



***Evaluación de los factores bióticos y abióticos en una cría de planarias***

**Jossie Esteban Gonzalez Fontecha**

**Ariana Yineth Patiño Herrera**

**Asesora Interna**

**Ligia Consuelo Sánchez Leal Mg. Biología Aplicada**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Trabajo de grado**

**Bogotá, abril 2022**

## **Dedicatoria**

Este trabajo va dedicado a Dios, el dueño de todo conocimiento, a nuestras mamás, y a la ciencia en cuyo nombre se construyen los cimientos de toda investigación.

## **Agradecimientos**

Damos nuestros más profundos agradecimientos a Dios por darnos entendimiento, inteligencia y sabiduría para llevar a cabo este proyecto, a nuestras mamás por el gran esfuerzo y acompañamiento durante toda la carrera, a nuestra asesora, Ligia Consuelo Sánchez por su paciencia, guía y comprensión en cada fase del proyecto.

## **Tabla de Contenido**

<b>Resumen</b>	<b>9</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>13</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>13</b>
<b>1. Antecedentes</b>	<b>14</b>
<b>2. Marco referencial</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Generalidades de las Planarias</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Anatomía y Fisiología</b>	<b>21</b>
<b>2.3. Características y distribución de los neoblastos</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Factores Bióticos</b>	<b>25</b>
<b>2.5. Factores Abióticos</b>	<b>27</b>
<b>3. Diseño metodológico</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Universo, población y muestra</b>	<b>29</b>
<b>3.2. Hipótesis, variables, indicadores</b>	<b>29</b>
<b>3.3. Técnicas y procedimientos</b>	<b>29</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>41</b>
<b>5. Discusión</b>	<b>47</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>57</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>58</b>

## Índice de figuras

	Pág
<b>Figura 1.</b> Diagrama de representación de la anatomía de una planaria.	22
<b>Figura 2.</b> Distribución de los neoblastos en la planaria <i>Schmidtea mediterranea</i> determinada por hibridación in situ del gen piwi-1	23
<b>Figura 3:</b> Distribución de los neoblastos en la planaria <i>Dugesia dorotocephala</i> determinada por hibridación in situ del gen piwi-1.	23
<b>Figura 4:</b> Distribución de los neoblastos en la planaria <i>Phagocata morgani</i> determinada por hibridación in situ del gen piwi-1.	23
<b>Figura 5:</b> Distribución de los neoblastos en la planaria <i>Phagocata gracilis</i> determinada por hibridación in situ del gen piwi-1.	24
<b>Figura 6:</b> Distribución de los neoblastos en la planaria <i>Girardia spp.</i> determinada por hibridación in situ del gen piwi-1.	24
<b>Figura 7.</b> Efectos del metabolito indol producido por la bacteria <i>Aquitalea spp.</i>	26
<b>Figura 8:</b> Quebrada la vieja.	30
<b>Figura 9:</b> Piedra con planarias.	30
<b>Figura 10:</b> Alimentación de las planarias.	32
<b>Figura 11:</b> Planaria observada en el estereoscopio.	33
<b>Figura 12:</b> Medición de diferentes parámetros por medio del equipo Oakton Waterproof.	33
<b>Figura 13:</b> Medición de la temperatura por medio termómetro digital Extech Instruments.	34
<b>Figura 14:</b> Diagrama de procedimiento para la concentración de microorganismos presentes en el agua de quebrada y en el agua de planarias de laboratorio.	34
<b>Figura 15:</b> Proceso de filtración del agua para la concentración de microorganismos.	35
<b>Figura 16:</b> Diagrama de procedimientos para la siembra de microbiota exógena de las planarias.	36
<b>Figura 17:</b> Agitación de los tubos falcon.	37
<b>Figura 18:</b> Siembra de planaria en medio de cultivo.	37
<b>Figura 19:</b> Diagrama de procedimientos para la siembra de los microorganismos presentes en el musgo.	38

<b>Figura 20:</b> Diagrama de procedimientos para la siembra de los microorganismos presentes en las piedras.	39
<b>Figura 21:</b> Pruebas bioquímicas para identificación de los microorganismos	40
<b>Figura 22.</b> Planarias de laboratorio.	46
<b>Figura 23.</b> Planarias alimentándose.	46
<b>Figura 24.</b> Planarias agrupadas cerca a la pared.	47
<b>Figura 25.</b> Blastema de regeneración.	47
<b>Figura 26.</b> Gráfico de supervivencia de las Planarias.	48

## Índice de tablas

	Pág
<b>Tabla 1.</b> Medición de las propiedades fisicoquímicas del agua de la quebrada.	41
<b>Tabla 2.</b> Medición de las propiedades fisicoquímicas del agua de laboratorio.	41
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos presentes en el agua de la quebrada.	43
<b>Tabla 4.</b> Resultados de pruebas bioquímicas manuales para identificación de bacilos Gram positivos en el agua de la quebrada	43
<b>Tabla 5.</b> Microorganismos aislados de las planarias de la quebrada aplicando la metodología 1.	43
<b>Tabla 6.</b> Microorganismos aislados de las planarias de la quebrada aplicando la metodología 2.	44
<b>Tabla 7.</b> Microorganismos aislados de las planarias de laboratorio aplicando la metodología 1.	44
<b>Tabla 8.</b> Microorganismos aislados de las planarias de laboratorio aplicando la metodología.	44
<b>Tabla 9.</b> Microorganismos aislados de la materia orgánica.	44
<b>Tabla 10.</b> Microorganismos aislados de las piedras.	45
<b>Tabla 11.</b> Resultados de pruebas bioquímicas manuales para identificación de bacilos Gram positivos en las piedras	45
<b>Tabla 12.</b> Seguimiento de la supervivencia de las planarias.	48



**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Evaluación de los factores bióticos y abióticos en una cría de planarias**

**Resumen**

Las planarias, también llamados gusanos planos, son organismos triploblásticos, acelomatosos, pertenecientes al filo de platelmintos, los cuales se han estudiado ampliamente en áreas de medicina regenerativa y la biología del desarrollo a causa de su gran capacidad de regeneración de tejido a partir de sus células madre llamadas neoblastos. A pesar de ser un modelo biológico con gran bioprospección no se han estudiado en conjunto los factores bióticos y abióticos que intervienen en su biología y comportamiento. En el presente proyecto se estudiaron los factores bióticos y abióticos que pueden tener algún efecto en el establecimiento y el mantenimiento de una cría de planarias. Se caracterizó la microbiota externa de las planarias, la población bacteriana las piedras, la materia orgánica de la que se alimentan las planarias y el agua de la quebrada La Vieja y se verificó la vitalidad y el comportamiento de las planarias en el establecimiento de su cría en el laboratorio. Se evidenció que las planarias son metazoos con gran capacidad de adaptación a diferentes factores bióticos y abióticos, tolerando cambios de temperatura, conductividad y TDS. Por otra parte, son organismos que albergan una amplia variedad microbiana, y conviven con una gran diversidad de bacterias en su hábitat natural. De esta manera se pudo determinar que son organismos viables para el cultivo en un ambiente controlado de laboratorio, condiciones adecuadas de alimentación, temperatura y otras características que indican la continuidad de una población estable en el tiempo, y de hábitos y comportamiento definidos.

**Palabras claves:**

Planarias, Microbiota, factores bióticos, factores abióticos

Estudiantes:

Jossie Esteban Gonzalez Fontecha y Ariana Yineth Patiño Herrera

Profesora

Ligia Consuelo Sánchez Leal

Fecha: 27/03/2022

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

## Introducción

Las planarias son organismos complejos que poseen una variedad de células llamadas neoblastos las cuales tienen total capacidad regenerativa<sup>1</sup>. Son imprescindibles en el mantenimiento estructural y funcional de todas las partes de su cuerpo y están reguladas por señales de su sistema nervioso que les transmiten diversos estímulos generados desde el ambiente que las rodea<sup>2</sup>. Cuando se ven sometidas a daños como pérdidas de alguna parte de su cuerpo por amputación, inanición o algún otro tipo de daño estructural se desencadena una secuencia de señales bioquímicas hacia la zona afectada para regenerar de forma oportuna los tejidos perdidos de manera coordinada y organizada, lo que evidencia gran complejidad en el proceso de reparación celular indicando mecanismos muy precisos en la proliferación y diferenciación de las células requeridas para recomponer su cuerpo a partir de una memoria molecular y sensorial de los tejidos perdidos<sup>2</sup>. Este proceso puede ser alterado por daños a las células que les impidan desarrollar los mecanismos moleculares necesarios para reconstruir la estructura requerida, incluyendo afectaciones por agentes tóxicos de todo tipo como carcinógenos<sup>3,4</sup>, o por microorganismos que puedan infectar las heridas generadas en la zona afectada<sup>5</sup>.

A lo largo de los años, las Planarias han tomado mayor relevancia en diversas disciplinas, debido a sus reconocidas capacidades regenerativas, al mayor entendimiento que se tiene de su biología y a similitudes que presentan con los animales superiores<sup>1,8</sup>. De esta manera se han empleado como modelo de estudio en campos de investigación relativos a la biología regenerativa, la farmacología, toxicología, el ámbito ecológico, entre otros<sup>3,10,11</sup>. Es así como, desde finales del siglo XX se han estudiado las planarias como prospectos de regeneración debido a la capacidad de sus células madre para regenerar casi la totalidad del cuerpo<sup>9</sup>. Con el paso de los años se ha conocido que su composición genética presenta una variedad de homólogos con el Homo sapiens que se relacionan en los procesos de regeneración tisular<sup>1</sup>. En el campo de la farmacología se han realizado estudios en los cuales se exponen a las planarias a determinadas concentraciones de sustancias como la cocaína para conocer su respuesta fisiológica ante las drogas de abuso, observar su comportamiento y encontrar nuevas sustancias que actúan como

antagonistas de la cocaína<sup>10</sup>. En el campo de la ecología y la toxicología, se ha estudiado la contaminación de los ecosistemas con sustancias nocivas para el hábitat en general, que afectan de gran manera a los cuerpos de agua y a los diferentes tipos de vida que se encuentran allí. Las planarias son conocidas entre otros por ser bioindicadores, por ello han analizado su respuesta a diferentes sustancias tóxicas como el amoniaco, pesticidas, metilmercurio etc<sup>11</sup>.

Pese a que se han realizado diferentes estudios en este organismo, poco se ha investigado acerca del hábitat en que vive la planaria de agua dulce, la influencia de los factores bióticos y abióticos en su biología, y cómo pueden validar a este organismo en términos experimentales. Por esta razón, la evaluación de los factores bióticos y abióticos en la cría de planarias es un paso fundamental para el desarrollo del proyecto experimental, puesto que los resultados permitirán conocer características fundamentales para estandarizar una cría de planarias en el laboratorio.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar los factores bióticos y abióticos que puedan tener algún efecto en el establecimiento y el mantenimiento de una cría de planarias.

### **Objetivos específicos**

- ❖ Establecer los factores abióticos que podrían interferir en la cría de las planarias.
  
- ❖ Caracterizar la población bacteriana de las planarias, del agua de la quebrada, las piedras y la materia orgánica de la quebrada La vieja, hábitat natural de las planarias.
  
- ❖ Verificar la vitalidad y el comportamiento de las planarias en el establecimiento y el mantenimiento de la cría en el laboratorio.

## 1. Antecedentes

En 1962 Best y Rubisntein<sup>12</sup> investigaron el comportamiento de aprendizaje de las planarias en un laberinto que no tenía agua, un estímulo para elegir diversos caminos de regreso al agua y entender cómo era su aprendizaje en un determinado contexto. Algunos individuos presentaban un aprendizaje inicial que luego rechazaban mostrando un comportamiento de ensayo y error posterior al cual entraban en un estado de letargo que no se debía a fatiga o daño. Dependiendo de la textura de los laberintos otros individuos elegían opciones sin rechazo del aprendizaje inicial. Estos resultados indican que las planarias son animales que pueden aprender instrumentalmente, y su comportamiento de aprendizaje y rechazo o aceptación de las alternativas reforzadas se pueden modificar cambiando aspectos generales de su ambiente sin modificar las alternativas de elección originales.

En 1965, dos investigadores de la Universidad de Colorado, Best y Morita<sup>13</sup>, realizaron observaciones de la estructura fina del sistema neurosecretor de la planaria *Dugesia dorocephala* utilizando la técnica de microscopía electrónica. Hasta el momento se habían realizado estudios sobre la estructura del sistema neurosecretor en vertebrados y algunos invertebrados. Las observaciones permitieron conocer la forma bilobulada del cerebro, ver estructuras como los neuropilos, fibras nerviosas, células nerviosas y neurosecretoras. Se conoció que las fibras nerviosas contienen neurofilamentos, mitocondrias, vesículas sinápticas, y vesículas de distintos tamaños. Dentro de los resultados destaca la observación de estructuras conocidas como gránulos neurosecretores, caracterizados por ser densos en electrones. Estas estructuras se forman a partir del aparato del Golgi, donde las cisternas se hinchan para formar una envoltura lisa y redonda que se llena con una sustancia densa en electrones. Los autores manifiestan que los fenómenos celulares descritos en el estudio parecen ser similares a los que estudiaron otros investigadores previamente para las células neurosecretoras de los animales superiores.

Los factores medioambientales que se encuentran en el hábitat de las planarias son de suma importancia para el desarrollo y comportamiento de estas, es por ello que el 1976, Legner et al<sup>7</sup> realizaron un estudio en el cual por medio de los factores

ambientales pretenden estimular la reproducción sexual en la planaria *Dugesia dorocephala*, es así como adecuaron el hábitat de las planarias a diferentes factores como: la alimentación se realizaba por medio de mosquitos convencionales (*Culex pipiens*), evidenciaron que el agua sin cloro era mejor para ellas, la oscuridad era preferente aunque brindarles foto periodos no intervenía en la fisión; los niveles de oxígeno entre 3 y 8 PPM eran muy estimulantes; y las fluctuaciones de temperatura eran factores importantes y estimulantes para la reproducción asexual de estos organismos. Se evidencio que un crecimiento en la densidad poblacional detenía el proceso de fisión de las planarias, así mismo alimentarlas con camarones de salmuera y gusanos *Tubifex* sp no eran los ideales por dificultad a la hora de cazarlos; por último se deben mantener unos óptimos niveles de salinidad. Todos los factores anteriormente mencionados contribuyen a un mejor entendimiento de los procesos de reproducción asexual en las planarias. Este artículo resalta la importancia y menciona algunos de los factores importantes en la cría de las planarias.

Arees<sup>14</sup> en 1986 estudió el comportamiento de las planarias frente a estímulos de luz, para ello dividió las planarias en dos grupos, un grupo de control el cual no padecería alteración alguna; el otro grupo sería decapitado o seccionado a la altura de la faringe o aurículas, con el fin de comprobar si todo el cuerpo poseía fotorreceptores o estaban ubicados únicamente en el extremo superior de las planarias, los ocelos. Los resultados demostraron que el grupo control reaccionaba a la luz directa e indirecta alejándose de ella, por el contrario, las planarias seleccionadas no tenían estímulo alguno frente a luz proporcionada directa e indirectamente, pero si responden a estimulación mecánica. Lo que sugiere que los fotorreceptores de las planarias están ubicados en la parte superior de la cabeza específicamente en los oculares. Este artículo es de suma importancia para la estandarización de la cría de las planarias debido a que proporciona información del cuidado y sensibilidad de los organismos a tratar.

Las planarias en los diferentes hábitats en donde se encuentra están sometidas a diversos factores y calidad del medio ambiente, es por ello que Rivera et al<sup>15</sup> en 1994 sometieron a planarias de 4 especies diferentes (*Dugesia dorocephala*, *Dugesia tigrina*, *Girardia foremanii* y *Dendrocelopsis vaginatus*) a diversas condiciones abióticas en las cuales evaluarán su desarrollo y reproducción. Cada grupo de

ejemplares fueron sometidos a diferentes niveles de pH, temperatura, salinidad, oxígeno, solutos orgánicos disueltos y turbidez del agua. Posterior a estos, se observó que los niveles de oxígeno presentes en el ambiente en donde se encuentren las planarias de las diversas especies son de vital importancia para su desarrollo, *Dugesia tigrina* arrojó los parámetros más altos de reproducción y resistencia frente a aguas turbias. Por otro lado, *Dugesia dorotocephala* y *Dugesia tigrina* presentaron mayor resistencia frente a las diferentes condiciones expuestas. En este artículo, se puede evidenciar la importancia de mantener la cría de planarias en las mejores condiciones posibles, tenerlas en ambientes controlados y evitar al máximo diferentes componentes que pueden alterar la calidad de vida, comportamiento y su reproducción, es por ello que es muy importante en la presente investigación.

Dasheiff et al<sup>16</sup> en el 2002 evaluaron la respuesta foto negativa en planarias *Dugesia tigrina*, para ello eligieron tres grupos poblacionales, planarias viejas, jóvenes y en edad media. En cada grupo poblacional seccionaron las planarias en cola y cabeza y separaron los fragmentos para realizar una correcta observación de la regeneración de cada uno de los fragmentos, estos eran expuestos a las lámparas de luz por largo tiempo con el objetivo de ver la afectación que esta ejercía sobre la regeneración del animal. Evidenciaron que las planarias más viejas expresaban mejor respuesta regenerativa frente a los otros grupos poblacionales, adicionalmente evaluaron la locomoción en dichos fragmentos y concluyeron que la locomoción es independiente del factor regenerativo, esto se observó en las planarias más jóvenes y de edad media en las cuales su proceso regenerativo fue más lento pero la locomoción se seguía manteniendo. Este artículo es importante para el presente proyecto debido a que es de vital importancia conocer la fotosensibilidad en la estandarización de la cría de las planarias, así mismo se podrían tomar estos animales como modelos de investigación en el envejecimiento o enfermedades degenerativas.

En el 2011 Lombardo et al<sup>17</sup> realizaron un estudio comportamental en planarias de diferentes especies, en el estudio se evidencio que la mayoría de ellas están más activas en el día y en la noche suelen guardar reposo. Para evitar alteraciones en lo posible, los procedimientos se repiten igualmente en cada una de ellas, es por ello que se brindaba alimentación cada 36 horas, esto con el fin de observar cómo actúan frente a el alimento a las diferentes horas. Cabe resaltar que algunas de ellas

presentaban mayor actividad en el día, se relaciona con la búsqueda de comida, lo cual sería una ventaja en su hábitat natural pero así mismo estaría más propensa a ser depredada; cada uno de los ejemplares en todas las horas del día y noche estaban alerta en los diferentes estímulos mecánicos, lo que indica que suelen estar alerta y se comunican entre ellas por interacciones bioquímicas, aunque es un estudio que se debe realizar más a fondo. Este artículo es importante para la presente investigación debido a que se puede dilucidar más el comportamiento de animales tan poco estudiados en este campo.

Las planarias han sido ampliamente estudiadas por más de 100 años, a causa de su potencial regenerativo y homología genética con los humanos, esta capacidad se la confieren los neoblastos, células “madre” capaces de diferenciarse en casi todos los tipos celulares que conforman las planarias. Bocchinfuso et al<sup>18</sup> en el 2012 realizaron un estudio proteómico en la mucosa que recubre la planaria, esta secreción mucosa está involucrada en la locomoción de las planarias, inmunidad innata, adhesión de diferentes sustratos y en la supervivencia de ellas evitando así los diferentes depredadores. Dicha secreción era de composición desconocida, es por ello que los autores del artículo desarrollaron una investigación en torno a las propiedades que representaban la mucosa de la planaria de agua dulce *Schmidtea mediterranea*, por medio de análisis proteómicos estudiaron los componentes de dicha secreción, posterior a esto realizaron un análisis *in silico* para evidenciar si las proteínas y demás componentes hallados presentaban homología con otro organismo, encontrando que diversos componentes de la mucosa de las planarias coincidían con diferentes proteínas conocidas en las secreciones humanas. Esta investigación dilucida los diferentes beneficios y estudios que se podrían realizar a partir de la mucosa de las planarias, se podrían estudiar patologías asociadas a la mucosa humana, pruebas empleando diversos agentes terapéuticos, diversas propiedades emolientes y protectoras presentes en la mucosa oral. Su composición bioquímica y proteómica presenta similitudes con las lágrimas humanas, lo que contribuiría a diferentes estudios relacionados con las patologías oculares. Por otro lado, se evidencia homología con el parásito *Schistosoma mansoni*, lo cual podría contribuir en el estudio y entendimiento de la patogenicidad de dicho organismo en los humanos.

Abnave et al<sup>19</sup> en el 2014 demostraron que pese al ambiente diverso en el que se encuentran las planarias, los diferentes microorganismos no ejercen afectación alguna en ellas, es por ello que estudiaron la manera en la que estos animales lograban tener cierta inmunidad al ambiente. Esta investigación la realizaron añadiendo al ambiente en donde se encontraban las planarias microorganismos patógenos para el ser humano como *Staphylococcus aureus* o *Legionella pneumophila*, posterior a esto realizaron análisis en el transcriptoma de las planarias y la detección de ARNi, en los resultados se evidenciaron 18 genes que ejercen resistencia a los microorganismos patógenos, de los cuales 9 son homólogos con los humanos, se enfatizaron en MORN2, en los humanos participa en la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, entre otros. Así mismo, promueve la activación de LC3, proteína que es de importancia en la fagocitosis, en los fagosomas y maduración de los fagolisosomas degradativos. Es por ello que el presente artículo es de gran importancia, debido a que por medio de las planarias se podrían estudiar e identificar diferentes factores que intervienen en los factores inmunológicos tanto en ellas como en los humanos.

En el 2015 Akiyama et al<sup>20</sup> analizaron el comportamiento de una cría de planarias de la especie *Dugesia japonica* en el laboratorio, estudiaron la tendencia de estos organismos de mantenerse en las paredes de los recipientes o hábitat en donde se encuentren. Para esto desarrollaron diferentes técnicas las cuales consistían en poner las planarias en recipientes con diferentes formas, proceden a poner al animal en el centro del recipiente y evaluaban el tiempo y trayectoria que este tardaba en llegar a la pared, el tiempo que permanecía allí y los cambios de trayectoria. Para corroborar si eran movimientos espontáneos o controlados por el cerebro de la planaria, seccionaron los organismos en cabeza y cola para comprobar dicha hipótesis, encontraron que independiente de la parte del animal, este tiende a dirigirse a las paredes de los recipientes, con ello concluyeron que este comportamiento es independiente de la fotosensibilidad y los diversos estímulos mecanorreceptores, por otro lado este comportamiento podría tener influencia en el papel de adaptación a los diferentes hábitat en donde se encuentre. Al someterlas a diferentes formas de recipientes, se notó que prefieren espacios que presentan curvaturas, en estos no realizan tantos cambios de trayectoria y se evidencia mayor densidad poblacional en

sus paredes. Este artículo es importante para la investigación actual debido a que ayuda a comprender el comportamiento de los animales en cuestión.

En el 2016, se identificó por parte de Arnold et al<sup>20</sup> la microbiota endógena de *Schmidtea mediterranea*, permiten ingresar en un campo nuevo y poco indagado, la estimulación del sistema inmune a partir de las perturbaciones de la microbiota permite potenciar factores inhibidores de la regeneración. La caracterización microbiológica permitió identificar altas concentraciones de bacteroidetes y proteobacterias, la alteración de este último taxón coincide con el aumento de lesiones ectópicas y degeneración de los tejidos. Adicionalmente, una prueba con ARN interferente permite identificar TAK1 como un modulador de la señalización inmune innata que compromete la homeostasis de los tejidos y la regeneración durante la infección.

Las planarias son modelos de organismos ampliamente estudiados en diversas áreas como regeneración, en estudios ambientales, genética entre otros, pero en los aspectos más básicos de su biología se conoce poco, es por ello que en el 2020 se realizó una investigación por Lewallen y Burggren<sup>21</sup> en la cual se estudió la temperatura ideal de la cría de planarias, la captación de oxígeno que estos organismos realizan por medio del tegumento, las variaciones en la cría entre planarias sexuales y asexuales, la alimentación, las condiciones adecuadas del lugar en donde se deben encontrar realizando énfasis en los fotoperiodos, envases y demás elementos para su manipulación. Adicionalmente, se menciona que los diferentes factores mencionados tendrían influencia en la captación de oxígeno de los organismos; los diferentes procesos metabólicos de las planarias tienen homología con los invertebrados y vertebrados, lo cual enfatiza la importancia y validación de estudiarlas como modelo animal.

## **2. Marco referencial**

### **2.1. Generalidades de las Planarias**

Las planarias son un género de gusanos planos de vida libre ampliamente distribuidos pertenecientes al phylum Platyhelminthes (del griego “platy” que significa plano, y “helminth” que significa gusano). Estos organismos son metazoos tripoblásticos, acoelomatosos y de simetría bilateral pertenecientes a la clase Turbellaria; junto con los Trematodos y Cestodos forman el filo de los Platyhelminthes. En comparación con los otros dos miembros del grupo, las planarias son organismos de vida libre que se encuentran mayormente en arroyos, ríos y estanques. Se encuentran entre los organismos más simples que se componen de tres capas celulares (ectodermo, mesodermo y endodermo). Poseen una anatomía compleja compuesta de sistemas y órganos que presentan la notable conservación fisiológica y molecular de los mamíferos<sup>22</sup>.

Las planarias son organismos con diversidad de características, su tamaño puede oscilar desde 1 hasta 90 milímetros, dependiendo de la especie pueden vivir en ambientes terrestres, marinos o en agua dulce, su movilidad la realizan por medio de cilios localizados en la parte ventral de su cuerpo<sup>23</sup>. Pese a que es un gusano plano, no es un parásito, son carroñeros y depredadores oportunistas. Las señales químicas emitidas por otros organismos que se encuentran alrededor de su entorno son de gran importancia, debido a que por medio de ellas pueden identificar su presa; su alimentación se basa en insectos pequeños, larvas y otros invertebrados<sup>23</sup>.

Es importante tener en cuenta que el rol de las planarias de agua dulce en el ecosistema está definido como depredadores de artrópodos, caracoles y poliquetos, aunque en abundante disponibilidad de alimento pueden ser carroñeros<sup>24</sup>. Algunas especies se consideran oportunistas y pueden desplazar a otras poblaciones de planarias, y se conoce que pueden llegar a ser consideradas como plagas en ambientes controlados como acuarios, debido a que su población puede crecer rápidamente y competir por el alimento con especies jóvenes<sup>25</sup>.

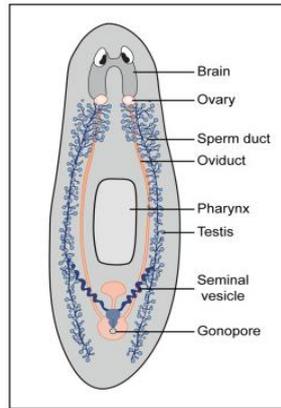
Tienen tolerancia variable a diferentes condiciones fisicoquímicas del agua, como cantidades relativas de oxígeno, pH variable, conductividad y temperaturas de diferente rango y diferente dureza cálcica. Sólo en condiciones extremas como gran deficiencia de oxígeno o temperaturas superiores a 25°C se ve afectada la supervivencia de las especies<sup>26</sup>. Debido a su patrón de distribución en diferentes cuerpos de agua como lagos, arroyos, manantiales, estanques, y al encontrarse en aguas con diferente grado de contaminación orgánica son útiles como indicadores de la calidad del agua<sup>27</sup>. A causa de la facilidad para aumentar su población gracias a su modo de reproducción, se podría inferir que su permanencia en el ecosistema no se encuentra en peligro al tomar muestras de agua que contengan algunos ejemplares para el estudio.

El mantenimiento y cría de estos animales en condiciones de laboratorio es viable, pueden vivir en entornos controlados bajo las condiciones óptimas, las cuales son: agua de estanque, sal marina (para especies marinas) cajas de Petri para máximo 50 ejemplares, y envases ziploc para más de 50<sup>28</sup>. En condiciones de laboratorio se debe mantener la asepsia del entorno de crianza realizando cambios periódicos de agua cada semana<sup>28</sup>.

## **2.2. Anatomía y Fisiología**

Como se observa en la figura 1, la planaria tiene un sistema nervioso que se compone de un cerebro bilobulado que se ubica en el extremo anterior del animal con múltiples extensiones nerviosas que se conectan con los quimiorreceptores a lo largo de los márgenes de la cabeza. Además, presenta cordones nerviosos ventrales que se conectan a lo largo del cuerpo con un plexo nervioso periférico. Su epidermis está compuesta por una sola capa de células que recubre la musculatura del cuerpo compuesta por fibras circulares, diagonales y longitudinales<sup>29</sup>.

En cuanto al sistema digestivo, la faringe, un órgano de alimentación muscular que se encarga de ingerir alimentos y expulsar desechos está conectado al intestino que se encuentra altamente ramificado, el cual se compone de fagocitos los cuales absorben partículas de alimentos y células caliciformes secretoras de enzimas digestivas<sup>30</sup>.



**Figura 1:** Diagrama de representación de la anatomía de una planaria. Tomada de: Issigonis M, Newmark P. Chapter Four - From worm to germ: Germ cell development and regeneration in planarians.

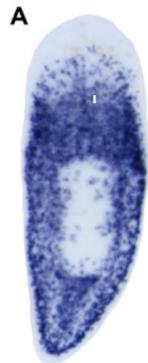
Las planarias tienen dos formas de reproducción, sexual y asexual<sup>31</sup>. En la asexual se reproducen clonalmente mediante fisión y posterior regeneración de dos individuos genéticamente idénticos; Sexual, las planarias poseen ovarios germinales y vitelarios, oviducto, poro femenino, receptáculo seminal, orificio copulador. Así mismo posee testículos, conductos deferentes, órgano copulador, vesícula seminal y poro masculino. Por ende, realizan una fecundación interna a través de la fertilización de los ovocitos<sup>29</sup>.

### 2.3. Características y distribución de los neoblastos

El mesénquima del tejido planario está compuesto por numerosas células pluripotentes indiferenciadas (neoblastos), estas representan del 25 - 30% de todas las células del cuerpo planario y cada tejido deriva de estas células en última instancia. La capacidad de este tipo de células para renovarse, proliferar y migrar hacia el sitio de la lesión es única por lo que se han convertido en un modelo de elección para el estudio de la biología regenerativa de las células madre<sup>6</sup>.

En las figuras que se muestran a continuación se puede observar la distribución corporal de los neoblastos en las especies *Schmidtea mediterranea*, *Dugesia dorotocephala*, *Phagocata morgani*, *Phagocata gracilis* y el género *Girardia* spp. respectivamente. La distribución de dichas células madre fue determinada por

hibridación in situ del gen *piwi-1*, que codifica para una proteína encargada de promover el mantenimiento y la función de las células madre<sup>32</sup>.



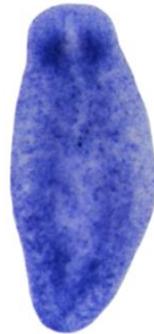
**Figura 2:** Distribución de los neoblastos en la planaria *Schmidtea mediterranea* determinada por hibridación in situ del gen *piwi-1* Tomada de: Accorsi A, Williams MM, Ross EJ, Robb SMC, Elliott SA, Tu KC, et al. Hands-On Classroom Activities for Exploring Regeneration and Stem Cell Biology with Planarians



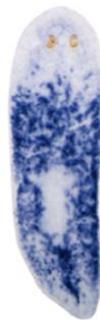
**Figura 3:** Distribución de los neoblastos en la planaria *Dugesia dorotocephala* determinada por hibridación in situ del gen *piwi-1* Accorsi A, Williams MM, Ross EJ, Robb SMC, Elliott SA, Tu KC, et al. Hands-On Classroom Activities for Exploring Regeneration and Stem Cell Biology with Planarians



**Figura 4:** Distribución de los neoblastos en la planaria *Phagocata morgani* determinada por hibridación in situ del gen *piwi-1* Accorsi A, Williams MM, Ross EJ, Robb SMC, Elliott SA, Tu KC, et al. Hands-On Classroom Activities for Exploring Regeneration and Stem Cell Biology with Planarians



**Figura 5:** Distribución de los neoblastos en la planaria *Phagocata gracilis* determinada por hibridación in situ del gen *piwi-1* Accorsi A, Williams MM, Ross EJ, Robb SMC, Elliott SA, Tu KC, et al. Hands-On Classroom Activities for Exploring Regeneration and Stem Cell Biology with Planarians



**Figura 6:** Distribución de los neoblastos en la planaria *Girardia* sp. determinada por hibridación in situ del gen *piwi-1* Accorsi A, Williams MM, Ross EJ, Robb SMC, Elliott SA, Tu KC, et al. Hands-On Classroom Activities for Exploring Regeneration and Stem Cell Biology with Planarians

Histológicamente, los neoblastos son células pequeñas, miden entre 11 y 12  $\mu$  de diámetro, redondas u ovaladas, con un núcleo central o excéntrico. Su citoplasma es basófilo y escaso debido a que el núcleo se distribuye en la mayoría de la célula. Posee membrana celular y nuclear, entre estas membranas se encuentran el retículo endoplasmático y algunas mitocondrias. Su citoplasma puede contener granulaciones, pero son difíciles de evidenciar debido a la distribución general de la célula<sup>33</sup>.

Al unirse forman el blastema de regeneración funcionando como unidades celulares básicas para construir o reemplazar tejidos, órganos y partes del cuerpo. Todo este

mecanismo está regulado dinámicamente por un grupo de genes expresados durante este proceso<sup>32</sup>. Los neoblastos tienen diversos mecanismos por medio de los cuales regulan las tasas de división de células madre controlando así su población. Existen diversos escenarios en los cuales los neoblastos mantienen una división activa: alimentación y curación de heridas. En el primero la alimentación potencia un incremento acelerado de la tasa de neoblastos en fase M, la cual vuelve a su actividad basal días después. Algo similar ocurre en la curación de heridas, donde se presentan dos picos de neoblastos en fase M para restituir el tejido perdido, el primero de 6 a 8 horas después de la lesión durante la regeneración del blastema, y el segundo se mantiene hasta 3 días después en las células vecinas a la herida primaria<sup>26</sup>.

Una particularidad que constituye el aspecto crítico de las tasas de división de las células madre en las planarias, es la modulación de la actividad basal de proliferación celular, cuya dinámica varía según sus necesidades fisiológicas. Durante periodos de inanición las células madre de las planarias continúan dividiéndose a pesar de que el tamaño de su cuerpo disminuye por una pérdida en el número de células. El catabolismo de las células que están muriendo probablemente impulsa el mantenimiento del recambio celular, a costo de una disminución progresiva en la población neta celular. Por el contrario, la ingesta de alimentos promueve un crecimiento en el tamaño del animal. Dichos fenómenos enfatizan la importancia de las señales de control de la proliferación celular, cuyas vías incluyen señales de autorenovación local, señales de activación global en respuesta a estímulos como cambios en el metabolismo o cicatrización y redes de retroalimentación negativa para el retorno al estado basal<sup>26</sup>.

#### **2.4. Factores Bióticos**

Al igual que diversos seres vivos, las planarias poseen microbiota exógena y endógena, la cual es de suma importancia, debido a que es capaz de interferir en diferentes procesos vitales para este organismo<sup>5</sup>. Es así como se ha encontrado relación de la microbiota endógena en procesos como la inmunidad del animal y en la regeneración tisular de *Schmidtea mediterranea*<sup>5</sup>. Por otro lado, las planarias poseen una mucosa que recubre el exterior del animal, la cual posee diversos componentes como proteínas, microbiota entre otros<sup>18</sup>. Dicha mucosa cumple un

papel muy importante en la locomoción de las planarias, la evasión de los depredadores, la regeneración de los organismos etc<sup>18</sup>.

Se han realizado estudios de caracterización de la microbiota de las planarias, los cuales determinaron la presencia de taxones bacterianos ampliamente identificados en el intestino humano, entre los que se incluyen los phylum Bacteroidetes y Proteobacteria, microorganismos que han sido identificados en las planarias<sup>5</sup>. Los cambios en las poblaciones de la microbiota endógena han determinado alteraciones en la regeneración de fragmentos de planarias que han sido segmentadas como se evidencia en el registro de la figura 2; estos efectos se deben principalmente al aumento de poblaciones patógenas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas spp*, *Vogesella spp* y *Oxalobacter spp* que producen retrasos en la regeneración de las manchas oculares así como en la producción del blastema de regeneración de los fragmentos de cabeza, tronco y cola. Altas dosis de infección por *Pseudomonas spp* produjeron resultados similares, generando alteraciones en los patrones de reparación de tejidos y en algunos casos lisis completa<sup>5</sup>.



Figura 7. Efectos del metabolito indol producido por la bacteria *Aquitalea spp.* en la regeneración de la planaria. Lee FJ, Williams KB, Levin M, Wolfe BE. The Bacterial Metabolite Indole Inhibits Regeneration of the Planarian Flatworm *Dugesia japonica*.

Es importante entender otro aspecto de las interacciones huésped-patógeno, al ver que la producción de ciertos metabolitos bacterianos induce retrasos en la regeneración de los tejidos, tal es el caso de indol, producido por algunas poblaciones bacterianas que hacen parte de la microbiota de la especie *Dugesia japonica*<sup>8</sup>. Por medio de secuenciación metagenómica se pueden identificar poblaciones productoras de indol como lo son la bacteria *Aquitalea spp*, una beta proteobacteria Gram negativa, bacilar no productora de esporas, la cual produce indol a través de la degradación del triptófano por medio de la enzima triptofanasa<sup>8</sup>. Los retrasos en el desarrollo de los extremos de segmentos del tronco de la planaria se presentan por exposición a niveles detectables de concentraciones de triptófano, lo que indica que este metabolito puede ser un factor de retraso de la regeneración en las planarias. Múltiples estudios han demostrado que el indol y sus derivados inhiben la proliferación de células en varias líneas celulares humanas. La facilidad de estos estudios uniendo métodos de cultivo y secuenciación permiten manejar diferentes tipos de colonias bacterianas que son puestas en contacto con las planarias para determinar los diferentes efectos en la regeneración de tejidos<sup>8</sup>. Cabe resaltar que es posible que existan diversas funciones anexas a las ya mencionadas de la microbiota de las planarias, por ello la importancia de seguir investigando<sup>5</sup>.

## **2.5. Factores Abióticos**

Las planarias son organismos ampliamente distribuidos en diversos ecosistemas, por tal razón los factores que intervienen en su hábitat son variables y cambiantes dependiendo de la especie y su procedencia, pese a esto, comparten algunas condiciones abióticas necesarias para su desarrollo<sup>26</sup>. En su hábitat natural, las planarias permanecen mayormente en rocas y plantas acuáticas, las cuales les brindan protección ante sus depredadores, facilitan su locomoción y les proporcionan el ambiente adecuado para implantar sus huevos y mantener la población. También se han evidenciado en musgos de agua, restos contaminantes del hombre como plásticos y raramente habitando otros animales como las tortugas<sup>26</sup>.

Los cuerpos de agua que habitan las planarias presentan diferentes factores físico químicos que ejercen influencia sobre su biología y comportamiento, entre ellos se

encuentra la conductividad eléctrica, que hace referencia a la capacidad del agua para transportar corrientes eléctricas, la cual depende de la presencia de iones, su carga, concentración en el agua, temperatura, atracción entre ellos etc<sup>34</sup>; los sólidos disueltos en agua o TDS indican presencia de minerales, metales y diferentes sales disueltas en el agua; el pH es la medida de iones de hidrógeno y los iones hidroxilo en el agua, es de gran importancia en la caracterización del agua<sup>34</sup>. Los estudios evidencian que las planarias pueden vivir en un rango de pH que oscila entre 4 y 9<sup>15</sup>. Los parámetros anteriormente mencionados no tienen valor estándar en la cría de las planarias debido a la variedad de especies, procedencia, tipo de agua, entre otros.

La temperatura del agua es un factor físico variable que tiene influencia en el desarrollo, comportamiento y cría de las planarias; son organismos ectotermos, por ende no son capaces de producir su propio calor y su temperatura ambiente debe oscilar entre los 9°C y 25°C <sup>15,26</sup>. La temperatura también influye en otros aspectos de las planarias como sus periodos reproductivos, desarrollo embrionario, crecimiento, regeneración, entre otros<sup>26</sup>. Así mismo los niveles de oxígeno mínimos que debe presentar el agua se encuentran en las 4 partes por millón, debido a que estudios anteriormente realizados muestran que valores por debajo de este rango dificultan la viabilidad de los ejemplares <sup>15</sup>.

### 3. Diseño metodológico

#### 3.1. Universo, población y muestra

- **Universo:** Planarias de agua dulce a nivel mundial
- **Población:** Planarias de agua dulce pertenecientes al género *Dugesia spp.* extraídas de la Quebrada La Vieja ubicada en la ciudad de Bogotá.,
- **Muestra:** Agua de quebrada y de laboratorio, planarias, piedras y materia orgánica

#### 3.2. Hipótesis, variables, indicadores

##### Hipótesis

La biología y el comportamiento de las planarias se podría ver influenciada por los diversos factores bióticos y abióticos de su hábitat natural, o artificial cuando se trate de una cría en el laboratorio.

##### Variables

Independientes: Población bacteriana aislada e identificada en el agua, las planarias, las piedras y la materia orgánica.

Dependientes: Agua de quebrada y agua del laboratorio, pH, TDS, C.E.

##### Indicadores

Número de planarias que sobrevivieron: 43

Número de bacterias que se aislaron: 23

Tipo de microorganismos aislados: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinomicetos*, *Enterobacteriaceae*

#### 3.3. Técnicas y procedimientos

Procedimiento de recolección de las planarias de la quebrada La vieja, ubicada en los cerros orientales de Bogotá.

Materiales:

- Recipiente con agua de la quebrada para transportar a las planarias

- Pipetas Pasteur o jeringas de 10 mL para despegar a las planarias de las piedras y pasarlas al recipiente.
- Guantes de protección personal.

Procedimiento:

Las planarias se refugian debajo de las piedras de la quebrada. Por tal razón, se deben sacar las piedras que están debajo del agua y voltearlas para inspeccionar si tienen planarias, en cuyo caso, se deben despegar generando un chorro a presión con la pipeta Pasteur o jeringa para que caigan en el recipiente con agua. Posteriormente, se debe tapar de manera que proteja a las planarias de la luz, pero permite la ventilación, por ello la tapa debe tener una rendija que permita el paso del aire. Luego de tener las planarias en el recipiente se transportan al laboratorio



**Figura 8.** Quebrada la vieja



**Figura 9.** Piedra con planarias

### Procedimiento de cultivo y cría de planarias en el laboratorio.

Materiales:

- 1 litro de agua de llave autoclavada y enfriada
- Hígado de res para alimentar a las planarias
- Cuchillo estéril con luz UV para cortar el hígado
- Tubos Eppendorf esterilizados
- Pinzas estériles

- Cajas de Petri estériles
- Pipetas Pasteur.
- Contenedor de plástico con tapa para las planarias, previamente esterilizados con luz UV. Las tapas deben tener pequeños agujeros para permitir el paso del aire.
- Pilas de hielo congeladas para mantener la temperatura del agua de las planarias.
- Tabla de cocina previamente esterilizada con luz UV para cortar el hígado.
- Guantes de nitrilo para la protección y la higiene.
- Lugar de cría que permita proteger a las planarias de la luz.
- Papel Kraft para cubrir el contenedor.

Procedimiento de preparación de su entorno: Tener todos los implementos listos y esterilizados para poner las planarias en un ambiente previamente adaptado a sus condiciones de hábitat. Esto implica:

1. Esterilizar el agua en el autoclave y atemperar previamente a la recolección de las planarias.
2. Esterilizar el contenedor con luz UV en la cámara de flujo laminar durante 24 horas.
3. Adicionar el agua esterilizada y enfriada al contenedor.
4. Trasladar las planarias al contenedor usando la pipeta Pasteur.
5. Protegerlas de la luz tapando las paredes del contenedor con papel Kraft y dejarlas debajo del mesón.

Procedimiento de preparación del alimento:

1. Lavar el hígado con agua de llave.
2. Cortarlo en porciones de 4x4x4 milímetros.
3. Almacenar el hígado cortado en tubos Eppendorf y llevarlos al congelador

Procedimiento de alimentación:

1. Se debe descongelar el alimento a temperatura ambiente.

2. Llenar con agua esteril  $\frac{3}{4}$  partes del volumen las cajas de Petri.
3. Agregar de 5-6 porciones de hígado a las cajas de Petri con ayuda de pinzas estériles
4. Transferir las planarias a las cajas de Petri.
5. Esperar de 1-2 horas a que los animales se hayan alimentado completamente.
6. Eliminar el agua y el hígado en otro contenedor y enjuagar las planarias con agua esteril 2-3 veces.
7. Lavar los contenedores con agua esteril.
8. Añadir agua esteril al contenedor.
9. Poner las planarias en el contenedor limpio con ayuda de las pipetas Pasteur.
10. Repetir este procedimiento cada vez que se alimenten a las planarias.
11. Realizar la limpieza de todos los implementos utilizados y llevarlos a esterilización



**Figura 10.** Alimentación de las planarias.

Procedimiento para el estudio de la vitalidad y comportamiento de las planarias.

1. Verificación de la población de las planarias, contando el número de individuos cada semana y comparando con los datos globales. Para ello, empleamos cajas de Petri y pipetas Pasteur estériles, cada planaria se pasaba individualmente a las cajas de Petri por medio de las pipetas Pasteur para llevar el respectivo conteo. Posterior a esto, se anotaban en el diario de campo el dato obtenido y se comparaba con el dato inicial y el de la semana anterior

para evidenciar los cambios poblacionales. Cabe resaltar que este procedimiento se realizó cada semana por 3 meses consecutivos.

2. Observación visual del comportamiento de las planarias en el contenedor y del crecimiento en el estereoscopio. Las planarias fueron observadas cada vez que eran alimentadas y cuando se realizaban los cambios de agua periódicamente. Los análisis se enfocaron en estudiar características como, costumbres de alimentación, fotofobia, interacción entre individuos y lugares de desplazamiento y permanencia. Las observaciones fueron registradas descriptivamente de acuerdo con los criterios específicos mencionados.



**Figura 11.** Planaria observada en el estereoscopio.

### Procedimiento de medición fisicoquímica del agua de la quebrada y del agua de las planarias del laboratorio.

Para realizar estos procedimientos se empleó el equipo Oakton Waterproof se realizó la medición de diferentes parámetros como pH, total de sólidos disueltos y conductividad del agua a estudiar (ver figura 12).

Con el termómetro digital Extech Instruments se midió la temperatura del agua de las planarias de laboratorio y el agua de la quebrada (ver figura 13).

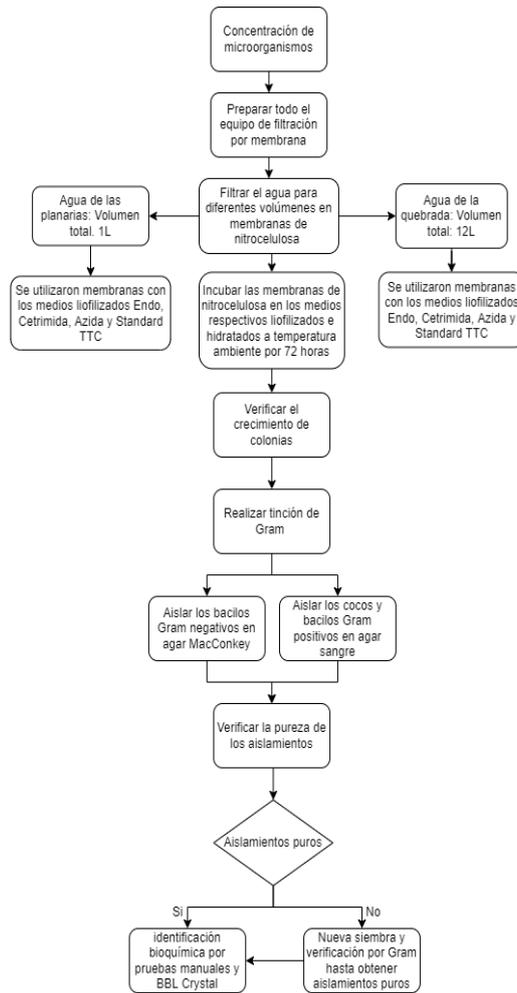


**Figura 12.** Medición de diferentes parámetros por medio del equipo Oakton Waterproof.



**Figura 13.** Medición de la temperatura por medio termómetro digital Exttech Instruments.

Procedimiento para la concentración de microorganismos presentes en el agua de planarias de laboratorio y el agua de la quebrada. El procedimiento se observa en las figuras 14 y 15.



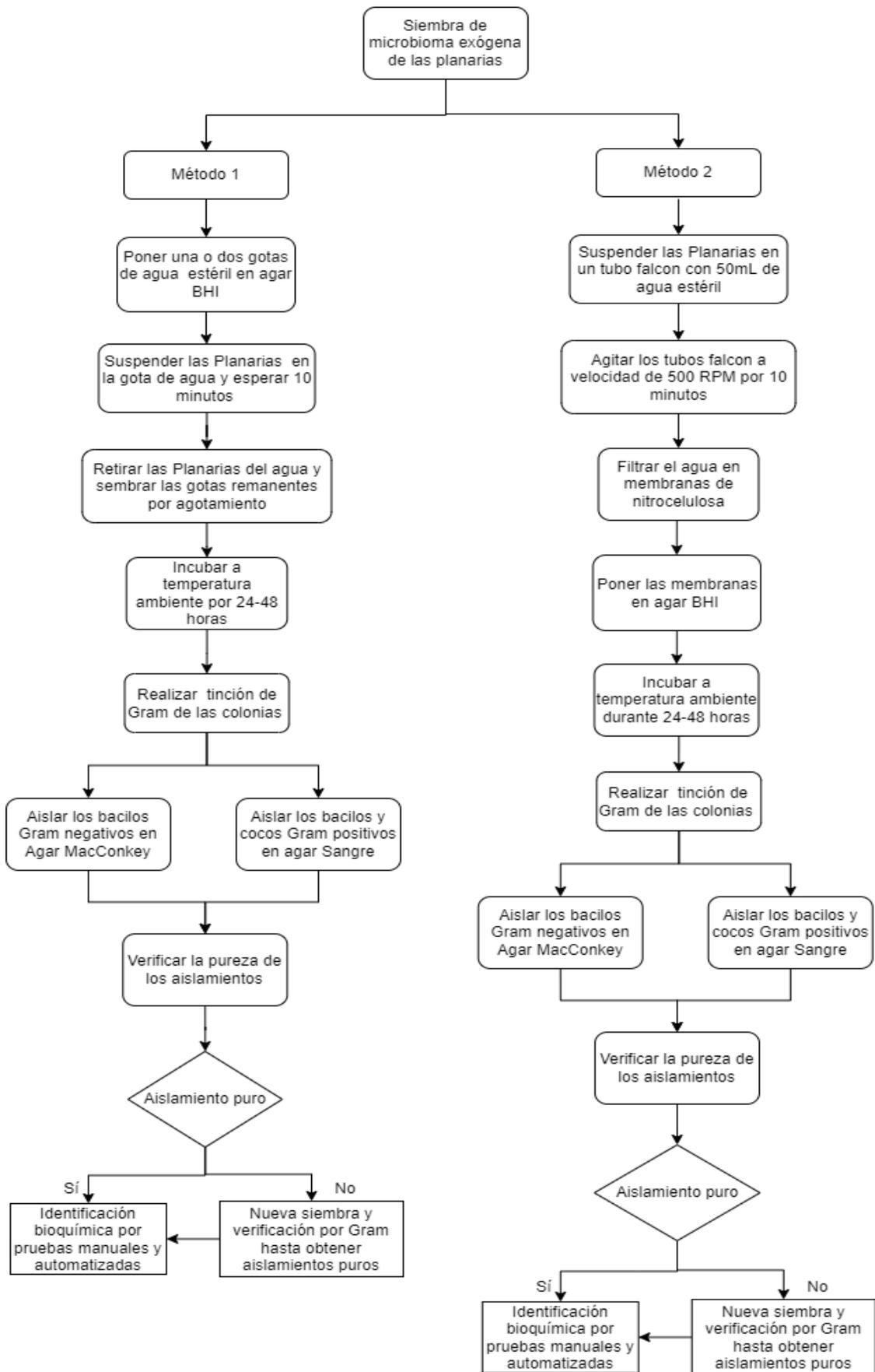
**Figura 14.** Diagrama de procedimiento para la concentración de microorganismos presentes en el agua de quebrada y en el agua de planarias de laboratorio.



**Figura 15.** Proceso de filtración del agua para la concentración de microorganismos.

Procedimiento para la siembra de la microbiota exógena presente en las planarias de laboratorio y de la quebrada, en la materia orgánica presente en las piedras y las piedras sin cobertura orgánica

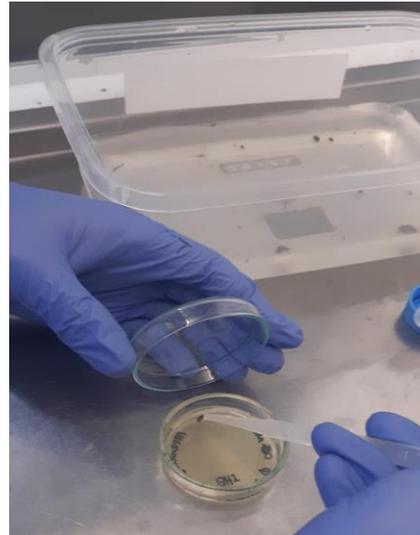
1. En esta fase las planarias de laboratorio eran especímenes tomadas de la quebrada La Vieja, las cuales se sometieron a un proceso de cría controlado en el laboratorio durante 3 meses. Para llevar a cabo esta fase, a las planarias de laboratorio se les restringió la alimentación por una semana para evitar alteraciones en el estudio. Las planarias de la quebrada eran organismos que se encontraban en las piedras de la quebrada y con 3 horas de recolectadas las muestras para evitar alteraciones. Para el procedimiento de la siembra se emplearon dos métodos diferentes con el fin de aislar la mayoría de bacterias posibles, que se observan en el diagrama de procedimientos para la siembra de microbiota exógena de las planarias.



**Figura 16.** Diagrama de procedimientos para la siembra de microbiota exógena de las planarias.

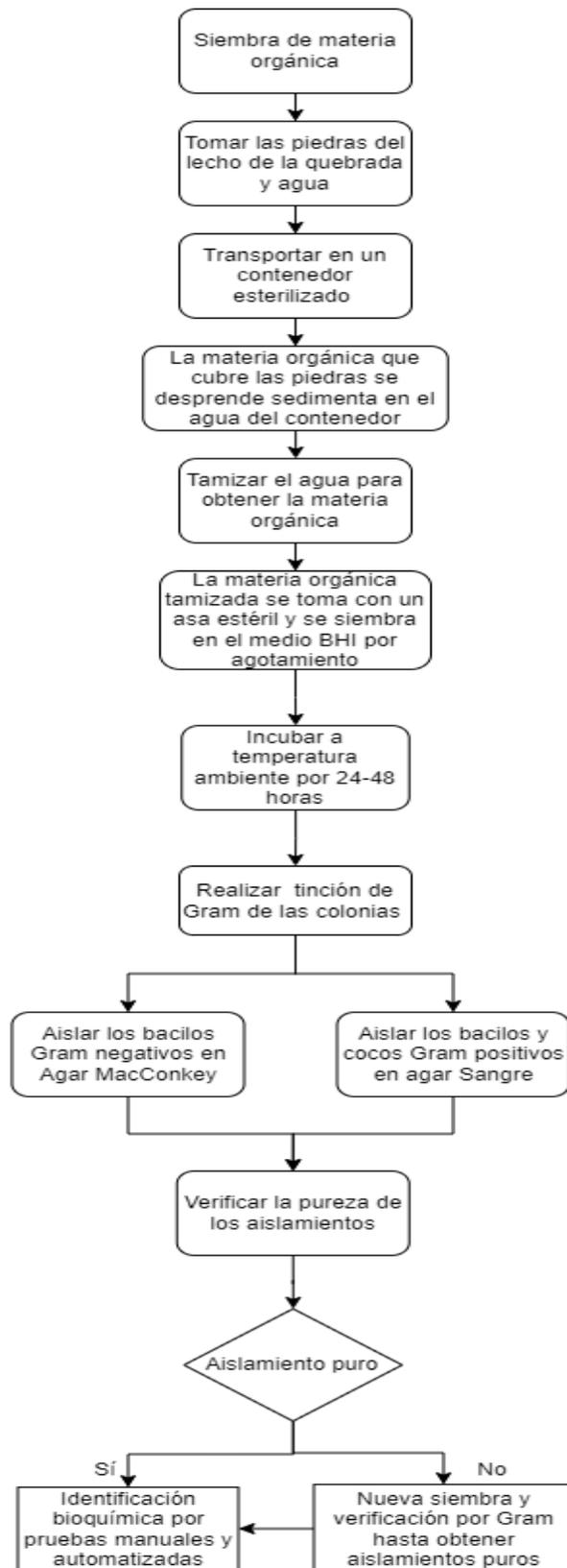


**Figura 17.** Agitación de los tubos Falcon.

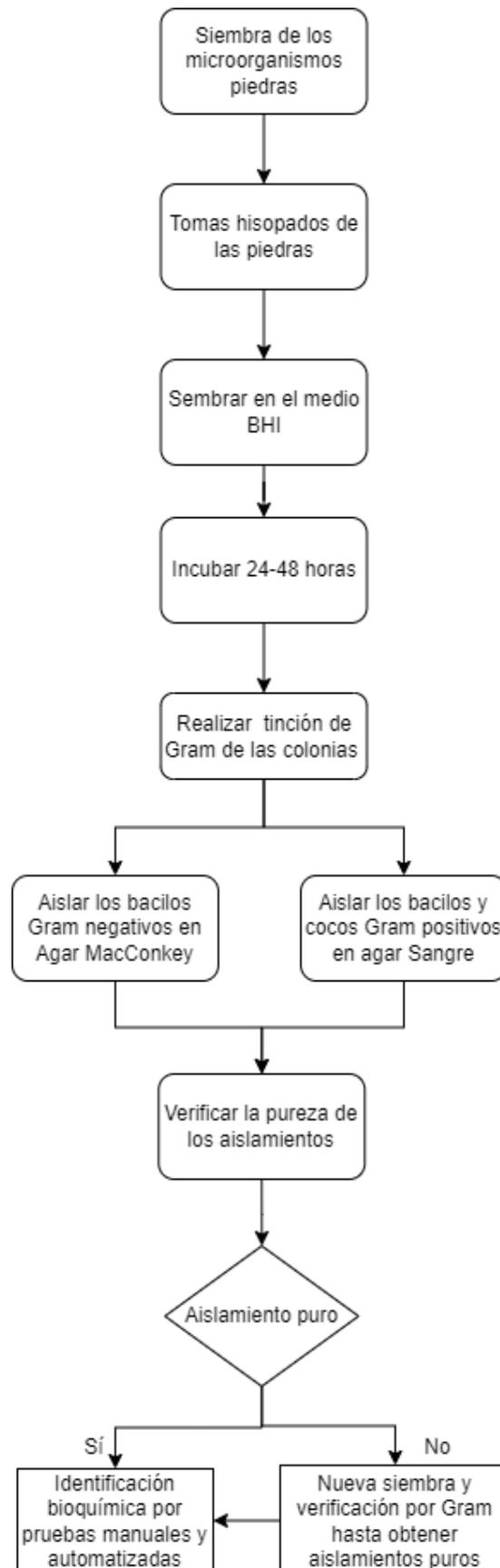


**Figura 18.** Siembra de planaria en medio de cultivo.

2. Siembra de las piedras de la quebrada en donde se encontraban las planarias y de la materia orgánica que cubría las piedras. Los procesos que se llevaron a cabo se observan en los diagramas de procedimientos para la siembra de los microorganismos presentes en el musgo y en el diagrama de procedimientos para la siembra de los microorganismos presentes en las piedras.



**Figura 19.** Diagrama de procedimientos para la siembra de los microorganismos presentes en el musgo.



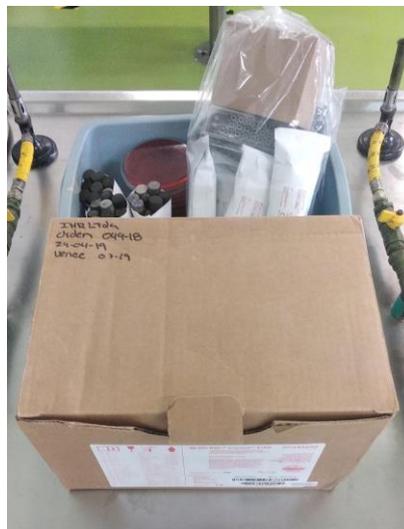
**Figura 20.** Diagrama de procedimientos para la siembra de los microorganismos presentes en las piedras.

Nota aclaratoria: La purificación de los aislamientos se realizó en condición de temperatura ambiente por un periodo de 48-72 horas.

### Procedimiento para la Identificación bioquímica de microorganismos

Se realizaron pruebas bioquímicas en tubo y automatizadas para las bacterias obtenidas en la fase 6.

1. Pruebas manuales: Los bacilos Gram positivos aislados previamente en el procedimiento anterior se inocularon en los medios de pruebas bioquímicas para bacilos Gram positivos nombrados a continuación: Almidón, Motilidad, Glucosa, NaCl, Urea, Xilosa, Simmons Citrato y Arabinosa. Posteriormente, se incubaron los medios a temperatura ambiente y se realizó la lectura de los resultados a las 24 horas. La comparación de los resultados se realizó con el manual de bacteriología sistemática de Bergey's <sup>35</sup>.
2. Pruebas con sistema BBL Crystal: Se prepararon los inóculos de los aislamientos puros para bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos y algunos bacilos Gram positivos que no fue posible identificar por pruebas manuales, el procedimiento de siembra y posterior identificación se realizó siguiendo las instrucciones del protocolo para sistemas BBL Crystal <sup>36, 37</sup>.



**Figura 21.** Pruebas bioquímicas para identificación de los microorganismos.

## 4. Resultados

### Medición Físico Química

Para evaluar los factores abióticos se midieron 4 parámetros físico químicos en el agua de la quebrada y en el agua de laboratorio, los cuales fueron: pH, conductividad eléctrica, total de sólidos disueltos y temperatura. Como se evidencia en las tablas 1 y 2 los valores de los parámetros son menores en el agua de la quebrada a excepción del pH que es igual para los dos tipos de agua.

La elección de los parámetros obedeció a la disponibilidad del equipo utilizado (Oakton waterproof) y la cantidad de factores físico químicos que podía medir.

**Tabla 1. Medición de las propiedades fisicoquímicas del agua de la quebrada**

<b>Agua de la Quebrada</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
pH	6,75
Temperatura	11.8 °C
Conductividad eléctrica	45,2 uS
Total sólidos disueltos	20,4 ppm

**Tabla 2. Medición de las propiedades fisicoquímicas del agua del laboratorio**

<b>Agua de Planarias</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
pH	6.75
Temperatura	17.5 °C
Conductividad eléctrica	130,8 uS
Total sólidos disueltos	65.6 ppm

## **Caracterización de la población bacteriana**

La diversidad bacteriana obtenida en el agua, las planarias, materia orgánica y piedras permite dilucidar el alcance de los métodos aplicados para el aislamiento e identificación de los microorganismos. El método de filtración por membrana se aplica en la microbiología industrial para la determinación de los coliformes presentes en el agua por contaminación. Dicho método fue modificado en el presente proyecto para la identificación de las bacterias presentes en el agua de laboratorio y quebrada y para la identificación de las bacterias exógenas de las planarias aplicando la metodología 2, cabe resaltar que el propósito de dicha modificación fue concentrar las bacterias presentes en el agua para la posterior identificación a diferencia de la utilidad del método original que es realizar un conteo de la cantidad de coliformes totales.

Los sistemas de identificación empleados fueron pruebas bioquímicas automatizadas (sistema BBL Crystal) y manuales (agares preparados en tubos) como se mencionó anteriormente, estas últimas se usaron debido a la disponibilidad limitada de las pruebas automatizadas. Los fundamentos de los dos tipos de pruebas se basan en reacciones metabólicas como oxidación, fermentación, degradación e hidrólisis de los sustratos. Como se puede ver en las tablas a continuación, los resultados de las pruebas Crystal arrojan la probabilidad de la identificación de los microorganismos aislados con respecto a una certidumbre del 100% según el conjunto de reacciones metabólicas de cada bacteria. Dicha probabilidad no aplica para la identificación por pruebas manuales.

### **Bacterias presentes en el agua de planarias de laboratorio y el agua de la quebrada**

Las bacterias identificadas en el agua de la quebrada son Gram positivas en su mayoría, como se puede ver en la tabla 3. Las especies predominantes pertenecen al género *Bacillus spp.*; Otras especies identificadas fueron *Corynebacterium kutscheri*, *Staphylococcus capitis* y *Brevundimonas vesicularis*, bacteria Gram negativa. Cabe resaltar que en el agua de planarias de laboratorio no se aisló bacteria alguna.

**Tabla 3. Bacterias presentes en el agua de la quebrada**

Agua de Quebrada	
Bacteria	Probabilidad
<i>Bacillus sphaericus</i>	99.9% *
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	98.64% *
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	97.0% *
<i>Staphylococcus capitis</i>	96.89% *
<i>Bacillus cereus</i>	NA **
<i>Bacillus jeotgali</i>	NA **
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	NA **

\* Identificación realizada por pruebas Crystal.

\*\* NA: La probabilidad no aplica

Para la identificación de algunos bacilos Gram positivos se realizaron las pruebas manuales nombradas en la siguiente tabla. La comparación de los resultados se realizó con el manual de bacteriología sistemática de Bergey´s <sup>35</sup>.

**Tabla 4. Resultados de pruebas bioquímicas manuales para identificación de bacilos Gram positivos en el agua de la quebrada**

Prueba	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus jeotgali</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
Almidón	+	+	+
Arabinosa	-	-	-
Glucosa	+	+	+
Motilidad	+	+	+
NaCl	+	+	-
Simmons Citrato	+	-	+
Urea	+	+	+
Xilosa	-	-	-

### Planarias de la Quebrada

Para realizar el aislamiento de estas bacterias se empleó dos metodologías con el fin de aislar la mayoría de bacterias presentes en las planarias. En la tabla 4 y 5 se evidencia la variedad de bacterias aisladas, predominan los bacilos Gram negativos (*Kluyvera cryocrescens*, *Chryseobacterium indologenes*, *Pantoea agglomerans*, *Burkholderia cepacia*) en comparación con el bacilo Gram positivo (*Rothia dentocariosa*).

**Tabla 5. Bacterias aisladas de las planarias de la quebrada aplicando la metodología 1**

Planarias quebrada Metodología 1	
Bacteria	Probabilidad

<i>Kluyvera cryocrescens</i>	99% *
<i>Rothia dentocariosa</i>	99.84% *
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	73% *

\* Identificación realizada por pruebas Crystal.

**Tabla 6. Bacterias aisladas de las planarias de la quebrada aplicando la metodología 2**

Planarias quebrada Metodología 2	
Bacteria	Probabilidad
<i>Pantoea agglomerans</i>	98.62% *
<i>Burkholderia cepacia</i>	88%% * *

\* Identificación realizada por pruebas Crystal.

### Planarias de Laboratorio

Al igual que en el aislamiento de las planarias de quebrada, se emplearon dos metodologías con el fin de aislar e identificar la mayoría de bacterias posibles. Como se puede evidenciar en la tabla 6 y 7 la totalidad de bacterias aisladas en las planarias de laboratorio son Gram negativas.

**Tabla 7. Bacterias aisladas de las planarias de laboratorio aplicando la metodología 1**

Planarias laboratorio metodología 1	
Bacteria	Probabilidad
<i>Burkholderia cepacia</i>	99% *

\* Identificación realizada por pruebas Crystal.

**Tabla 8. Bacterias aisladas de las planarias de laboratorio aplicando la metodología 2**

Planarias laboratorio Metodología 2	
Bacteria	Probabilidad
<i>Shigella spp</i>	99% *
<i>Serratia liquefaciens</i>	86% *

\* Identificación realizada por pruebas Crystal.

### Materia orgánica

En la materia orgánica se aisló diversidad de bacterias pertenecientes a diferentes géneros como se evidencia en la tabla 8, predominan las bacterias Gram negativas (*Burkholderia cepacia*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia fonticola*) a excepción de *Gemella morbillorum*, bacteria Gram positiva.

**Tabla 9. Bacterias aisladas de la materia orgánica**

Materia Orgánica
------------------

Bacteria	Probabilidad
<i>Burkholderia cepacia</i>	99.98% *
<i>Panthoea agglomerans</i>	98% *
<i>Serratia fonticola</i>	91% *
<i>Gemella morbillorum</i>	79.39% *

\* Identificación realizada por pruebas Crystal.

## Piedras

En la identificación de las bacterias de las piedras se utilizaron pruebas Crystal para 4 de las 6 bacterias aisladas. Como se evidencia en la tabla 9 el 50% de las bacterias son Gram positivas (*Acinetobacter baumannii*, *Halobacillus halophilus*, *Aneurinibacillus migulanus*) y el otro 50% son Gram negativas (*Serratia fonticola*, *Shigella spp.*, *Shigella dysenteriae*).

**Tabla 10. Bacterias aisladas de las piedras**

Piedras	
Bacteria	Probabilidad
<i>Serratia fonticola</i>	98.5% *
<i>Shigella spp.</i>	95.88% *
<i>Shigella dysenteriae</i>	92.76% *
<i>Acinetobacter baumannii</i>	82% *
<i>Halobacillus halophilus</i>	NA **
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	NA **

\* Identificación realizada por pruebas Crystal.

\*\* NA: La probabilidad no aplica

Como se mencionó anteriormente, parte de la identificación de las bacterias se realizó por métodos manuales empleando las pruebas enunciadas en la tabla 11. La comparación de los resultados se realizó con el manual de bacteriología sistemática de Bergey's <sup>35</sup>.

**Tabla 11. Resultados de pruebas bioquímicas manuales para identificación de bacilos Gram positivos en las piedras**

Prueba	<i>Halobacillus halophilus</i>	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>
Almidón	+	+
Arabinosa	-	-
Glucosa	-	-
Motilidad	+	+
NaCl	+	+
Simmons Citrato	-	+
Urea	-	-
Xilosa	-	-

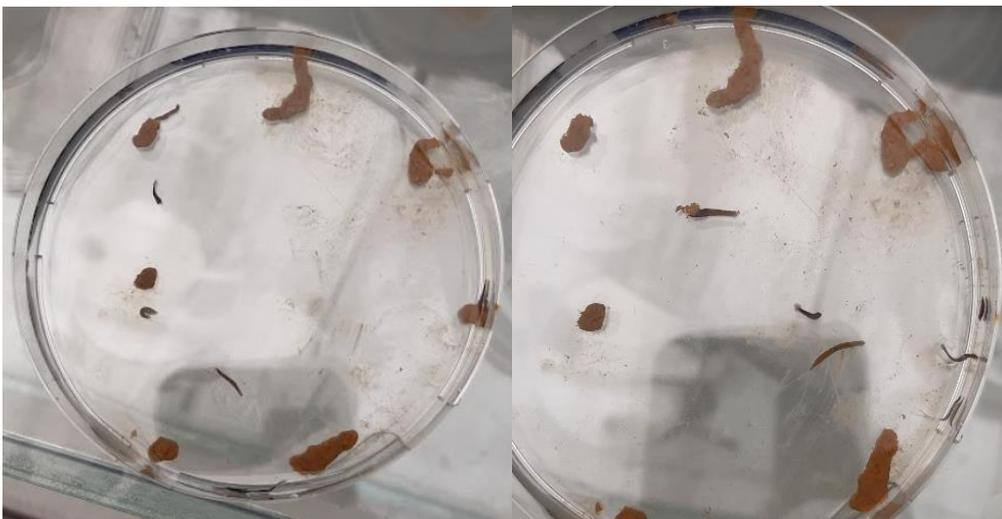
## Comportamiento de las Planarias

Se analizó el comportamiento de las planarias en cuanto a alimentación, vitalidad, movilidad, aversión a la luz y regeneración en casos específicos.



**Figura 22.** Planarias de laboratorio

En la cría de planarias se observó que su frecuencia de alimentación era semanal, a pesar de que se les administraba alimento 2 veces por semana. Una situación observada fue al momento de comer, no buscaban el alimento de manera inmediata, primero inspeccionaban su entorno y luego se dirigían hacia el alimento. También se observó que su lugar predilecto para la alimentación era cerca de las paredes de los contenedores, y se alimentaban de manera menos frecuente en el punto central de los contenedores.



**Figura 23.** Planarias alimentándose

Por otro lado, se observó que las planarias tienden a desplazarse hacia las paredes y permanecer allí luego del cambio de contenedores. Como es natural de las planarias, también se observó fotofobia e hiperactividad cuando son expuestas a la luz del estereoscopio para la observación.



**Figura 24.** Planarias agrupadas cerca a la pared

Cabe destacar que se observó la formación del blastema de regeneración en algunos individuos que no tenían bien desarrollado el extremo posterior al momento de recolectar las muestras.



**Figura 25.** Blastema de regeneración

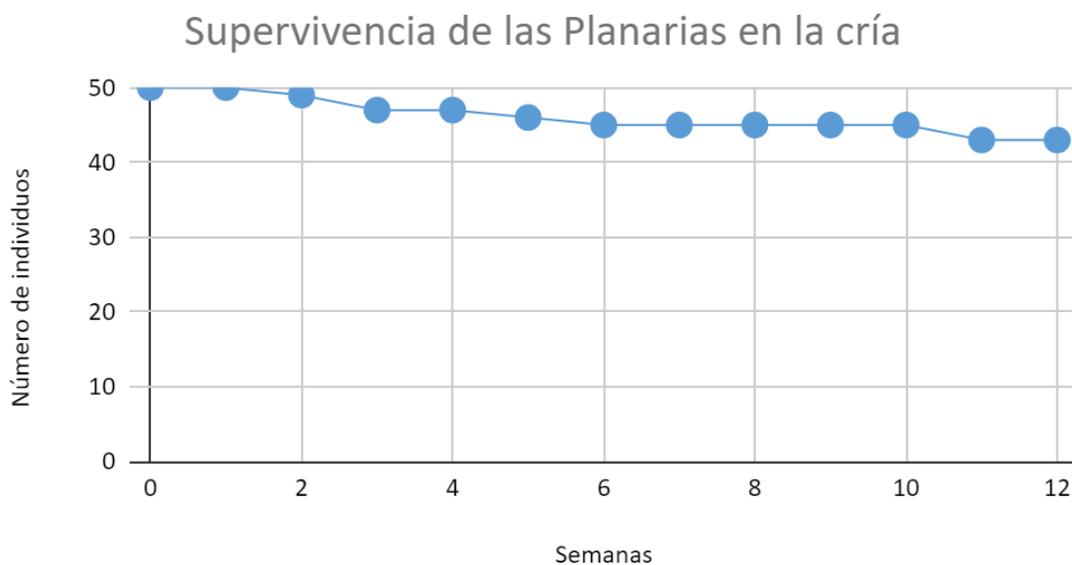
El seguimiento de la supervivencia se realizó contando el número de individuos vivos semanalmente durante 12 semanas.

### Supervivencia de las Planarias

En la tabla 10 y en la figura 26 se puede observar el seguimiento poblacional de las planarias de laboratorio durante 12 semanas. La población inicial fue 50 planarias (semana 0), el conteo indica que hubo una disminución del 14% es decir 7 planarias, para terminar con una población final de 43 individuos.

**Tabla 12.** Seguimiento de la supervivencia de las planarias

Semanas	Nº de individuos
0	50
1	50
2	49
3	47
4	47
5	46
6	45
7	45
8	45
9	45
10	45
11	43
12	43



**Figura 26.** Gráfico de supervivencia de las Planarias

## 5. Discusión

El presente trabajo determinó las diferencias y similitudes entre las propiedades fisicoquímicas básicas del agua de la quebrada la Vieja, ubicada en los cerros orientales de Bogotá, entorno natural de las planarias, y el agua usada para criar las planarias en el laboratorio. El pH determinado para los dos tipos de agua fue de 6,75. Dicho valor se encuentra dentro del rango proporcionado por los estudios realizados e indica que este parámetro químico del agua no es un factor limitante para la supervivencia de las planarias debido al amplio rango de variabilidad entre ecosistemas, como lo demostraron Rivera et al. <sup>15, 26</sup> al evaluar los efectos de un amplio rango de valores de pH entre 3 y 9, encontrando que las planarias presentan un 100% de mortalidad al ser expuestas a pH 3 y un grado máximo de reproducción a un pH 8. Adicionalmente, los autores comentan que el pH de la mayoría de los cuerpos de agua dulce del mundo se encuentra en el rango 4 a 9 y que los organismos habitantes de dichas fuentes de agua tienen los mecanismos fisiológicos necesarios para adaptarse a dichas variaciones. Vale la pena mencionar de nuevo, que los valores de pH de los dos tipos de agua en el presente estudio fueron iguales para resaltar que, en caso de que hubiesen sido diferentes, no habrían presentado mayor dificultad para las planarias, teniendo en cuenta el amplio rango en el que podrían haber variado y la supervivencia previamente comprobada de las planarias en relación con el parámetro en cuestión.

Es importante citar que, aun cuando las planarias tienen gran capacidad de adaptación a un amplio rango de potencial de hidrógeno en el agua, determinados valores de la concentración de iones de hidrógeno pueden alterar su fisiología y comportamiento. Las planarias presentan esta capacidad mediante la secreción de fluidos metabólicos y mucosidades que modifican el pH del ambiente en el que viven, dichas modificaciones se producen de acuerdo con las necesidades fisiológicas de cada especie<sup>38</sup>. Es aquí cuando más se destaca la particularidad de que las planarias de agua dulce sean capaces de vivir en ecosistemas con amplios rangos de pH, pero independiente a la adaptabilidad, surge la necesidad de estudiar cómo se afecta su biología con las variaciones de pH ambientales, y en qué medida son suficientes las

capacidades propias de las planarias para contrarrestar los cambios extremos de pH en su ambiente para mantener la homeostasis de su organismo.

En concordancia con la necesidad planteada, y con la importancia de saber si hay estudios que hayan investigado el interrogante planteado, para saber qué implicaciones tienen los valores de pH obtenidos en el presente proyecto experimental, se realizó una revisión de la literatura para encontrar estudios que evaluaran los efectos del pH en las planarias. En efecto, investigadores del Laboratorio de Planarias (LaPla) en asociación con el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de Hongos, del Instituto de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, Brasil, analizaron los efectos de diferentes niveles de pH en planarias del género *Girardia* sp. y de la especie *Girardia tigrina* incubadas en agua a 20°C. Las planarias expuestas a un pH 3.0 presentaron contorsiones, liberación de moco y murieron después de los 5-15 minutos de exposición. A un pH de 4.0 y 10.0 el cuerpo de las planarias comenzó a hincharse, liberaron moco y se movieron lentamente o permanecieron inmóviles. Los ejemplares incubados a pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0 no presentaron afectación visible o cambios atípicos en su comportamiento. Adicionalmente, las planarias de la especie liberaron capullos a pH 7.0. Otra observación sumamente llamativa fue la variación del pH después de 3 y 18h horas de incubación. A niveles bajos de pH las planarias fueron capaces de alcalinizar el medio y a niveles altos fueron capaces de acidificarlo, con unos niveles finales que se ubican en el rango de pH 6.1 a 7.63. Al comparar el valor de pH del presente experimento (6.75) con los resultados de la investigación anteriormente mencionada se puede ver que el valor obtenido se encuentra dentro del rango óptimo para la cría y supervivencia de las planarias sin presencia de alteraciones en su cuerpo o en su comportamiento<sup>39</sup>.

Como se ha mencionado, la temperatura es otro factor abiótico determinante en la supervivencia de las planarias. De hecho, algunos investigadores afirman que es el factor abiótico más importante a la hora de considerar cambios fisiológicos en los sistemas biológicos<sup>40</sup> y es determinante en el metabolismo<sup>41</sup>. Vale la pena recordar que la actividad fisiológica de los seres vivos depende en gran manera de sus sistemas de termorregulación los cuales, a su vez, están implicados en el desarrollo de los órganos<sup>41</sup>. Los resultados del presente proyecto de investigación indican que

la temperatura medida se encuentra dentro del rango óptimo para las planarias de agua dulce, 11.8°C para el agua de la quebrada y 17.5°C para el agua de laboratorio. Recordando que el rango de temperatura de las planarias es de 9°C-25°C, los ejemplares nunca mostraron signos de alteración de su comportamiento como lentitud en el desplazamiento, inmovilidad, movimientos erráticos o daño corporal en la observación al estereoscopio. Los individuos siempre presentaron el comportamiento habitual de movimiento continuo con desplazamiento en línea recta habitual de las planarias de agua dulce. Sin embargo, vale la pena tener en cuenta el estudio realizado por Hammoudi et al.<sup>42</sup> que indica el efecto negativo de temperaturas superiores a los 25°C sobre planarias de la especie *Schmidtea mediterranea*, ampliamente usadas en estudios de regeneración e interacciones huésped-patógeno. Al incubarlas a 30°C y 32°C, presentaron una mortalidad del 100% en 4 y 18 días respectivamente. Adicionalmente, los investigadores descubrieron que las planarias son capaces de eliminar patógenos humanos como el *Staphylococcus aureus*<sup>43</sup> y que dicha respuesta inmune se exagera al incubarlas a temperaturas de 26°C y 28°C en comparación con la temperatura de mantenimiento habitual(20°C)<sup>42</sup>. Este hallazgo se trae a colación para resaltar la importancia que tiene la temperatura en la cría de las planarias de agua dulce y los posibles efectos que pueden producir sus variaciones en su biología.

Los cambios epidérmicos registrados en planarias del género *Girardia* sp. y de la especie *Girardia tigrina* aplicando el Máximo Térmico Crítico, parámetro utilizado para evaluar el estrés térmico en los organismos, mostraron que al incubar dichos ejemplares a temperaturas de 37°C y 33°C respectivamente se presentan daños en la epidermis dorsal, como ausencia de poros excretores, disminuida cantidad de gotitas secretoras, formación de hendiduras con presencia de células atípicas y ausencia de estructuras ciliares<sup>39</sup>. Todos estos datos complementan la evidencia obtenida en las mediciones térmicas del presente proyecto y ratifican la importancia de mantener una adecuada temperatura para la cría de planarias en el laboratorio.

Por otro lado, se encuentran los TDS (Total de Sólidos Disueltos), los cuales suelen estar presentes en el agua naturalmente, su composición y concentración suele estar mediada por diferentes factores como la geología, el suelo, la precipitación atmosférica, el balance hídrico y en algunos casos, la intervención humana.

Dependiendo de los factores anteriormente mencionados los TDS pueden estar compuestos por diferentes iones como: sodio, calcio, magnesio, potasio, cloro, sulfatos, nitratos, bicarbonatos, entre otros; por materia orgánica y otros componentes disueltos en el agua. Cabe resaltar que la salinidad del agua depende de los iones disueltos; Las altas concentraciones de TDS no indican propiamente si el cuerpo de agua está contaminado o si es saludable, pero si puede causar daños en los diferentes organismos y microorganismos que habitan en ella, estos cambios pueden estar mediados por diferentes actividades antropogénicas como los efluentes de la minería, tratamiento industrial del agua<sup>44</sup> o como en este caso, en la quebrada la vieja, se observan diferentes vertientes de agua que contaminan el ecosistema, adicional a estos, el paso no estaba restringido, por ello las personas entraban con sus mascotas, generaban desechos como heces, orina, salivación etc, lo que podría interferir en el equilibrio del ecosistema y en el aumento o disminución de los TDS o componentes puntuales de estos. Pese a la intervención antrópica es importante tener en cuenta que la quebrada La Vieja es un cuerpo de agua en movimiento, de manera que las moléculas siempre están fluyendo y por esta razón la cantidad TDS es menor en la quebrada al comparar el parámetro con el agua de laboratorio.

Los TSD y la conductividad eléctrica, tienen una relación directamente proporcional debido a que concentraciones altas de TDS conllevan a tener una alta conductividad eléctrica. Esto se puede evidenciar en el presente trabajo en las mediciones que se realizaron en los dos tipos de agua (laboratorio y quebrada). Recordando que la temperatura del agua de laboratorio es mayor, y teniendo en cuenta que es agua de grifo esterilizada, hay dos razones importantes por las que el valor de conductividad eléctrica es mayor. A mayor temperatura mayor excitación de las partículas presentes en disolución acuosa, incluyendo los iones que le dan al agua su capacidad de conductividad eléctrica. Adicionalmente, se registra una mayor cantidad de partículas iónicas en el agua de llave según el decreto 475 de 1998, por el cual se expiden normas técnicas de calidad del agua potable expedido por el ministerio de salud pública. La cantidad permisible de compuestos químicos implica la presencia de una gran diversidad elementos como: Aluminio, Antimonio, Bario, Boro, Cadmio, Cloro, Cobre, Cromo Hexavalente, Molibdeno, Níquel, Nitritos, Nitratos, Plata y Selenio; que en conjunto aportan una mayor carga y conductividad en el agua de llave, en comparación con el agua de la quebrada<sup>45</sup>.

El estudio de los factores bióticos se centró en la microbiota de las planarias y en la diversidad microbiológica de su entorno, incluyendo el agua, las piedras donde habitan y la materia orgánica de la que se alimentan en su entorno natural. El análisis microbiológico del agua de la quebrada La Vieja mostró una población ampliamente dominada por el filo de los firmicutes, aunque también presenta un miembro de las actinobacterias y una de las proteobacterias. El género *Bacillus* spp. destaca por estar presente en gran parte de los aislamientos, en este sentido vale la pena recordar que son bacterias saprófitas ampliamente distribuidas en el ambiente natural, aisladas de todo tipo de suelos, de cuerpos de agua dulce y agua marina<sup>46</sup>. La especie que más presencia tuvo en los aislados de *Bacillus* spp. fue *Bacillus sphaericus*, bacteria ampliamente utilizada en programas de biocontrol de larvas de mosquitos en distintas regiones del mundo<sup>47</sup>. Estas propiedades de biocontrol se mencionan debido a que en el momento del estudio, estaba en curso la temporada invernal y aumentó la población de larvas de mosquitos en el lecho de la quebrada, de esta forma se hacía necesaria la presencia de un biocontrolador natural. La presencia de *Corynebacterium kutscheri* es bastante llamativa debido a que no se encuentra en los ambientes naturales, es un comensal asociado con ratas, ratones, y hamsters<sup>46, 48</sup>, y un patógeno oportunista tanto de roedores como humanos<sup>46</sup>. Por otro lado, vale destacar la presencia de *Staphylococcus capitis*, otra bacteria que no se aísla de entornos naturales, por lo contrario, está presente en la cabeza, especialmente donde las glándulas sebáceas son abundantes<sup>49</sup>. Aunque es flora normal puede encontrarse en especímenes clínicos como el fluido cerebroespinal y causar graves infecciones como la meningitis post craneotomía<sup>50</sup>. Es importante recordar que más allá de su patogenia, las poblaciones naturales de estafilococos se asocian con sitios anatómicos de los animales de sangre caliente como la piel, las glándulas cutáneas y las membranas mucosas. Por último, cabe mencionar la presencia de una alfa proteobacteria, *Brevundimonas vesicularis*. Si bien es una bacteria común del agua, también se ha aislado en especímenes clínicos de humanos y animales<sup>46</sup>. Es una bacteria potencialmente patógena para el ser humano, causando artritis séptica, infecciones del torrente sanguíneo después de procedimientos médicos relativos a trasplante de médula ósea, cirugía a corazón abierto y diálisis peritoneal ambulatoria. También es causante de queratitis después de cirugía láser<sup>51</sup>.

Las planarias, son organismos muy diversos, sometidos a diferentes variaciones en su entorno, por ello poseen una mucosa externa que les confiere diferentes propiedades que ayudan a la supervivencia y desarrollo como se mencionó anteriormente. Dicha mucosa posee diversos componentes, los cuales ayudan al desarrollo de las planarias, uno de ellos es la microbiota, factor biótico importante para la protección y biología de estos animales, por ello en el presente proyecto se evaluó la presencia de microorganismos de tipo bacteriano en la mucosa externa de las planarias de la quebrada La Vieja y las planarias de laboratorio, esto se realizó por medio de dos metodologías diferentes para lograr una mejor captación de los microorganismos presentes en ellas. Para evitar posibles alteraciones de la microbiota externa de las planarias de la quebrada, se recolectaron el mismo día que se iban a realizar los procedimientos de cultivo, empleando materiales estériles a la hora de recolectarlas para evitar al máximo la interferencia con factores externos que alterara los resultados del presente proyecto<sup>18</sup>.

Es así como en las planarias de la quebrada La Vieja, se encontró una variedad de microorganismos, representados en los filos: actinomicetos, bacteroidetes y proteobacterias. Los actinomicetos están representados por *Rothia dentocariosa*, su morfología se puede observar desde cocos hasta formas filamentosas, Gram positivas encapsulados, aerobios o anaerobios facultativos<sup>52</sup>. *Rothia* spp, se puede encontrar ampliamente distribuida en aire, suelo, agua o habitando la microbiota de mamíferos sin causar patología a excepción de tres especies (*R. aeria*, *R. dentocariosa*, *R. mucilaginoso*)<sup>53</sup>. Sin embargo, *R. dentocariosa* se ha aislado de cavidades bucofaríngeas en el humano como microbiota normal debido a que se encuentra asociada a la caries, varios autores reportan diferentes enfermedades atribuidas a esta bacteria; sin embargo, es considerada como un microorganismo oportunista, una de las patologías más complejas es la endocarditis infecciosa, bacteriemias, endoftalmitis, úlceras corneales, artritis séptica, neumonía y periodontitis<sup>54, 55</sup>. La presencia de este microorganismo es importante y deja en evidencia la influencia y posible afectación de los humanos hacia los ecosistemas, al ser habitante natural de la microbiota humana y al no tener la quebrada restricción alguna del paso, se puede analizar que posiblemente es un organismo añadido a este hábitat, es de aclaración que allí las personas y diferentes animales de compañía

hacen sus necesidades fisiológicas, por ello diferentes microorganismos hallados se pueden ver influenciados por dichas interferencias en los ecosistemas naturales.

Otro microorganismo identificado fue *Chryseobacterium indologenes*, un bacteroidete, bacilo Gram negativo inmóvil, se ha aislado del suelo, plantas, alimentos, cuerpos de agua dulce, salada y potable, debido a que es resistente al cloro<sup>54</sup>. En los hospitales se puede encontrar en el agua, superficies y diferentes insumos médicos, pese a que no es un microorganismo con amplio espectro patógeno, en personas inmunocomprometidas causa gran afectación, debido a que es capaz de formar biopelículas y proteasas que potencializan el factor de virulencia<sup>56</sup>. Por otro lado, en una investigación realizada por Lee et al. se encontró esta bacteria presente en la microbiota de *D. japónica*, capaz de producir indol, metabolito que afecta los canales iónicos de las células epiteliales del intestino humano y que intervienen en la mediación de la regeneración de las planarias. Además, puede afectar el desarrollo de las manchas oculares, la remodelación de sus tejidos o causar alteración alguna en su organismo. Es de resaltar que se ha evidenciado que *C. indologenes* es capaz de inhibir la proliferación celular de varias líneas de células humanas<sup>8</sup>.

*Burkholderia cepacia*, una betaproteobacteria, bacilo Gram negativo recto o curvo, móvil por uno o varios flagelos polares. Se ha aislado de diversos ambientes y materiales naturales como agua<sup>57</sup>, suelo, rizosfera, cebollas podridas, y también de especímenes clínicos, teniendo en cuenta que es patógeno humano oportunista que causa serias infecciones intrahospitalarias<sup>46</sup>, afecta especialmente a pacientes inmunosuprimidos y que padecen fibrosis quística<sup>57</sup>. *Klyuvera cryocrescens*, una gammaproteobacteria perteneciente a la familia de las enterobacterias, móvil, con flagelos peritricos aislada de las planarias de la quebrada, está presente en el suelo, agua, aguas residuales, hospitales y especímenes clínicos<sup>46</sup>, debido a que causa bacteriemia, pues es un patógeno oportunista humano pero rara vez se aísla en los laboratorios de microbiología, según el reporte de caso elaborado por Cabrales Escobar et al.<sup>58</sup>. Esta observación de menciona, porque al ser una bacteria presente en el ambiente, se resalta la importancia de considerar las razones por las que puede elegir hospedarse en macroinvertebrados como las planarias siendo un comensal, y en contraposición afectar a seres vivos de mayor complejidad como los humanos,

causando graves patologías. *Pantoea agglomerans*, otra gammaproteobacteria, perteneciente a la familia de las enterobacterias y móvil por flagelos peritricos presente en las planarias de la quebrada, es ubicua, por lo tanto, se encuentra en gran variedad de aislados, como plantas, flores, agua, semillas, productos alimenticios, especímenes clínicos humanos (sangre, orina, heridas, órganos internos), y animales. Destaca por ser una bacteria patógena no solo para los humanos, sino también para las plantas<sup>46</sup>. Cabe señalar su gran presencia en diferentes ambientes y organismos, de manera que no es extraño su presencia en la microbiota externa de las planarias. Las bacterias hasta aquí abarcadas presentan una gran variedad de orígenes tanto naturales como en animales, de manera que sería de gran importancia una investigación más profunda acerca de las relaciones ecológicas que llevan a las bacterias a convivir en los diversos ambientes y los resultados derivados de las relaciones huésped comensal entre las bacterias y sus hospedadores, en el caso particular de la presente investigación, las planarias de agua dulce.

Para las planarias de la cría del laboratorio, se realizaron los mismos procedimientos que en las planarias de la quebrada, en estas identificaciones se aislaron tres microorganismos. *Burkholderia cepacia*, es un microorganismo anteriormente mencionado y encontrado en las planarias de la quebrada, esto se puede dilucidar con la microbiota natural de los ejemplares; *Shigella* spp, es una proteobacteria Gram negativa, inmóvil perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, unos de los principales patógenos de vigilancia pública en los humanos, debido a que representa una causa importante de morbilidad y mortalidad pediátrica. Usualmente, está presente en alimentos, agua y suelos contaminados por heces que contengan dicho patógeno, por otro lado, se ha encontrado como microbiota en el intestino humano<sup>59</sup>. Este microorganismo se encontró presente en las planarias de quebrada, sin embargo, por cuestión de tiempo, no fue posible confirmar la identidad de algunas colonias de bacilos Gram negativos. *Serratia liquefaciens* es otra gammaproteobacteria de la familia de las enterobacterias que al igual que en el presente estudio, fue aislada por Arnold et al. (2016)<sup>5</sup> de un cultivo de planaria de laboratorio de la especie *Schmidtea mediterranea*, sugiriendo presencia de esta bacteria en la microbiota de distintas especies de planarias de agua dulce, al igual que sucede con *Chryseobacterium indologenes*. Vale la pena mencionar que S.

*liquefaciens* es la especie del género de *Serratia* más abundante en ambientes naturales, plantas y en el tracto digestivo de los roedores<sup>46</sup>, indicando gran capacidad de este microorganismo para adaptarse a distintos ambientes y ser comensal en diversos organismos.

Más allá de las bacterias aisladas en las planarias de quebrada y de laboratorio es importante resaltar que las dos metodologías permitieron abarcar un espectro más amplio de la microbiota de las planarias, que no se habría logrado al aplicar sólo una de las metodologías propuestas y ratificando la importancia de los métodos de aislamiento para la microbiota de animales que, como las planarias no pueden ser manejados directamente por sus características anatómicas. Como condición *sine qua non*, es importante aplicar métodos de secuenciación genética para identificar bacterias que no pueden ser aisladas por los métodos de cultivo, teniendo en cuenta que los métodos de identificación como el BBL Crystal sólo se enfocarán en la identificación de bacterias de importancia clínica y no incluyen bacterias que puedan estar en los ecosistemas o en los organismos que los habitan como microbiota y de las cuales no se hayan registrado casos de infecciones en humanos o animales superiores.

Con el objetivo de conocer la diversidad microbiana del ambiente directo de las planarias, específicamente las piedras sobre las que se desplazan y ponen sus capullos, y la materia orgánica que se deposita sobre las piedras de la cual se alimentan, también se aislaron bacterias de las muestras ya mencionadas y se relacionó su identidad con la microbiota de las planarias, teniendo en cuenta que en el estudio realizado por Lee et al. (2018)<sup>8</sup> se planteó que la microbiota de las planarias es muy estable y no se modifica ante la presencia de poblaciones bacterianas ajenas al organismo, observación realizada al exponer a las planarias a bacterias exógenas como *Escherichia coli*, *Chryseobacterium* spp., *Tsukamurella* spp. y *Arthrobacter* spp. Los resultados indican la presencia dominante de proteobacterias, y sólo un representante de los firmicutes. Por otro lado, se evidencia que hay tres bacterias en específico que se comparten entre el entorno y la microbiota de las planarias, a saber, *Panthoea agglomerans*, *Burkholderia cepacia*, y *Shigella* spp, nuevamente proteobacterias, que siguen representando la mayoría general de los aislamientos totales. Los datos indican la amplia presencia de las proteobacterias como habitantes

del agua dulce, ya sea de forma natural, o por el contacto de sus hospedadores con las corrientes de agua dulce que finalmente circulan en todos los nichos ecológicos. Los hallazgos ponen en consideración la importancia de las bacterias en las funciones biológicas de la planaria como modelo animal con gran bioprospección y ratifican la necesidad de estudiar su influencia en la regeneración de las planarias, capacidad tan reconocida e investigada hasta el día de hoy debido a que no se comprenden muchos de los mecanismos involucrados y además se desconoce en cierta medida la estimulación de la microbiota, su relación con la respuesta inmunológica y la regeneración tisular.

## **6. Conclusiones**

Las planarias de la quebrada La Vieja presentan adaptación a la fluctuación de diferentes factores bióticos y abióticos. Cabe resaltar que los factores abióticos son más determinantes en la estandarización de la cría de las planarias en comparación con los factores bióticos evaluados en el presente estudio, los cuales dependen netamente de la biología de las planarias según las bacterias que tengan asociada a su mucosa externa.

Los factores abióticos más relevantes para la supervivencia de las planarias son el pH y la temperatura según los datos obtenidos en el presente proyecto y la comparación con estudios de otros autores. Los valores de los parámetros físico químicos presentan variación entre el ambiente de la quebrada y el laboratorio, pero no representan afectación para la supervivencia de las planarias

Se identificó una gran población de bacterias presentes en las planarias, que varían dinámicamente según el hábitat donde se encuentren, esto se hace evidente al correlacionar las poblaciones de los dos grupos de planarias. Las poblaciones bacterianas de las planarias indican que son estables frente a los microorganismos de su hábitat, y no permiten la colonización de bacterias exógenas. Para el presente estudio los factores bióticos no tienen implicaciones en la cría de planarias de laboratorio.

Las planarias son organismos viables para el cultivo en un ambiente controlado de laboratorio y se puede mantener su supervivencia en condiciones adecuadas de alimentación, temperatura y otras características que indican la continuidad de una población estable en el tiempo, y de hábitos y comportamiento definidos.

## Referencias Bibliográficas

1. Ivanovic Z, Vlaski-Lafarge M. Metabolic and Genetic Features of Ancestral Eukaryotes versus Metabolism and “Master Pluripotency Genes” of Stem Cells. Anaerobiosis and Stemness [Internet]. 2016 [cited 24 Mar 2021 ];:211-234. Available from: doi: 10.1016/B978-0-12-800540-8.00011-9 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128005408000119>
2. Cabej NR. Cambrian explosion. In: Cabej NR, editor. Epigenetic Mechanisms of the Cambrian Explosion [Internet]. 2020. [cited 24Mar 2021] p. 137–211. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128143117000044>
3. Foster JA. Induction of Neoplasms in Planarians with Carcinogens. Cancer Res. [Internet]. 1963 [cited 10 oct 2020]; 23:300–3. Available in: [https://cancerres.aacrjournals.org/content/23/2\\_Part\\_1/300.long](https://cancerres.aacrjournals.org/content/23/2_Part_1/300.long)
4. Schaeffer DJ. Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. Ecotoxicol Environ Saf. [Internet]. 1993 [cited 24 Mar 2021]; 25(1):1-18. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651383710018?via%3Dihub> doi:10.1006/eesa.1993.1001
5. Arnold CP, Merryman MS, Harris AA, McKinney S, Seidel C, Loethen S et al. Pathogenic shifts in endogenous microbiota impede tissue regeneration via distinct activation of TAK1/MKK/p38. eLife [Internet]. 2016 [cited 24 Mar 2021];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27441386/>
6. Rompolas P, Patel-King RS, King SM. Schmidtea mediterranea: a model system for analysis of motile cilia. In: Methods in cell biology [Internet]. First edit. Elsevier; 2009 [cited 24 Mar 2021]. p. 81–98. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)93004-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X(08)93004-1)
7. Legner EF, Tsai TC, Medved RA. Environmental stimulants to asexual reproduction in the planarian, *Dugesia dorotocephala*. Biol Control [Internet]. 1976;[cited 27 Mar

2021]21(4):415–23. Available from:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02371640>

8. Lee F, Williams K, Levin M, Wolfe B. The Bacterial Metabolite Indole Inhibits Regeneration of the Planarian Flatworm *Dugesia japonica*. *iScience* [Internet]. 2018 [cited 12 nov 2020];10:135-148. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004218302116>

9. Pellettieri J, Sánchez A. Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annu Rev Genet.* [Internet] 2007 [cited 14 oct 2020]; 41:83-105. Available in: doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130244

10. Schaeffer DJ. Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 1993 [cited 10 oct 2020];25(1):1–18. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651383710018?via%3Dihub>.

11. Alonso Á, Camargo JA. Ammonia Toxicity to the Freshwater Planarian *Polycelis felina*: Contrasting Effects of Continuous Versus Discontinuous Exposures. *Arch Environ Contam Toxicol* [Internet]. 2015 [cited 10 oct 2020];68(4):689–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25604922/>

12. Best JB, Rubinstein I. Maze learning and associated behavior in planaria. *J Comp Physiol Psychol* [Internet]. 1962 [cited 2021 Oct 10];55(4):560–6. Available from:  
<https://psycnet.apa.org/record/1964-00492-001>

13. Morita M, Boyd Best J. Electron microscopic studies on planaria. II. Fine structure of the neurosecretory system in the planarian *Dugesia dorotocephala*. *J Ultrastructure Res* [Internet]. 1965 [cited 2021 Oct 10];13(5–6):396–408. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5848838/>

14. Arees EA. Absence of light response in eyeless planaria. *Physiol Behav* [Internet]. 1986 [cited 2021 Oct 10];36(3):445–9. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3703973/>

15. Rivera VR, Perich MJ. Effects of water quality on survival and reproduction of four species of planaria (Turbellaria: Tricladida). *Invertebr Reprod Dev* [Internet]. 1994[cited 2021 Oct 10];25(1):1–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07924259.1994.9672362>
16. Dasheiff BD, Dasheiff RM. Photonegative response in brown planaria (*Dugesia tigrina*) following regeneration. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2002;[cited 2021 Oct 10] 53(2):196–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014765130292227X>
17. Lombardo P, Giustini M, Miccoli FP, Cicolani B. Fine-scale differences in diel activity among nocturnal freshwater planarians (Platyhelminthes: Tricladida). *J Circadian Rhythms* [Internet]. 2011[cited 2021 Oct 10];9:1–10. Available from: <https://jcircadianrhythms.biomedcentral.com/articles/10.1186/1740-3391-9-2>
18. Bocchinfuso DG, Taylor P, Ross E, Ignatchenko A, Ignatchenko V, Kislinger T, et al. Proteomic profiling of the planarian *Schmidtea mediterranea* and its mucous reveals similarities with human secretions and those predicted for parasitic flatworms. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2012; [cited 2021 Oct 10]11(9):681–91. Available from: [https://www.mcponline.org/article/S1535-9476\(20\)32581-0/fulltext#](https://www.mcponline.org/article/S1535-9476(20)32581-0/fulltext#)
19. Abnave P, Mottola G, Gimenez G, Boucherit N, Trouplin V, Torre C, et al. Screening in planarians identifies MORN2 as a key component in LC3-associated phagocytosis and resistance to bacterial infection. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2014 [cited 2021 Oct 10];16(3):338–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.08.002>
20. Akiyama Y, Agata K, Inoue T. Spontaneous behaviors and wall-curvature lead to apparent wall preference in planarian. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2021 Oct 11];10(11):1–17. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0142214>

21. Lewallen M, Burggren W. Metabolic physiology of the freshwater planaria *Girardia dorocephala* and *Schmidtea mediterranea*: Reproductive mode, specific dynamic action, and temperature. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 15];319(4):R428–38. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpregu.00099.2020>
22. Collins JJ, Hou X, Romanova EV, Lambrus BG, Miller CM, Saberi A et al. Genome-Wide Analyses Reveal a Role for Peptide Hormones in Planarian Germline Development. *PLoS Biology* [Internet]. 2010 [cited 12 nov 2020];8(10). Available from: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000509>
23. Deochand N, Costello MS, Deochand ME. Behavioral Research with Planaria. *Perspect Behav Sci* [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar] 24;41(2):447–64. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/328840677\\_Behavioral\\_Research\\_with\\_Planaria](https://www.researchgate.net/publication/328840677_Behavioral_Research_with_Planaria)
24. Muñoz MA, Vélez I. Redescrición y algunos aspectos ecológicos de *Girardia tigrina*, *G. cameliae* y *G. paramensis* (Dugesidae, Tricladida) en Antioquia, Colombia. *Rev Mex Biodivers* [Internet]. 2007;78(2):291–301. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-34532007000200006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532007000200006)
25. Aquanovel. Aquanovel. [Online]. Available from: <http://aquanovel.com/control-de-planarias-platelmintos-en-el-acuario/> [Accessed 24 March 2021]
26. Rink JC. Planarian Regeneration: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology 1774) [Internet]. Rink JC, editor. Springer New York; Humana Press; 2018. 574 p. Available from: <http://www.springer.com/series/7651>
27. Brusa F, Negrete L, Herrera-Martínez Y, Herrando-Pérez S. *Girardia festae* (Borelli, 1898) (Platyhelminthes: Tricladida: Dugesidae): Distribution extension in a high-altitude lake from Colombia. *Check List* [Internet]. 2012;8(2):276–9. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/239731364\\_Girardia\\_festae\\_Borelli\\_1898](https://www.researchgate.net/publication/239731364_Girardia_festae_Borelli_1898)

[Platyhelminthes Tricladida Dugesiidae Distribution extension in a high-altitude lake from Colombia](#)

28. Protocol 1: Planarian maintenance | Planarian Educational Resource [Internet]. Cuttingclass.stowers.org. 2021 [cited 21 March 2021]. Available from: <https://cuttingclass.stowers.org/es/node/121413>

29. Diagrama de representación de la anatomía de una planaria.  
Issigonis M, Newmark P. From worm to germ: Germ cell development and regeneration in planarians. Current Topics in Developmental Biology [Internet]. 2019 [cited 11 nov 2020]; 135:127-153. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0070215319300389>

30. Bowen ID, Ryder TA, Thompson JA. The fine structure of the planarian *Polycelis tenuis* Iijima. Protoplasma [Internet]. 1974 [cited 12 nov 2020]; 79:1–17. Available in: <https://doi.org/10.1007/BF02055779>

31. Hyman LH. The invertebrates. Platyhelminthes and Rhynchocoela, the acoelomate Bilateria. Vol 2. New York. McGraw-Hill [Internet]. 1951 [cited 12 nov 2020]. Available in: ISBN: 0070316619

32. Durant F, Lobo D, Hammelman J, Levin M. Physiological controls of large-scale patterning in planarian regeneration: a molecular and computational perspective on growth and form. Regeneration [Internet]. 2016 [cited 12 nov 2020];3(2):78-102. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/301712239\\_Physiological\\_controls\\_of\\_large-scale\\_patterning\\_in\\_planarian\\_regeneration\\_a\\_molecular\\_and\\_computational\\_perspective\\_on\\_growth\\_and\\_form](https://www.researchgate.net/publication/301712239_Physiological_controls_of_large-scale_patterning_in_planarian_regeneration_a_molecular_and_computational_perspective_on_growth_and_form)

33. Pedersen KJ. Cytological studies on the planarian neoblast. Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat [Internet]. 1959 [cited 2021 Sep 20];50(6):799–817. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00342367>

34. Ruiz K. Validación de métodos de ensayo para determinación de pH, Conductividad, Sólidos Sedimentables, Sólidos Suspendidos y Sólidos disueltos en aguas en el Laboratorio Ambiental Environovalab. J Chem Inf Model [Internet]. 2018;127. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15362/1/T-UC-0017-0095-2018.pdf>
35. De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ludwig W, Rainey F et al. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology. 2nd ed. Springer; 2009.
36. Becton Dickinson & Company. Crystal SBBL. Sistemas BBL Crystal. Equipo para la identificación de patógenos entéricos/no fermentantes 2012;31–8. Available from: <http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/entericos.pdf>
37. Becton Dickinson & Company. Sistemas de Identificación BBL Crystal ID. Equipo para la identificación de bacterias grampositivas. 2015;3(Id):3–8. Available from: <http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/grampositivos.pdf>
38. Rink J. Stem cell systems and regeneration in planaria. Development Genes and Evolution. 2012 [cited 2022 January 20];223(1-2):67-84.
39. de Oliveira M, Lopes K, Leite P, Morais F, de Campos Velho N. Physiological evaluation of the behavior and epidermis of freshwater planarians (*Girardia tigrina* and *Girardia* sp.) exposed to stressors. Biology Open. 2018 [cited 2022 January 20];7(6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6031348/>
40. An M, Choi C. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2010 [cited 2022 January 20];155(1):34-42. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1096495909002358>

41. Huey R, Stevenson R. Integrating Thermal Physiology and Ecology of Ectotherms: A Discussion of Approaches. *American Zoologist* [Internet]. 1979 [cited 20 January 2022];19(1):357-366. Available from: <https://academic.oup.com/icb/article/19/1/357/174499?login=true>
42. Hammoudi N, Torre C, Ghigo E, Drancourt M. Temperature affects the biology of *Schmidtea mediterranea*. *Scientific Reports* [Internet]. 2018 [cited 20 January 2022];8(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6175859/#CR13>
43. Abnave P, Mottola G, Gimenez G, Boucherit N, Trouplin V, Torre C et al. Screening in Planarians Identifies MORN2 as a Key Component in LC3-Associated Phagocytosis and Resistance to Bacterial Infection. *Cell Host & Microbe* [Internet]. 2014 [cited 20 January 2022];16(3):338-350. Available from: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(14\)00293-5?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312814002935%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(14)00293-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312814002935%3Fshowall%3Dtrue)
44. Chapman CCP, Robinson M, Mcpherson FC, Dwyer J. TOTAL DISSOLVED SOLIDS (TDS) STUDY – TASK 1 – LITERATURE REVIEW – FINAL. 2011;1(604). Available from: <https://registry.mvlwb.ca/Documents/MV2011L2-0004/MV2011L2-0004 - De Beers Snap Lake - April 2011 TDS Literature Review by Golder -Aug18-11.PDF>
45. Ministerio de Salud -. Decreto 0475 de 1998 [Internet]. *Diario Oficial* 1998 p. 14. Available from: [http://www.anla.gov.co/sites/default/files/normativa\\_ambiental/dec\\_0475-98\\_normas\\_tecnicas\\_sobre\\_calidad\\_del\\_agua\\_potable.pdf](http://www.anla.gov.co/sites/default/files/normativa_ambiental/dec_0475-98_normas_tecnicas_sobre_calidad_del_agua_potable.pdf)
46. De Vos P. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Dordrecht: Springer; 2009.
47. Park H, Bideshi D, Federici B. Properties and applied use of the mosquitocidal bacterium, *Bacillus sphaericus*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* [Internet]. 2010

[cited 21 January 2022];13(3):159-168. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584542/>

48. Suckow M, Stevens K, Wilson R. The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents. Oxford: Academic Press; 2012.

49. Remington J. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant (Seventh Edition). 7th ed. W B Saunders Company; 2011.

50. Babar Z, Awaisu A, Chen T. Encyclopedia of pharmacy practice and clinical pharmacy. Academic Press; 2019.

51. Fischer M, Long S, Prober C. Principles and practice of pediatric infectious diseases. 5th ed. Elsevier; 2018.

52. Von Graevenitz A. *Rothia dentocariosa*: taxonomy and differential diagnosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004 [cited 21 January 2022];10(5):399-402. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14628251>

53. Franconieri F, Join-Lambert O, Creveuil C, Auzou M, Labombarda F, Aouba A et al. *Rothia* spp. infective endocarditis: A systematic literature review. *Infectious Diseases Now* [Internet]. 2021 [cited 21 January 2022];51(3):228-235. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X20307617#bbib0900>

54. Salimiyan Rizi K, Farsiani H, Ghazvini K, Youssefi M. Peritonitis Due to *Rothia dentocariosa* in Iran: A Case Report. *Reviews in Clinical Medicine* [Internet]. 2019 [cited 21 January 2022];6(1). Available from:  
[http://eprints.mums.ac.ir/11400/1/RCM\\_Volume%206\\_Issue%201\\_Pages%2037-40.pdf](http://eprints.mums.ac.ir/11400/1/RCM_Volume%206_Issue%201_Pages%2037-40.pdf)

55. Boudewijns M, Magerman K, Verhaegen J, Debrock G, Peetermans W, Donkersloot P et al. *Rothia dentocariosa*, endocarditis and mycotic aneurysms: case report and review of the literature. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2003

[cited 21 January 2022];9(3):222-229. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X1462471X#tbl3>

56. Sakurada Z A. *Chryseobacterium indologenes* [Internet]. Scielo. 2008 [cited 22 January 2022]. Available from:  
[https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182008000600005](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000600005)

57. Rojas-Rojas F, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, Méndez-Canarios A, Ibarra J, Estrada-de los Santos P. El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología* [Internet]. 2019 [cited 22 January 2022];51(1):84-92. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754118300038>

58. Cabrales Escobar I, Juárez Cruz A. Bacteriemia asociada a catéter por *Kluyvera cryocrescens*: reporte de caso y revisión. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* [Internet]. 2021 [cited 21 January 2022];41(1):35-38. Available from:  
<https://www.mediagraphic.com/pdfs/micro/ei-2021/ei211g.pdf>

59. Barón S. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston: University of Texas; 1996