeu-Álvarez, B., et al. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas:

- revisión de la literatura. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(3), 24-34.
43. Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., et al. (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 68(1), 118-130.
 44. Lawley, T. D., Wilkins, B. M., & Frost, L. S. (2014). Bacterial conjugation in Gram-negative bacteria. En *ASM Press eBooks* (pp. 203-226).
 45. Leisner, J. J. (2020). The diverse search for synthetic, semisynthetic and natural product antibiotics from the 1940s and up to 1960 exemplified by a small pharmaceutical player. *Front. microbiol*, 11.
 46. Lourenco, N. G. G. S., Takahashi, C. K., Lopes, T., et al. (2007). Environmental parameters and antimicrobial susceptibility of enterobacteriaceae isolated from estuarine waters of São Vicente, São Paulo state, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 13(2).
 47. Mach, P., A. & Grimes, D., J. (1982). R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol.*, 44(6), 1395-1403.
 48. Manual M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2023), Clinical & Laboratory Standards Institute. <https://www.google.com/url?q=https://iacld.com/UpFiles/Documents/672a1c7c-d4ad-404e-b10e-97c19e21cdce.pdf&sa=D&source=docs&ust=1719595014661535&usg=AOvVaw0IJvgf1Nu95JEcZ0ofxow3>
 49. Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria.
 50. Mosquito, S., Pons, M. J., Riveros, M., et al. (2015). Diarrheagenic *Escherichia coli* phylogroups are associated with antibiotic resistance and duration of diarrheal episode. *Sci. World J.*, 2015, 1-6.
 51. Mueller, J. H., & Hinton, J. M. (1941). A Protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. *Exp. Biol. Med.*, 48(1), 330-333.
 52. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.*, 4(2).
 53. Muñoz-López, M., & García-Pérez, J. L. (2010). DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr. Genom.*, 11(2), 115-128.
 54. Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sahara, F., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399 (10325), 629-655.
 55. Papa-Ezdra, R., Caiata, L., Palacio, R., et al. (2021). Prevalence and molecular characterisation of carbapenemase-producing Enterobacterales in an outbreak-free setting in a single hospital in Uruguay. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 24, 58-62.

56. Parker, J., & Davies, B. W. (2022). Microcins reveal natural mechanisms of bacterial manipulation to inform therapeutic development. *Microbiol.*, 168(4).
57. Pereira, A., Santos, A. M., Tacão, M., et al. (2013). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Sci. Total Environ.*, 461- 462, 65-71.
58. Périchon, B., Courvalin, P., & Galimand, M. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-Mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(7), 2464-2469. <https://doi.org/10.1128/aac.00143-07>
59. Prezioso, S. M., Brown, N., & Goldberg, J. B. (2017). Elfamycins: inhibitors of elongation factor-Tu. *Mol. Microbiol.*, 106(1), 22-34.
60. Poey, M. E., Albini, M., Saona, G., et al. (2012). Virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women and children with urinary tract abnormalities. *Microb. Pathog.*, 52(5), 292-301.
61. Poey, M. E., Azpiroz, F., & Laviña, M. (2006). Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(4), 1411-1418.
62. Poey, M. E., & Laviña, M. (2018). Horizontal transfer of class 1 integrons from uropathogenic *Escherichia coli* to *E. coli* K12. *Microb. Pathog.*, 117, 16-22.
63. Ramírez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.*, 13(6), 151-171.
64. Rizzo, L., Manaia, C. M., Merlin, C., et al. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.*, 447, 345-360.
65. Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., et al. (2005). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.*, 12(1), 83-88. <https://doi.org/10.1038/nm1347>
66. Salazar, C., Giménez, M., Riera, N., et al. (2022). Human microbiota drives hospital-associated antimicrobial resistance dissemination in the urban environment and mirrors patient case rates. *Microbiome*, 10(1).
67. Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet. Res.*, 32(3/4), 261-273.
68. Trevors, J., T. & Oddie, K., M. (1986). R-plasmid transfer in soil and water. *Can. J. Microbiol.* 32, 610-613.
69. Troussellier, M., Got, P., Bouvy, M., et al. (2004). Water quality and health status of the Senegal River estuary. *Mar. Pollut. Bull.*, 48(9-10), 852-862.
70. Vasconcelos, G. J., & Swartz, R. G. (1976). Survival of bacteria in seawater using a diffusion chamber apparatus in situ. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31(6), 913-920.

71. Walsh, C. T. (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. American society for Microbiology, Washington, DC: ASM Press.
72. World Health Organization: WHO. (2024). *One health*. https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1.
73. Yan, L., Liǔ, D., Wang, X., et al. (2017). Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China. *Sci. Rep.*, 7(1).