



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad de Ciencias
Programa de Maestría en Microbiología

Evaluación de la contaminación bacteriana del Río Alto Ubaté sobre la cepa transgénica TJ356 de *Caenorhabditis elegans* como bioindicador

María Susana Pinzón Prada

Bogotá D.C., Colombia

2025

Evaluación de la contaminación bacteriana del Río Alto Ubaté sobre la cepa transgénica TJ356 de *Caenorhabditis elegans* como bioindicador

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de

Magíster en Microbiología
(Modalidad de Profundización)

María Susana Pinzón Prada
Bacterióloga y Laboratorista clínico

Directora:
Ruth Mélida Sánchez Mora Ph.D.
Docente Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Codirectora:
Johanna Lizeth González Devia M.Sc.
Docente Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Línea de Investigación:
Ecología, Biotecnología y Ambiente
Grupo de Biotecnología y Genética UCMC

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias
Programa de Maestría en Microbiología
Bogotá D.C., Colombia
2025

Dedicatoria

A Dios, por su infinito amor.

*A mi madre y a mi hermana, por
estar siempre a mi lado.*

*A la memoria de mi padre, Luis
Pinzón, quien hubiera estado
inmensamente orgulloso de este
logro.*

Agradecimientos

A Dios, por ser mi guía y fortaleza, por iluminar cada paso de este camino y por enviar a mi vida a las personas indicadas en el momento preciso.

A mi madre y a mi hermana, mi eterno agradecimiento por su apoyo incondicional, por ser mi motivación constante y por creer siempre en mí.

A mi directora, Ruth Sánchez, por depositar su confianza en mí desde el primer instante. Le agradezco profundamente su tiempo, paciencia, conocimiento y respaldo incondicional a lo largo de todo este proceso.

A mi codirectora, Lizeth González, quien llegó de la manera más inesperada y se convirtió en un pilar fundamental en este trabajo. Por brindarme su conocimiento para el desarrollo de cada experimento, así como por su infinita paciencia y apoyo constante.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y al grupo de Investigación de Biotecnología y Genética UCMC por ser parte activa de esta investigación.

A todos aquellos que, desde el inicio de este camino, creyeron en mí y me brindaron no solo su conocimiento y ayuda académica, sino también su apoyo moral.

Resumen

Debido al crecimiento de la población en las zonas urbanas, el municipio de Ubaté ha experimentado una mayor presión sobre sus recursos naturales y servicios, lo que ha provocado problemas ambientales, como la contaminación de las fuentes hídricas, afectando negativamente las actividades domésticas, agrícolas y ganaderas, que son representativas de la región. En este contexto, es fundamental evaluar la calidad microbiológica de los cuerpos de agua para comprender el impacto de la contaminación.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de las bacterias contaminantes presentes en el Río Alto Ubaté sobre la cepa transgénica TJ356 de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), un organismo ampliamente utilizado como bioindicador de toxicidad. Se aislaron bacterias potencialmente patógenas, entre ellas *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Acinetobacter lwoffii* (*A. lwoffii*), procedentes del punto denominado “El Guacal”, una zona afectada por vertimientos domésticos, actividades agropecuarias e industriales. Posteriormente, se evaluaron los efectos de estos microorganismos sobre la cepa transgénica *C. elegans* TJ356, observándose una disminución significativa en la longevidad y en la capacidad reproductiva de los nematodos alimentados con estas bacterias, en comparación con el control alimentado con *E. coli* OP50.

Al evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se mantuvo baja, lo que sugiere la existencia de mecanismos de toxicidad independientes del estrés oxidativo. Asimismo, se evidenció una translocación nuclear diferencial de DAF-16, activada por *A. lwoffii* pero no por *E. coli*, lo que refleja la complejidad de la regulación de este factor y la influencia de señales específicas del patógeno en la activación de rutas de respuesta en el nematodo. Estos resultados confirman el valor de *C. elegans* TJ356 como modelo bioindicador sensible, capaz de detectar alteraciones fisiológicas y citotóxicas derivadas de la exposición a bacterias ambientales. Este enfoque promueve el desarrollo de herramientas complementarias de vigilancia ecotoxicológica en fuentes hídricas, contribuyendo a una evaluación integral del riesgo ambiental y sanitario. El uso de modelos biológicos como *C. elegans* podría integrarse a programas de monitoreo para fortalecer la toma de decisiones en la gestión sostenible del recurso hídrico.

Palabras clave: Bacterias, Contaminación, Ecotoxicidad, *C. elegans*, TJ356, Río Alto Ubaté.

Abstract

Due to rapid urban population growth, the municipality of Ubaté has faced increasing pressure on its natural resources and public services, leading to serious environmental challenges such as the contamination of water sources. This pollution has negatively affected domestic, agricultural, and livestock activities, which are central to the region's economy and culture. In this context, assessing the microbiological quality of water bodies is essential to understand the scope and impact of contamination.

The present study aimed to evaluate the effects of contaminant bacteria from the Alto Ubaté River on the transgenic strain TJ356 of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), a well-established bioindicator of toxicity. Potentially pathogenic bacteria, including *E. coli* and *A. Iwoffii* were isolated from a site known as "El Guacal," an area impacted by domestic, agricultural, and industrial discharges. The effects of these microorganisms on transgenic *C. elegans* TJ356 were subsequently examined, revealing a significant reduction in both longevity and reproductive capacity in nematodes exposed to these bacteria compared to controls fed with *E. coli* OP50.

Reactive oxygen species (ROS) levels remained low, suggesting the involvement of toxicity mechanisms independent of oxidative stress. Moreover, differential nuclear translocation of the transcription factor DAF-16 was observed, being activated by *A. Iwoffii* but not by *E. coli*. This finding underscores the complexity of DAF-16 regulation and highlights the role of pathogen-specific signals in modulating nematode stress responses. These results validate *C. elegans* TJ356 as a sensitive bioindicator model, capable of detecting physiological and cytotoxic alterations resulting from exposure to environmental bacteria. This approach supports the development of complementary ecotoxicological monitoring tools for water sources, contributing to a more comprehensive assessment of environmental and public health risks. Incorporating biological models such as *C. elegans* into monitoring programs could strengthen decision-making processes for the sustainable management of water resources.

Keywords: Bacteria, Pollution, Ecotoxicity, *C. elegans*, TJ356, Alto Ubaté River

Contenido

Lista de figuras.....	9
Lista de tablas.....	10
Lista de abreviaturas.....	11
1. Introducción.....	12
1.1 Planteamiento del problema.....	12
1.2 Justificación.....	14
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo general.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. Marco conceptual y generalidades.....	16
3.1 Ecotoxicidad y bioindicadores.....	16
3.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>).....	18
3.2.1 Generalidades de <i>C. elegans</i>	18
3.2.2 Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	19
3.2.3 Desarrollo embrionario de <i>C. elegans</i>	21
3.2.4 Anatomía de <i>C. elegans</i>	22
3.3 Cepas transgénicas de <i>C. elegans</i>	24
3.3.1 Regulación de DAF-16.....	25
3.3.2 Cepa transgénica TJ356.....	27
3.3.3 Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	28
3.4 Interacción bacteria- hospedero.....	29
3.5 Cuenca Río Alto Suárez.....	31
4. Materiales y métodos.....	35
4.1 Identificación de las bacterias cultivables potencialmente patógenas en el agua del Río Alto Ubaté.....	35
4.1.1. Ubicación de sitio de muestreo y recolección de la muestra de agua.....	35
4.1.2 Análisis fisicoquímico y microbiológico de las muestras de agua.....	36
4.1.3. Identificación de las bacterias potencialmente patógenas presentes en el agua del Río Alto Ubaté.....	36
4.2 Determinación de los efectos fisiológicos y citotóxicos en el modelo <i>C. elegans</i> después de la exposición a las bacterias patógenas en el Río Alto Ubaté.....	37
4.2.1 Adquisición, mantenimiento, sincronización de las cepas de <i>C. elegans</i>	37
4.2.2 Caracterización fenotípica y fisiológica de las cepas de <i>C. elegans</i> N2 y TJ356.....	38
4.2.3 Exposición de las bacterias patógenas a la cepa N2 de <i>C. elegans</i>	39

4.2.4. Análisis de citotoxicidad de las bacterias que presentaron disminución en la viabilidad en N2 frente a la cepa TJ356.....	39
4.3 Análisis estadístico	41
5. Resultados	42
5.1 Identificación de las bacterias cultivables potencialmente patógenas en el agua del Río Alto Ubaté.....	42
5.1.1 Ubicación de sitio de muestreo.....	42
5.1.2 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la muestra de agua del Río Alto Ubaté.....	43
5.1.3 Bacterias identificadas en el Río Alto Ubaté	44
5.2 Determinación de los efectos fisiológicos y citotóxicos en el modelo <i>C. elegans</i> después de la exposición a las bacterias patógenas en el Río Alto Ubaté	51
5.2.1 Caracterización fenotípica y fisiológica de la cepa silvestre N2 y transgénica TJ356 de <i>C. elegans</i>	51
5.2.2 Viabilidad de la cepa N2 frente las cepas bacterianas Gram negativas seleccionadas.....	53
5.2.3 Efectos fisiológicos y citotóxicos de la cepa transgénica TJ356 de <i>C. elegans</i> cuando es alimentada con <i>E. coli</i> y <i>A. Iwoffii</i>	55
6. Discusión.....	59
7. Conclusiones.....	67
8. Recomendaciones.....	68
Apropiación Social del Conocimiento y/o publicaciones.....	69
Referencias	70
Anexos	83
Anexo 1: Registro de valores del Ensayo de Longevidad en <i>C. elegans</i> TJ356	83
Anexo 2: Tablas de registro de valores de reproducción	83
Anexo 3: Tablas de registro de valores de localización de DAF-16 en nematodos TJ356	84
Anexo 4: Tablas de registro de Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) de medición de ROS	84
Anexo 5: Consolidado de análisis estadístico en GraphPad Prism 8.0.2.....	85

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	21
Figura 2. Morfología de la línea germinal de hermafroditas L4 en <i>C. elegans</i> N2 por microscopía de interferencia diferencial.	22
Figura 3. Regulación de DAF-16 en <i>C. elegans</i>	27
Figura 4. Mapa de drenaje de la Cuenca del Río Alto Suárez.	32
Figura 5. Ubicaciones de vertimiento de aguas residuales en la cuenca Río Alto Suárez.	34
Figura 6. Detección de ROS mediante H ₂ DCFDA.	40
Figura 7. Ubicación geográfica del punto de muestreo de agua en el Río Alto Ubaté.....	42
Figura 8. Crecimiento bacteriano masivo en medios de cultivo inoculados con agua del Río Alto Ubaté.	45
Figura 9. Colonias de aislados bacterianos presentes en el agua del Río Alto Ubaté.....	46
Figura 10. Curva de longevidad de <i>C. elegans</i> TJ356 y N2 bajo condiciones óptimas de alimentación y temperatura.	51
Figura 11. Reproducción de <i>C. elegans</i> TJ356 y N2 bajo condiciones óptimas de alimentación y temperatura.	52
Figura 12. Localización de la proteína DAF-16 en la cepa TJ356.....	53
Figura 13. Curva de longevidad de <i>C. elegans</i> N2 frente a las cepas bacterianas Gram negativas seleccionadas.	54
Figura 14. Curva de longevidad de <i>C. elegans</i> TJ356 al ser alimentada con bacterias aisladas del Río Alto Ubaté.	55
Figura 15. Reproducción de <i>C. elegans</i> TJ356 al ser alimentada con bacterias aisladas del Río Alto Ubaté.....	56
Figura 16. Localización de DAF-16 en <i>C. elegans</i> TJ356 al ser alimentada con bacterias aisladas del Río Alto Ubaté.....	57
Figura 17. Producción de ROS en <i>C. elegans</i> TJ356 al ser alimentada con bacterias aisladas del Río Alto Ubaté.....	58

Lista de tablas

Tabla 1. Análisis fisicoquímico y microbiológico realizado a la muestra de agua del Río Alto Ubaté	44
Tabla 2. Análisis bacteriano realizado a la muestra de agua del Río Alto Ubaté	47
Tabla 3. Potencial benéfico y patógeno de las bacterias aisladas del Río Alto Ubaté en contextos sanitarios y ambientales.....	48

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>CAR</i>	Corporación Autónoma Regional
<i>CGC</i>	Centro de Genética de <i>Caenorhabditis</i>
<i>CORNARE</i>	Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los Ríos Negro y Nare
<i>DBO</i>	Demanda Biológica de Oxígeno
<i>DQO</i>	Demanda Química de Oxígeno
<i>EDTA</i>	Ácido EtilenDiaminoTetraacético
<i>GFP*</i>	Proteína Verde Fluorescente
<i>IDEAM</i>	Instituto De Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales
<i>IGF-1*</i>	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo I
<i>LPS</i>	Litros por segundo
<i>NGM*</i>	Medio de Crecimiento para Nematodos
<i>NMP</i>	Número Más Probable
<i>NTU*</i>	Unidad Nefelométrica de Turbidez
<i>ODS</i>	Objetivos de Desarrollo Sostenible
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>ROS*</i>	Especies Reactivas de Oxígeno
<i>SOD*</i>	Superóxido dismutasa
<i>SST</i>	Sólidos Suspendidos Totales
<i>UNICEF</i>	Fondo de la Naciones Unidas para la Infancia
<i>URF</i>	Unidades Relativas de Fluorescencia

* Abreviatura original del inglés

1. Introducción

1.1 Planteamiento del problema

La contaminación del agua se considera una crisis global que pone en riesgo la salud humana, animal y ambiental, comprometiendo las fuentes de agua potable. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los ríos y océanos reciben grandes cantidades de contaminantes, algunos derivados de actividades antropogénicas, que amenazan la vida. En 2022 se estimó que más de 1.700 millones de personas consumían agua de fuentes contaminadas, lo que representa un riesgo significativo debido a la presencia de microorganismos patógenos, especialmente en países en desarrollo que carecen de infraestructura adecuada para el tratamiento de aguas (1).

En Colombia, la contaminación del agua es una creciente problemática medioambiental debido a las actividades antropogénicas. Según la Comisión de Regulación de Agua Potable y Saneamiento, en el 2024 más de 13 millones de colombianos no tiene agua apta para el consumo humano, lo que representa graves implicaciones para la calidad de vida (2).

El deterioro del recurso hídrico es evidente en varias regiones del país incluyendo el Río Alto Ubaté en Cundinamarca, con una extensión de 32 kilómetros, abastece a varias comunidades de la región y se ve gravemente afectado por actividades agrícolas, ganaderas, mineras e industriales que contribuyen a su contaminación (3). Al respecto, la Resolución 3462 de 2009 de la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR) establece los objetivos de calidad del agua del Río Ubaté para el año 2020, y define los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que el agua debe cumplir para diversos usos, incluyendo el consumo humano (4).

Un informe de la CAR seccional Ubaté reveló que, entre 2010 y 2019, los niveles de coliformes totales en el agua del Río Alto Ubaté solo cumplieron con los estándares en un 49,3% de las mediciones, lo cual es crítico en comparación con otros parámetros fisicoquímicos analizados (3). Estos indicadores microbiológicos representan un riesgo significativo para la salud pública, de acuerdo con la Resolución 2115 de 2007 del

Ministerio de Salud, qué establece los parámetros que debe cumplir el agua para considerarse apta para el consumo humano (5).

La CAR extendió el periodo para alcanzar los objetivos de calidad del Río Ubaté mediante la Resolución No. 20207101153 del 30 de diciembre de 2020. Esta prórroga busca facilitar la formulación y simulación de escenarios que apoyen la toma de decisiones en la definición de metas de carga contaminante para el periodo 2023-2027 (6).

En este contexto, el monitoreo de la calidad del agua es fundamental para prevenir los riesgos asociados al consumo de agua contaminada. Sin embargo, la determinación periódica de todos los microorganismos involucrados en la evaluación de la calidad hídrica resulta desafiante debido a la complejidad y los costos de los métodos requeridos para el análisis (7). Además, la falta de información sobre la presencia de bacterias patógenas y su impacto en los organismos vivos representa un reto significativo tanto para la salud humana como para los ecosistemas acuáticos que dependen de esta fuente de agua (8).

De este modo, el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ha demostrado ser un bioindicador ecotoxicológico ideal para abordar esta brecha. En particular, la cepa transgénica TJ356, altamente sensible a contaminantes, puede proporcionar datos valiosos sobre los efectos de las bacterias presentes en el agua del Río Ubaté. Este modelo permite estudiar la activación de genes relacionados con el estrés celular, así como cambios fenotípicos en la reproducción y longevidad (8).

Pregunta problema

¿Cuáles son los efectos de la contaminación bacteriana del Río Alto Ubaté en las respuestas biológicas al estrés celular y en las características fenotípicas de la cepa transgénica TJ356 de *C. elegans* como modelo bioindicador?

1.2 Justificación

En el año 2024, según el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), señaló que en Colombia existen aproximadamente 95 municipios que carecen de acceso a agua potable, lo que representa un riesgo significativo para la salud y el bienestar de sus habitantes (9). De acuerdo con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) número 6 de la Agenda 2030, "Agua Limpia y Saneamiento", se busca mejorar la calidad del agua, su tratamiento y educar a las comunidades sobre el cuidado del recurso hídrico. Esta necesidad se ve intensificada por la creciente concentración de personas en zonas urbanas y el aumento en la demanda de servicios públicos como agua, saneamiento y alcantarillado (3,10).

En este contexto, es fundamental determinar si el agua del Río Ubaté, utilizada para distintos fines como el consumo humano y doméstico, la agricultura, la ganadería, actividades recreativas e industriales en la población de Ubaté, contiene bacterias potencialmente patógenas. El uso de *C. elegans* como modelo experimental permite evaluar los efectos que estas bacterias podrían tener, proporcionando información valiosa mediante su toxicidad, convirtiéndolo en un bioindicador apropiado para evaluar la calidad del agua y predecir impactos en organismos superiores debido a su similitud genética (8,11).

Este estudio busca implementar un método para investigar el impacto de bacterias patógenas presentes en el agua cruda que posteriormente al tratamiento será destinada al consumo humano. Los resultados permitirán ampliar el conocimiento en el campo de la ecotoxicología y posteriormente en la salud pública a través de políticas para asegurar la calidad del agua del Río Ubaté. Lo anterior, para garantizar la seguridad del recurso hídrico destinado no solo al consumo humano, sino también a usos industriales, ganaderos y recreativos, así como la protección de este ecosistema.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de bacterias potencialmente patógenas presentes en el Río Alto Ubaté sobre la cepa transgénica TJ356 de *C. elegans* como bioindicador

2.2 Objetivos específicos

- Identificar las bacterias cultivables potencialmente patógenas en el agua del Río Alto Ubaté.
- Medir los efectos fisiológicos y citotóxicos observados en el modelo *C. elegans* después de la exposición a las bacterias identificadas en el Río Alto Ubaté.

3. Marco conceptual y generalidades

3.1 Ecotoxicidad y bioindicadores

El constante crecimiento poblacional y la urbanización han contribuido significativamente a la contaminación ambiental. La mayor generación de residuos sin una gestión adecuada, el uso creciente de productos químicos como pesticidas y fertilizantes, y la expansión urbana han provocado la contaminación de los recursos hídricos, el aire y el suelo, debido a la acumulación de sustancias tóxicas que afectan negativamente a los ecosistemas y los organismos que dependen de ellos (11, 12).

En particular, los ecosistemas acuáticos se ven cada vez más afectados por las actividades antropogénicas, lo que lleva a la contaminación de los recursos hídricos y promueve la proliferación de microorganismos, incluidas bacterias, que pueden tener efectos adversos en los organismos que habitan estos entornos, entre ellos, los seres humanos (1,13).

La ecotoxicología es la disciplina que estudia los efectos nocivos de los contaminantes químicos, físicos y biológicos sobre los organismos vivos y los ecosistemas. En este contexto, la contaminación biológica del agua, en particular la de origen bacteriano, es de gran importancia debido a su relevancia sanitaria y ambiental. En Colombia, el análisis microbiológico del agua destinada para el consumo humano, según lo reglamentado en la Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de Salud y Protección Social, tiene como objetivo evaluar la presencia, ausencia, tipo y cantidad de microorganismos (5). Este proceso es esencial para garantizar que el agua sea apta para el consumo y no represente un riesgo para la salud pública.

Existen dos indicadores biológicos, principales de contaminación microbiológica en el agua para consumo humano: los coliformes totales y *E. coli*, que es un parámetro clave para detectar la presencia de materia fecal en el agua. Para considerar una fuente apta para el consumo, se deben realizar una serie de operaciones que modifiquen sus características físicas, químicas y microbiológicas, de modo que no se detecte la presencia de estos indicadores biológicos (5).

Además, el agua no debe tener quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium*; en caso de encontrarse, las autoridades competentes deben tomar las medidas correspondientes. Cabe destacar que la normativa colombiana no contempla la determinación de virus ni fagos en el diagnóstico, seguimiento y control de la calidad del agua destinada para el consumo humano (5).

Frente a estas limitaciones, además de los métodos convencionales de análisis microbiológico, el uso de bioindicadores ecotoxicológicos, como la cepa transgénica TJ356 de *C. elegans*, se presenta como una herramienta eficaz para evaluar los efectos de la contaminación bacteriana en los ecosistemas acuáticos. Desde el año 2007, se han estandarizado ensayos de toxicidad empleando *C. elegans* como un bioindicador sencillo, rápido y preciso para detectar alteraciones fisiológicas y genéticas, lo que lo convierte en un modelo ideal para monitorear los efectos de los contaminantes en ambientes acuáticos y establecer estrategias de manejo sostenible para este recurso hídrico. (13,14).

Los estudios de toxicidad se centran en la evaluación de vías metabólicas y de señalización específicas, que permiten visualizar el comportamiento y los fenotipos que adopta el nematodo en respuesta a las condiciones externas, reaccionando a una serie de factores ambientales estresantes, incluidos los contaminantes químicos y biológicos, así como las fluctuaciones físicas (14). Por ejemplo, durante la temporada de lluvias, el arrastre de contaminantes es mayor, lo que provoca perturbaciones en las comunidades bacterianas y en el material particulado suspendido, lo que puede influir en los efectos tóxicos observados (15). Es por esta razón que la relación espacio-temporal en estos estudios es crucial, ya que permite entender las dinámicas de los sistemas ecológicos.

Por esta razón, este modelo biológico ha sido propuesto para evaluar la bioseguridad de muestras hídricas y aunque muchos contaminantes están presentes en bajas concentraciones, especialmente en el agua destinada para consumo humano, es importante desarrollar nuevas herramientas bioanalíticas que permitan detectar más fácilmente los efectos tóxicos. (11,16).

3.2 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

3.2.1 Generalidades de *C. elegans*

C. elegans es un nematodo de vida libre con un ciclo de vida rápido de aproximadamente tres días en condiciones óptimas y una vida útil promedio de tres semanas en estado adulto, alcanzando un tamaño aproximado de 1 mm, lo que es ideal para su reproducción y desarrollo biológico (14). Sus cualidades para el análisis en laboratorio incluyen su fácil cultivo en placas de agar, alimentándose de cepas estándar no patógenas de *E. coli* - OP50. Además, presenta dos sexos, macho y hermafrodita, permitiendo que un solo individuo hermafrodita establezca una nueva población. Su locomoción resulta de la combinación de anatomía muscular, coordinación neurológica e interacción con el entorno, moviéndose mediante contracciones musculares a lo largo de su cuerpo (17).

El uso de *C. elegans* se ha extendido a diversas áreas de investigación, como el estudio de mecanismos moleculares involucrados en la respuesta al estrés ambiental, incluyendo la contaminación bacteriana, gracias a su ciclo de vida corto y a que su genoma ha sido completamente secuenciado (18). Su cultivo sencillo y características reproductivas lo convierten en una herramienta crucial para estudios ecotoxicológicos (19, 20).

Además, estudios recientes han mostrado que *C. elegans* puede servir como hospedero natural para algunos microorganismos que habitan en entornos ambientales (21). Dichas investigaciones han revelado la necesidad de realizar un análisis integral avanzado que incluya tanto parámetros químicos como biológicos; ya que, se ha observado que la exposición a efluentes industriales puede alterar la reproducción y otras funciones biológicas del nematodo, dependiendo del tipo de contaminante ambiental al que se expone (22,23).

Por otro lado, se estima que una gran cantidad de proteínas son similares a las humanas; por lo tanto, se cree que, a pesar de la gran distancia evolutiva entre los nematodos y los seres humanos, se propone como un modelo animal significativo para el estudio de numerosos procesos patológicos. Además, *C. elegans* es susceptible a un análisis genético relativamente sencillo en comparación con otros modelos vertebrados que no ofrecen métodos genéticos sofisticados que permitan un estudio detallado para la investigación de enfermedades (24,25).

La facilidad de manipulación genética asociada a este modelo ha contribuido al estudio de enfermedades neurodegenerativas, mecanismos de muerte celular programada, desarrollo y envejecimiento en muchos organismos, incluidos los humanos, debido a la homología de un porcentaje significativo de genes. Se estima que el genoma del nematodo contiene alrededor de 20.000 genes, similar al de los mamíferos (19). Por lo tanto, *C. elegans* sigue siendo importante para identificar reguladores transcripcionales, mecanismos celulares y modificaciones epigenéticas asociadas con características fisiológicas y resistencia al estrés (26).

Debido a que *C. elegans* posee vías de señalización evolutivamente bien conservadas, es una alternativa para estudiar factores clave en la prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas asociadas con la edad, buscando contrarrestar daños o desarrollar terapias que retrasan la senescencia (20,27). Su simplicidad y facilidad experimental también lo han convertido en un modelo adecuado para comprender la formación de conexiones neuronales del sistema nervioso, contribuyendo a la comprensión del funcionamiento cerebral en organismos más complejos, incluido el humano (28). Adicionalmente, como bioindicador ecotoxicológico, se ha empleado para evaluar la respuesta celular ante la exposición a contaminantes ambientales potencialmente tóxicos y nocivos para la salud humana y medioambiental (12).

3.2.2 Ciclo de vida de *C. elegans*

En ambientes silvestres, *C. elegans* crece y se alimenta en entornos ricos en materia orgánica con abundantes nutrientes y microorganismos (19). Cuando las fuentes de alimento se agotan y la temperatura es desfavorable, la densidad poblacional cambia y el nematodo entra en un estado de diapausa conocido como *larva dauer*, dispersándose por el suelo o uniéndose a organismos más grandes. Esta etapa larvaria le permite sobrevivir en condiciones adversas y modular su longevidad, metabolismo y respuesta al estrés oxidativo (14, 29).

Las larvas dauer se diferencian de las larvas reproductivas en desarrollo por tener una única cutícula, cuerpo estrecho, mayores reservas de lípidos y alteraciones metabólicas (30, 31). Aunque esta etapa permite la supervivencia en condiciones adversas, es

perjudicial para el desarrollo y la reproducción, ya que reemplaza la etapa normal crucial para el desarrollo de órganos reproductivos (32). El estado dauer está regulado por la vía de señalización insulina/IGF-1, que desempeña un papel importante en el metabolismo, crecimiento y desarrollo en múltiples organismos, desde *C. elegans* hasta los seres humanos. Esta vía, bien conservada y estudiada exhaustivamente, es fundamental en la esperanza de vida y resistencia al estrés (33). La plasticidad en el desarrollo es esencial para la longevidad, y la larva dauer en *C. elegans* es un ejemplo de ello.

En condiciones normales, el ciclo de vida del nematodo dura aproximadamente 21 días, comenzando con la fertilización del huevo, seguido de la eclosión y cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3, L4) hasta convertirse en adulto (17). El adulto pone un huevo aproximadamente 2 horas después de la fertilización. Como se muestra en la Figura 1, la fase embrionaria dura de 12 a 14 horas y se convierte en larva L1 (aproximadamente 250 μm); tras 12 horas, muda a larva L2 (360-380 μm); después de 8 horas, se transforma en L3 (490-510 μm); tras otras 8 horas, pasa a L4 (620-650 μm); y finalmente, después de 10-18 horas, alcanza la forma adulta (1110-1150 μm) (17).

Generalmente, el hermafrodita adulto comienza a poner huevos 12 horas después. Cuando las condiciones son desfavorables (hacinamiento, mala alimentación), la larva L1 entra en estado dauer, siendo más delgada y oscura debido a una cutícula más resistente, y puede durar meses antes de convertirse en L4, omitiendo el estadio L2 y L3 cuando las condiciones mejoran (17,24).

Durante este proceso, la vía de señalización insulina/IGF-1 responde a las condiciones ambientales, permitiendo la activación o expresión de factores cruciales para el desarrollo normal del nematodo o, en condiciones desfavorables, promoviendo la formación de la larva dauer (24).

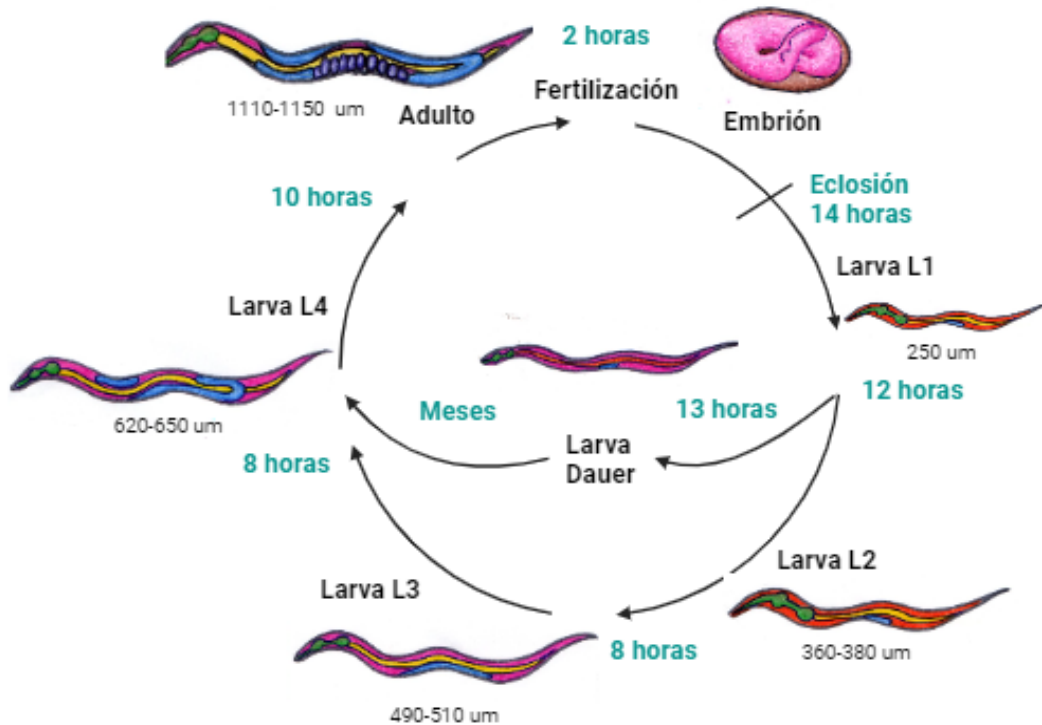


Figura 1. Ciclo de vida de *C. elegans*. El ciclo incluye las fases de huevo, cuatro estadios larvarios (L1 a L4) y adulto. Bajo condiciones adversas, las larvas pueden entrar en un estado de resistencia conocido como larva dauer, que les permite sobrevivir hasta que las condiciones mejoren. Tomado y modificado de (17).

3.2.3 Desarrollo embrionario de *C. elegans*

El desarrollo de *C. elegans* comienza con la fertilización y formación del cigoto, que inicia su división celular y, al avanzar, se diferencia en varias células precursoras. Después de la eclosión, el nematodo pasa por cuatro estadios larvarios antes de convertirse en adulto (17). Cuando el huevo es fertilizado, se forman dos líneas celulares principales: AB, que da lugar a las células del ectodermo, incluidas neuronas y epidermis; y P1, que se divide en P2, la célula progenitora de la línea germinal, y EMS, que origina las células del mesodermo y endodermo, incluyendo intestino y músculos. P2 se divide en P3 (que se divide para formar P4 y D) y en C (que forma músculos y neuronas). Finalmente, P4 es la célula fundadora de la línea germinal; se divide y da lugar a Z2 y Z3, quienes migran hacia las regiones donde se desarrollarán las gónadas (17).

En los organismos hermafroditas de *C. elegans*, las células germinales se distribuyen en dos gónadas, cada una con su propia línea germinal. Primero se producen

espermatozoides durante la etapa L4 y, una vez maduros, se desarrollan los ovocitos (Figura 2). Por otro lado, en los machos, las células germinales se encuentran en una única gónada donde se producen continuamente espermatozoides (30).

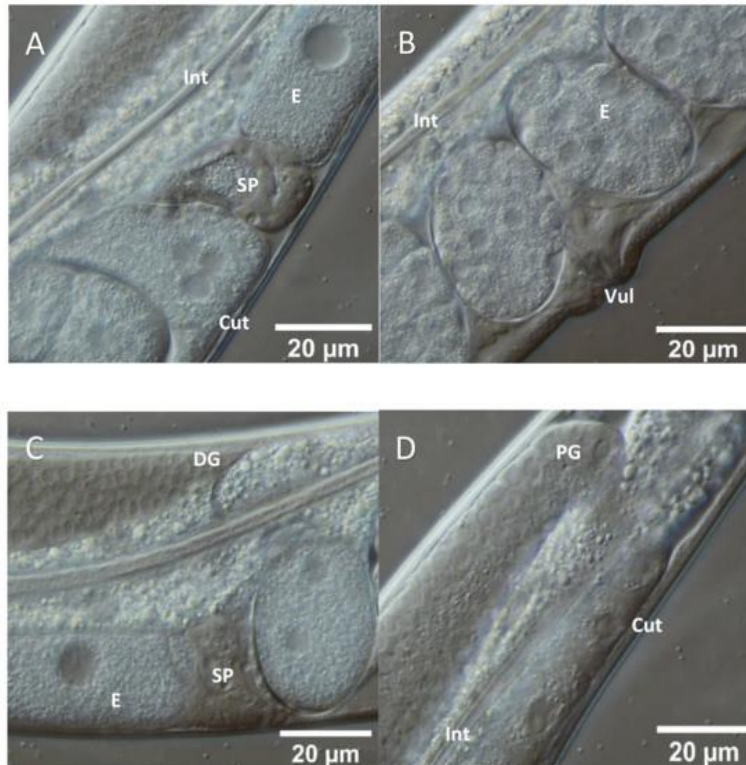


Figura 2. Morfología de la línea germinal de hermafroditas L4 en *C. elegans* N2 por microscopía de interferencia diferencial. (A) Región espermateca rodeada de embriones en desarrollo nativo (B) Región vulvar rodeada de embriones en desarrollo (C) Primer plano del brazo gonadal distal. (D) Primer plano del brazo gonadal proximal. Cut = cutícula, DG = gónada distal, E = óvulo, Int = intestino, PG = gónada proximal, SP = espermateca, Vul = vulva. Tomado y modificado de (30).

3.2.4 Anatomía de *C. elegans*

El modelo *C. elegans* posee un pseudoceloma característico de los nematodos, que proporciona espacio para los órganos y le da forma al animal, además de una epidermis que protege sus sistemas corporales. Se han estudiado bien tres sistemas en este modelo animal: el reproductivo, digestivo y nervioso (34).

En el sistema reproductor de los nematodos hermafroditas, que son autofecundantes, poseen dos gónadas en forma de "U" que incluyen un ovario, la espermateca

(receptáculo seminal), el oviducto y el útero. Inicialmente, se producen espermatozoides que se almacenan en la espermateca; posteriormente, las gónadas cambian para producir ovocitos. Los espermatozoides almacenados fecundan los ovocitos a medida que pasan por la espermateca (30, 35). Los huevos fertilizados se desarrollan en el útero, y cada hermafrodita puede producir entre 300 y 350 huevos en un ciclo reproductivo de aproximadamente 3,5 días a temperatura ambiente, resultando en progenie completamente hermafrodita.

Los machos son menos frecuentes y suelen ser de menor tamaño que los hermafroditas. Cuando ambos sexos se aparean, se obtiene una progenie mixta que produce alrededor de 1.000 huevos (35, 36). En los machos, la gónada tiene forma de "J" e incluye testículos donde se producen los espermatozoides, un conducto deferente que los transporta hacia la cloaca, una vesícula seminal que almacena los espermatozoides maduros hasta el momento de la copulación y espículas copulatorias que ayudan a transferir los espermatozoides a los hermafroditas (35).

La reproducción sexual implica el proceso de meiosis que comienza durante el desarrollo de la etapa larvaria L4; los hermafroditas bien alimentados producen aproximadamente 150 espermatozoides en sus gónadas (31). Posteriormente, cambian irreversiblemente a la ovogénesis, y la producción de la línea germinal continúa durante toda la vida adulta. La producción de células germinales depende de la disponibilidad de nutrientes y de los factores ambientales; estas células se originan durante el desarrollo embrionario y se diferencian en óvulos y espermatozoides (31, 35).

El sistema digestivo de *C. elegans* es simple y le permite alimentarse y digerir su comida, que son especialmente bacterias. Consta de la boca, donde ingresan las bacterias; la faringe, donde son trituradas; el intestino, donde se absorben los nutrientes; y finalmente, los productos de desecho son compactados en el recto y excretados a través del ano (35). Por último, el sistema nervioso del nematodo consta de 302 neuronas en el hermafrodita adulto. Posee un ganglio cefálico alrededor de la faringe que contiene una gran cantidad de neuronas. Los cordones nerviosos ventral, dorsal y lateral permiten la conectividad neuronal. Además, cuenta con neuronas sensoriales distribuidas a lo largo del cuerpo, encargadas de detectar estímulos ambientales. Las neuronas motoras

controlan la contracción muscular y el movimiento. La integración de señales se realiza mediante interneuronas que conectan las neuronas sensoriales y motoras, facilitando la comunicación (35, 37).

3.3 Cepas transgénicas de *C. elegans*

El avance en las investigaciones ha permitido explorar el campo de la epigenética ambiental, y *C. elegans* se ha consolidado como un modelo apto para evidenciar procesos epigenéticos en tiempo real. En este ámbito, la experimentación con cepas transgénicas del nematodo es cada vez es más frecuente. Estas cepas consisten en la inserción de uno o más genes o secuencias específicas de material genético, que permiten a *C. elegans* expresar nuevas características fenotípicas (14, 38).

Los nematodos transgénicos resultan valiosos en estudios ambientales por su facilidad de manejo y la posibilidad de visualizar in vivo la expresión génica y la activación de rutas de estrés frente a diversos contaminantes. Algunos transgénicos incorporan genes reporteros, como GFP, que funcionan como marcadores para analizar el comportamiento celular (39).

La versatilidad de *C. elegans* ha permitido evaluar la ecotoxicidad asociada a la presencia de partículas finas atmosféricas, observándose efectos adversos especialmente tras exposiciones agudas (23). Asimismo, se ha demostrado que el material particulado atmosférico induce alteraciones fisiológicas en el nematodo, incrementando su susceptibilidad a infecciones por bacterias patógenas (12).

El modelo ha demostrado ser igualmente útil en el estudio de la calidad del agua, ya que permite predecir efectos tóxicos de diversos contaminantes en organismos vivos, superando las limitaciones del monitoreo fisicoquímico convencional (8). En Colombia, por ejemplo, este modelo se ha utilizado para evaluar la toxicidad de metales pesados presentes en el río Magdalena (40). De manera similar, un estudio realizado en China empleó cepas transgénicas con el reportero GFP para medir los efectos de bacterias en una fuente hídrica, evidenciando especificidad en la respuesta tóxica según la cepa bacteriana (16). Por otro lado, un análisis de parabenos comúnmente encontrados en

aguas superficiales y residuales reportó efectos tóxicos en la cepa transgénica TJ356 (*daf-16::GFP*), evidenciando su sensibilidad a este tipo de contaminantes (40).

Estas cepas son útiles para observar la expresión del gen de interés en diferentes partes del nematodo y bajo ciertas condiciones; además, facilitan la detección de alteraciones en el nematodo asociados a la exposición a distintos contaminantes o sustancias (38,40).

3.3.1 Regulación de DAF-16

El gen *daf-2* codifica en *C. elegans* para un receptor DAF-2, similar al receptor del crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R) en mamíferos. Estos péptidos son cruciales para la regulación metabólica, el crecimiento y desarrollo en animales. Evolutivamente desde los gusanos hasta los humanos, la vía de señalización de la insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina se han conservado a lo largo del tiempo, lo que permite proponer a *C. elegans* como modelo para comprender la función de estos péptidos (41); además, se ha identificado a *daf-2* como modificador genético de la esperanza de vida, el desarrollo, la reproducción y la resistencia al estrés (26).

Es por este motivo que, las mutaciones de *daf-2* en *C. elegans* han servido para proporcionar una mayor esperanza de vida (42,43), y esto posiblemente tenga relación alguna con la resistencia que pueden adquirir frente a la colonización por bacterias patógenas que hayan sido consumidas; de este modo, llevarán una vida más sana y sobrevivirán más tiempo (44).

Además, se sabe que los gusanos adultos que presentan mutaciones en este gen tienen una alta eficiencia metabólica y por lo tanto su esperanza de vida aumenta significativamente; de este modo, se cree que exista una relación entre los genes involucrados en procesos metabólicos y fisiológicos importantes en *C. elegans* en respuesta a condiciones ambientales y nutricionales (45).

El gen *daf-2* ayuda en la regulación del crecimiento reproductivo y el metabolismo en respuesta a señales tanto internas como externas, dicho gen codifica para un receptor de tirosina quinasa similar a la insulina (DAF-2) y cuando las condiciones de crecimiento son favorables un ligando de péptido similar a la insulina (DAF-28) se une y activa a este receptor que transmite la señal a través de una cascada de señalización que resulta en

la fosforilación de DAF-16 impidiendo la translocación al núcleo, como se observa en la Figura 3 (46,47).

El gen *daf-16* codifica para un factor de transcripción similar FOXO en mamíferos que regula la respuesta al estrés celular y es necesario para la formación de larvas dauer, así como para el aumento en la esperanza de vida. (48,49) De esta manera, cuando DAF-2 está inactivo induce a DAF-16 para translocar a núcleo y, por lo tanto, expresar genes que promueven el crecimiento, reproducción, metabolismo y longevidad. (50,51)

Por otro lado, si hay una mutación en el gen *daf-2* o las condiciones ambientales no son favorables, se reduce el activador de señalización lo que da como resultado una mayor longevidad y resistencia al estrés oxidativo (15,50) debido a que, *daf-16* está activo y se transloca al núcleo para promover cambios que mejoran la vitalidad y disminuyen los efectos del envejecimiento. (47,48) Aunque esta mutación casi duplica la esperanza de vida del nematodo y no suelen tener mayor efecto en el desarrollo o la fertilidad, se predice que el aumento en la expectativa de vida puede ser perjudicial para la aptitud física. (52).

Por otro lado, las mutaciones en el gen *daf-16* que está regulado negativamente por DAF-2, conlleva a una reducción en la prolongación de vida, menor resistencia al estrés, apoptosis excesiva y alteraciones en el metabolismo que puede afectar el crecimiento y la reproducción (48). De esta manera, resulta importante el estudio de esta vía de señalización para ofrecer indicaciones sobre la prevención de la declinación de las capacidades cognitivas (53), patologías asociadas con el envejecimiento y efectos adversos sobre la respuesta al bienestar general de *C. elegans*. (27)

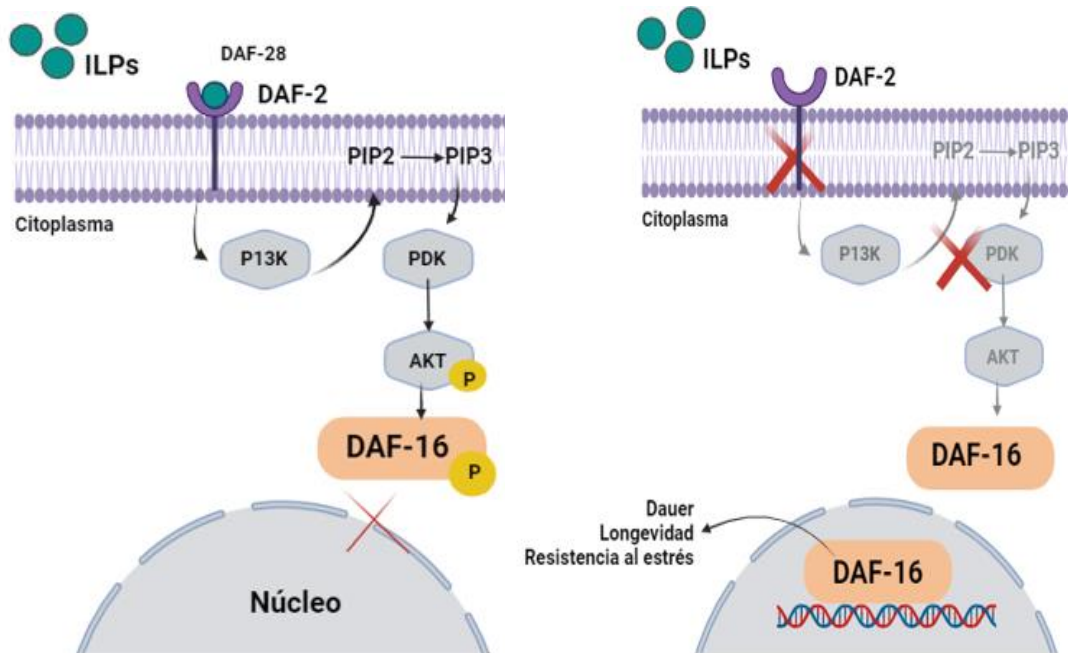


Figura 3. Regulación de DAF-16 en *C. elegans*. A la izquierda, en condiciones óptimas el receptor DAF-2 activo se une a un péptido similar a la insulina (ILPs) en este caso DAF-28 y activa una cascada de señalización. La fosfatidilinositol 3-quinasa (P13K) es activada y convierte a los fosfolípidos fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5- trifosfato (PIP3) en membrana, este último, junto con una quinasa (PDK) permite la fosforilación y activación de la proteína quinasa B (AKT) que a su vez fosforila a DAF-16 que previene la translocación a núcleo. A la derecha bajo condiciones desfavorables la cascada no se activa y DAF-16 no se fosforila lo que resulta en la translocación de DAF-16 al núcleo para la activación de la transcripción de genes. Tomado y modificado de (54).

3.3.2 Cepa transgénica TJ356

La cepa transgénica *C. elegans* TJ356 que fusiona la proteína GFP a DAF-16 tiene integrada la construcción zls 356 [daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6(su1006)] en su genoma mediante irradiación gamma extracromosomal (Ex daf-16::GFP) y permite observar a fondo el papel del gen daf-16 en respuesta al estrés celular y así, obtener de manera concisa el posible efecto de las bacterias que pueden estar presentes en muestras de agua (40,49).

La cepa transgénica TJ356 de *C. elegans* es relevante para el estudio de la biología del envejecimiento y la influencia de factores ambientales en su biología. Posee un gen reportero GFP fusionado al gen *daf-16*, el cual permite la visualización exacta de la

localización de DAF-16 en las células del nematodo (DAF-16::GFP) (49,55). Además, se suele incluir un marcador de movimiento rol-6 que facilita la identificación del modelo animal bajo el microscopio mediante un desplazamiento lento y de rodadura. (40,49).

Esta fusión permite una rápida localización nuclear de DAF-16 cuando las condiciones ambientales no son favorables, por el contrario, cuando éstas mejoran, DAF-2 inhibe la entrada de DAF-16 al núcleo y por ende, permanece en citoplasma. Además, se ha demostrado que las cepas transgénicas crecen y se reproducen más lentamente que las cepas silvestres; por lo tanto, viven más tiempo. En consecuencia, DAF-16 es una respuesta adaptativa a un entorno cambiante (49).

De este modo, DAF-16::GFP permite entender la biología del envejecimiento, la longevidad y la respuesta al estrés en respuesta a condiciones ambientales como, calor, falta de nutrientes y estrés oxidativo. DAF-16::GFP es visible por primera vez en embriones tardíos antes de la eclosión y permanece durante toda la vida del nematodo; asimismo, se ha demostrado que se expresa en la mayoría de las células del nematodo y por tal razón, es visible especialmente en células neuronales, pero no en células faríngeas (49).

De igual forma, éste transgénico es más resistente al estrés oxidativo en comparación con *C. elegans* N2 (tipo silvestre) debido a que, este proceso suele resolverse mediante enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa-3 (SOD-3) en donde su expresión está regulada positivamente por DAF-16 (55). Por lo tanto, se cree que las fluctuaciones en la actividad de DAF-16 (involucrada en longevidad y respuesta al estrés) influyen en la vida útil del nematodo (56).

3.3.3 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y la capacidad del organismo para la neutralización por medio de métodos antioxidantes. Las ROS pueden dañar componentes celulares como lípidos, proteínas y material genético debido a su potencial oxidativo. Diversos estudios han

demostrado que tanto sustancias químicas como contaminantes biológicos son capaces de inducir estrés oxidativo en el bioindicador ecotoxicológico (12).

Por ejemplo, una investigación realizada en 2018 evaluó la calidad del agua superficial de un embalse en China, donde se encontró que *C. elegans* experimentó alteraciones en su esperanza de vida, locomoción, longitud corporal y en la producción de ROS debido a la toxicidad de las muestras de agua recolectadas (15). Estos resultados sugieren que *C. elegans* es un modelo efectivo para la evaluación toxicológica de muestras ambientales, proporcionando información valiosa sobre los efectos del estrés oxidativo inducido por diferentes contaminantes.

Del mismo modo, ciertos contaminantes ambientales pueden influir en la señalización de muerte celular en el nematodo mediante la producción de ROS y alteración de vías clave en la regulación de la expresión de genes involucrados en la supervivencia celular (57).

3.4 Interacción bacteria- hospedero

C. elegans al igual que el modelo *D. melanogaster* resulta ideal para el análisis experimental de las interacciones hospedero-microbio, fundamentalmente para patógenos bacterianos, fúngicos e incluso virales (58). Debido a que el microbioma saludable de *C. elegans* es necesario para su fisiología, extensión de vida, resistencia al estrés ante factores bióticos como abióticos, quimiotaxis, crecimiento, fecundidad y comportamiento, se resalta su utilidad como organismo modelo para las investigaciones relacionadas con el microbioma (59).

Por un lado, en el medio ambiente el nematodo contiene una variedad de especies microbianas, y por otro lado, en el laboratorio suele ser hospedero para una sola especie, lo que ha permitido visualizar el efecto de diferentes bacterias, abordando a cada una de ellas de forma independiente (59). En el ambiente establece una fuerte asociación especialmente por las bacterias Gram negativas que son fuertes competidoras tanto en el ecosistema, donde pueden ser colonizadoras de la fruta descompuesta, como dentro del nematodo (58).

C. elegans ha desarrollado múltiples mecanismos que le permiten detectar metabolitos microbianos presentes en el medio ambiente, facilitando la discriminación entre especies bacterianas que sirven como fuente de alimento o aquellas que son patógenas y este proceso de identificación es crucial para su supervivencia, ya que le permite priorizar fuentes de nutrientes y evitar organismos que puedan causarle daño (33).

Además, se ha demostrado que tanto patógenos con amplia gama de hospederos como los que tienen uno en específico, tienen la capacidad de infectar a *C. elegans*. (60) Sin embargo, el nematodo cuenta con mecanismos neuronales y respuestas a estímulos que le permiten evitar ciertos patógenos mediante la selección natural, algo favorable; ya que le brinda una protección integral y adaptativa (61).

En este contexto, se ha demostrado que el nematodo *C. elegans* es un modelo prometedor para la investigación de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (62) y otros agentes microbianos con especificidad de hospedero, cuya infectividad se restringe a ciertos anfitriones en la naturaleza. Esta capacidad de interacción con diversos patógenos lo convierte en una herramienta invaluable para estudiar la patogénesis y los mecanismos de infección.

Debido a que, la nutrición es probablemente el factor más influyente en el crecimiento, desarrollo, reproducción, metabolismo, resistencia al estrés y longevidad; muchos microorganismos participan en el procesamiento de nutrientes, algunas en una relación simbiótica con su hospedador; otras, actuando como patógenas y, por lo tanto, dañando su fisiología (63). *C. elegans* es particularmente útil para estudiar cómo estas interacciones microbianas afectan la biología del hospedador, ofreciendo una visión única sobre las relaciones microorganismo-hospedador.

Un ejemplo claro de este tipo de interacción es el patógeno *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) es capaz de infectar y matar a *C. elegans*, acortando su tiempo de vida útil, lo que demuestra que es un modelo útil para el estudio de patógenos humanos relevantes (64). Adicionalmente, se ha señalado que la manipulación genética del nematodo permite un análisis detallado de la interacción hospedero-patógeno (25,65)

C. elegans se ha propuesto como una buena alternativa para la comprensión de las complejas interacciones entre el hospedador y los microbios, incluyendo los patógenos

humanos. Este modelo ofrece ventajas sobre otros organismos comúnmente utilizados, como los modelos murinos, que están limitados por altos costos y restricciones en la realización de ensayos de alto rendimiento (16,59).

Adicionalmente, *C. elegans* ha sido utilizado para visualizar cambios en la expresión de genes y las vías metabólicas que tienen gran impacto en el estrés, inmunidad y envejecimiento del hospedero cuando entran en contacto con ciertos microbios. Sin embargo, la genética de éste puede influir significativamente en el perfil de expresión de las bacterias, lo que agrega un nivel de complejidad al estudio de estas interacciones (66). A pesar de ello, el nematodo sigue siendo un modelo extremadamente valioso para investigar los potenciales efectos de los patógenos.

3.5 Cuenca Río Alto Suárez

Villa de San Diego de Ubaté es un municipio ubicado a 95 kilómetros al nororiente de la capital del país y al 2019 se estima una población de aproximadamente 45.000 habitantes. El Río Ubaté, ubicado en Cundinamarca pertenece a la cuenca hidrográfica Río Alto Suarez, con un área de 176.840.094 hectáreas (Ha) y donde se involucran 18 municipios ubicados entre Cundinamarca y Boyacá (67).

La cuenca del Río Ubaté atraviesa municipios como Lenguazaque, Ubaté, Sutatausa y Carmen de Carupa, en donde se lleva a cabo una intensa actividad agrícola, ganadera, minera e industrial, especialmente láctea, que son las principales responsables de la calidad del agua (67). El río, que abastece a municipios y veredas adyacentes, también recibe descargas de aguas industriales y domésticas, además de la afluencia de los ríos Suta y Lenguazaque (67).

Como se muestra en la Figura 4, la cuenca tiene diferentes puntos de drenaje hacia los principales ríos en los que se destaca el Río Alto Suárez, Río Alto Ubaté y Río bajo Ubaté-Fúquene (68).



Figura 4. Mapa de drenaje de la Cuenca del Río Alto Suárez. Cuenca hidrográfica Río Alto Suarez que comprende Río Alto Suárez, Río Bajo Ubaté-Fúquene y Río Alto Ubaté, abarca un área aproximada de 176.840,094 Ha y la comprende 18 municipios distribuidos en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. La cuenca involucra en su totalidad los municipios de Carmen de Carupa, Chiquinquirá, Cucunubá, Fúquene, Guachetá, Lenguazaque, Saboyá, Ráquira, San Miguel de Sema, Simijaca, Sutatausa, Susa, y Ubaté. Por otro lado, se cuentan con cuatro sistemas lóticos principales que son el Río Ubaté, Chiquinquirá, Suárez y Simijaca. Tomado de (68).

Para la población de Ubaté, la fuente de captación es en el Río Alto Ubaté en el sector El Guacal Vía Carmen de Carupa. La planta de tratamiento de agua potable convencional tiene una capacidad de 48 litros por segundo (lps) y las aguas residuales domésticas corresponden a 35 lps. Los usos del recurso hídrico actualmente son para abastecimiento de áreas rurales y urbanas, riego agrícola, abrevadero. La cuenca, además cuenta con una actividad secundaria minera (69).

Los principales factores que provocan impactos ambientales son el vertimiento de aguas residuales domésticas, efluentes hospitalarios de Carmen de Carupa sin previo tratamiento, descargas de residuos provenientes de industria minera y láctea en áreas rurales (69).

La CAR tiene programas de monitoreo de la calidad del agua que se han ajustado según las necesidades encontradas en el monitoreo y análisis de resultados obtenidos. La temporalidad del monitoreo se establece según las lluvias presentadas en los diferentes meses del año; de este modo, se abarcan tanto períodos lluviosos como secos. El análisis comprende estudios bacteriológicos y fisicoquímicos; además del registro de material flotante (3).

Del mismo modo, se ha realizado monitoreo del recurso hídrico de la cuenca del Río Alto Suárez, que comprende el Río Ubaté y Río Suárez, con el fin de crear estrategias para proteger los recursos naturales y reducir las problemáticas ambientales derivadas de la presión antropogénica actual y futura (69).

Según la Resolución 3462 de 2009 la CAR definió clases que consideran los diferentes tipos de usos del agua según la idoneidad del recurso hídrico: “Clase I: Valores de los usos de agua para consumo humano y doméstico con tratamiento convencional, preservación de flora y fauna, uso agrícola, uso pecuario y recreativo. Clase II: Valores de los usos del agua para consumo humano y doméstico con tratamiento convencional, uso agrícola con restricciones y uso pecuario e industrial (3,4).

Por otro lado, la Clase III: Valores asignados a la calidad de los lagos, lagunas, humedales y demás cuerpos lénticos de aguas ubicados dentro de la cuenca del Río Ubaté-Suarez. Clase IV: Valores a los usos agrícolas con restricciones, pecuario e industrial” (3,4). De esta manera, la Figura 5 ilustra la ubicación de vertimientos de aguas residuales en la cuenca del Río Alto Suárez.

El Río Ubaté, en el tramo comprendido entre la estación limnimétrica y la confluencia con el Río Suta, junto con sus afluentes, se clasifica como Clase II. Desde la unión con el Río Suta hasta la confluencia con el Río Lenguaque, el Río pertenece a la Clase IV. Finalmente, el curso bajo del Río Ubaté, hasta su desembocadura en la laguna de Fúquene, así como sus afluentes, también corresponde a la Clase IV (68).

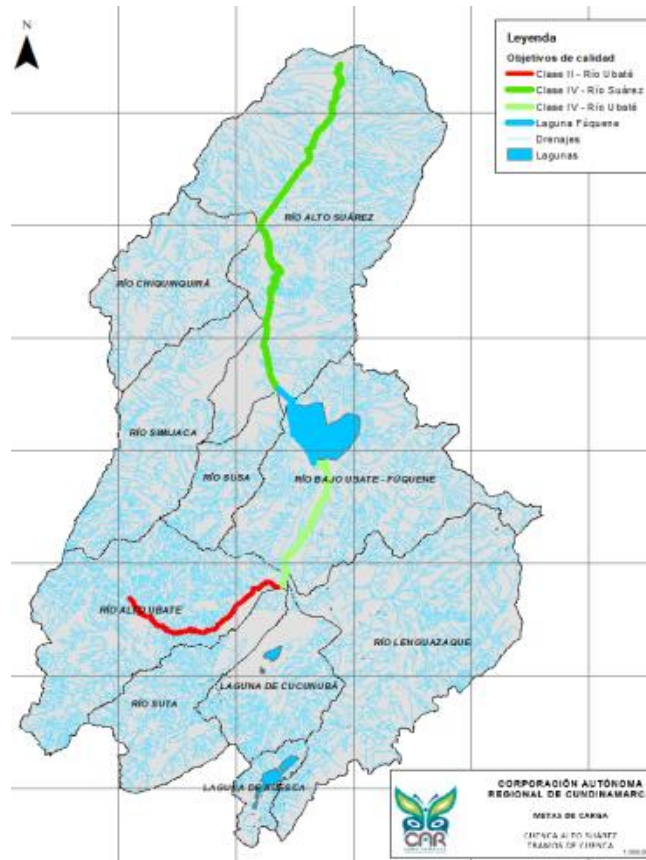


Figura 5. Ubicaciones de vertimiento de aguas residuales en la cuenca Río Alto Suárez. Según las clases de los objetivos de calidad del Río Ubaté en determinadas ubicaciones corresponde a clase II y clase IV. Tomado de (68)

Para asegurar la calidad del agua que consumen la población ubatense, la empresa de servicios públicos del municipio cuenta con un laboratorio que se encarga del análisis con medición de los parámetros de la calidad del agua establecidos en la Resolución 2125 de 2007 del Ministerio de Salud y Protección Social. Dichos análisis se aplican al agua cruda captada del Río Ubaté, al agua tratada en la planta de tratamiento y los puntos de la red de distribución pactados con la secretaría de salud, con el objetivo de brindar agua apta para el consumo humano según el Índice de Riesgo de la Calidad del Agua (IRCA) (3,4)

4. Materiales y métodos

El presente trabajo corresponde a un estudio experimental, de tipo cuantitativo y analítico. Los procedimientos y técnicas para el manejo del nematodo fueron realizados según lo estandarizado en el semillero de investigación de Biotecnología y Genética de la UCMC y por referencias bibliográficas adecuadas a los diferentes ensayos.

4.1 Identificación de las bacterias cultivables potencialmente patógenas en el agua del Río Alto Ubaté

4.1.1. Ubicación de sitio de muestreo y recolección de la muestra de agua

Para la determinación del punto de muestreo en el Río Ubaté, se consideraron variables geográficas como el uso del suelo circundante, la accesibilidad e influencia de otros afluentes, así como variables antropogénicas, entre ellas el nivel de urbanización, la presión recreativa, las construcciones hidráulicas, la extracción de agua para riego, consumo, uso industrial y ganadero, las actividades agropecuarias y las descargas de aguas residuales, según lo recomendado por Gagneten et al. (70, 71)

Una vez elegido el punto de muestreo, se recolectaron muestras de agua en recipientes estériles y bajo las condiciones adecuadas para evitar contaminación exógena según el Instructivo de Toma y Preservación de Muestras de Agua Superficial del IDEAM y el Instructivo de Recolección Muestras de Agua de CORNARE (72,73).

Para los análisis microbiológicos se recolectaron cuatro muestras puntuales en recipientes de 100 mL, los cuales contenían tiosulfato de sodio como agente decolorante. El período de composición se llevó a cabo durante aproximadamente 4 horas, realizando una toma de muestra por cada hora, las cuales posteriormente se integraron en un frasco estéril para conformar una muestra compuesta con un volumen total de 400 mL. De esta mezcla se tomaron 100 uL para la siembra en medios de cultivo.

Para el análisis fisicoquímico se recolectaron cuatro muestras puntuales de 250 mL cada una, tomadas a intervalos de una hora en recipientes estériles. Estas se integraron para conformar una muestra compuesta con un volumen total de 1000 mL.

Todas las muestras fueron transportadas conservando la cadena de frío hasta su llegada al laboratorio, donde se realizaron los análisis correspondientes (72,73).

4.1.2 Análisis fisicoquímico y microbiológico de las muestras de agua

Los análisis fisicoquímicos, se realizaron en el laboratorio de química de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. La determinación de turbidez se realizó utilizando el turbidímetro TURBIQUANT 3000T. La cuantificación de cloruros y alcalinidad se efectuó por el método de titulación con nitrato de plata y ácido sulfúrico respectivamente (74), la presencia/ausencia de fosfatos, nitritos y nitratos se realizó mediante kits colorimétricos con reactivo en polvo (74). Para la determinación de dureza, se llevó a cabo un análisis por titulación con EDTA. En el punto de muestreo, el pH se midió con el potenciómetro HI 9024 HANNA. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Adicionalmente, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos Suspendidos Totales (SST), grasas y aceites, hierro y sulfatos, así como, el análisis microbiológico de coliformes totales y *E. coli* mediante la técnica del Número Más Probable (NMP/100 mL), éstos análisis fueron realizados por el laboratorio CIAN S.A.S., siguiendo la metodología descrita en Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23.^a ed.

4.1.3. Identificación de las bacterias potencialmente patógenas presentes en el agua del Río Alto Ubaté.

Para la identificación de las bacterias patógenas, las muestras de agua recolectadas se sembraron en los medios comerciales agar MacConkey, medio selectivo para aislamiento de bacterias Gram negativas y agar sangre, medio de enriquecimiento para crecimiento de múltiples microorganismos.

Se inocularon 100 µL de muestra en cada placa de agar, mediante siembra masiva y se llevó a incubación a 37 °C durante 48 horas bajo condiciones aerobias.

Se seleccionaron las colonias predominantes y se realizó un aislamiento secundario para garantizar la pureza de la colonia. La morfología bacteriana de cada una de estas colonias se visualizó mediante coloración de Gram.

La identificación de las bacterias aisladas se realizó mediante pruebas bioquímicas a partir de los cultivos bacterianos puros utilizando la tecnología de MicroScan autoScan-4 con un periodo de incubación de 24 horas a 37°C (75). Una vez identificadas las bacterias fueron conservadas en congelación a -80°C, en medio BHI con glicerol, hasta su posterior utilización. Posteriormente, las bacterias aisladas fueron seleccionadas como patógenas con base en la revisión de la literatura científica, considerando su relevancia en ambientes ecológicos.

4.2 Determinación de los efectos fisiológicos y citotóxicos en el modelo *C. elegans* después de la exposición a las bacterias patógenas en el Río Alto Ubaté

4.2.1 Adquisición, mantenimiento, sincronización de las cepas de *C. elegans*

Las cepas de *C. elegans* N2 (tipo silvestre) y TJ356 (transgénicos) fueron adquiridas en el CGC (Caenorhabditis Genetics Center) de Minnesota. Ambas cepas se cultivaron en placas de Petri con agar NGM (Nematode Growth Medium) a 20°C. La preparación del medio para un volumen final de 200 mL incluyó, 0.6 gr de NaCl, 3.4 gr de agar agar, 0.5 gr de triptona, 5 mL de Buffer KH₂PO₄ 1M y 195 mL de agua destilada. La mezcla fue esterilizada en el autoclave y una vez enfriado el medio a temperatura ambiente, se enriqueció con 200 µL de colesterol, 200 µL de CaCl₂ 1M y 200 µL de MgSO₄ 1M. Posteriormente, se dispensó en placas de Petri, se dejó solidificar y se adicionó la fuente de alimento (*E. coli* OP50) (27,76).

Para la realización de los ensayos fisiológicos y citotóxicos es importante que todos los nematodos se encuentren en un mismo estadio larvario; para ello, se realizó una sincronización mediante blanqueamiento con solución de bleaching (NaOH/NaCl), con el fin desintegrar las larvas y conservar los huevos debido a su cáscara protectora (38,76). Brevemente, las placas que contenían abundantes nematodos en estado de gravidez fueron lavados con solución tampón M9. El producto lavado se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 mL y centrifugado a 4000 rpm durante 3 minutos; el sobrenadante fue descartado. Se agregó 1 mL de la solución de bleaching previamente preparada según protocolo del semillero de investigación de Biotecnología y Genética, y se agitó

vigorosamente por 4 minutos, sin uso de vórtex. Es importante, tener en cuenta el tiempo de exposición puesto que, el exceso de solución de bleaching podría generar daños en los huevos y una baja exposición puede crear contaminación (17). Posteriormente, se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y se adicionó tampón M9 para diluir residuos de la solución. Este lavado se repitió tres veces. Finalmente, los huevos obtenidos se resuspendieron en 200 μ L de tampón M9 y se cultivaron en medio NMG con *E. coli* OP50 para generar larvas en estadio L4 (23).

4.2.2 Caracterización fenotípica y fisiológica de las cepas de *C. elegans* N2 y TJ356

Los nematodos de las cepas N2 y TJ356 fueron caracterizados en sus diferentes estadios larvarios. En la cepa N2 se evaluó la longevidad y en la cepa TJ356 se caracterizó la longevidad y la reproducción. Finalmente, en los nematodos transgénicos se determinó la expresión y localización de la proteína DAF-16.

- ***Ensayo de Longevidad***

Después de la sincronización de nematodos se seleccionaron 15 larvas en estadio L4 y fueron transferidas a nuevas placas de NGM sembradas previamente con *E. coli* OP50, utilizando un pick de alambre de platino de 0.3 mm de diámetro (77). Los nematodos se transfirieron diariamente a placas frescas durante siete días a 20 °C hasta finalizar su periodo reproductivo para evitar la mezcla de progenies, luego cada dos días hasta observar su muerte, que se verificó en los nematodos que no presentaron respuesta al tacto con el pick. Cada ensayo se realizó por triplicado (23).

- ***Reproducción***

En el ensayo de reproducción se tomaron cinco nematodos en estadio L4 tardío. Cada nematodo fue transferido individualmente a nuevas placas de NGM diariamente durante cuatro días, hasta completar su periodo reproductivo, manteniéndose a una temperatura constante de 20 °C. Los medios fueron observados bajo estereoscopio todos los días hasta visualizar larvas L2 y L3. El número de larvas eclosionadas indicó la fertilidad de los huevos (77). Los ensayos se realizaron por triplicado.

- **Expresión y localización de DAF-16**

Mediante microscopía de fluorescencia, con y sin exposición a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) fue evaluada la expresión y localización de DAF-16 en la cepa TJ356. Para la observación, se añadieron 20 µL de levamisol 1 mM como agente inmovilizador sobre una lámina, luego se colocaron 10 nematodos y se cubrieron con laminilla. Finalmente, se observaron bajo microscopio de fluorescencia Olympus BX53M.

Se calculó el porcentaje de nematodos con traslocación nuclear de DAF-16 considerando como positivos aquellos que presentaban la proteína verde fluorescente localizada en los núcleos celulares, y como negativos aquellos con fluorescencia distribuida de manera difusa en todo el cuerpo (49). Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.2.3 Exposición de las bacterias patógenas a la cepa N2 de *C. elegans*

Las bacterias Gram negativas aisladas y seleccionadas como potencialmente patógenas, fueron descongeladas y reactivadas en medio BHI. Posteriormente, se sembraron en agar MacConkey para su cultivo. Se preparó una suspensión bacteriana ajustada a una turbidez aproximada de 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), de acuerdo con lo reportado por Solano y Marmolejo (78). A partir de esta suspensión, se administraron 50 µL como fuente de alimento a la cepa N2 de *C. elegans*, con el objetivo de identificar aquellas bacterias capaces de generar una disminución en la viabilidad del nematodo (76,79).

4.2.4. Análisis de citotoxicidad de las bacterias que presentaron disminución en la viabilidad en N2 frente a la cepa TJ356

Las bacterias seleccionadas por presentar disminución en la viabilidad en la cepa N2 fueron suministradas como fuente de alimento a la cepa transgénica TJ356 (1.5×10^8 UFC/mL), con el fin de evaluar la viabilidad y la reproducción. Posteriormente, se realizaron los ensayos de expresión y localización de DAF-16 como se describió anteriormente y se evaluó la producción de ROS.

La detección de ROS que refleja la activación del estrés oxidativo se midió mediante la sonda fluorescente H₂DCFDA (2', 7'- diacetato de diclorofluoresceína) que penetra

fácilmente la membrana celular y mediante esterasas se desacetila y se convierte en H₂DCF un compuesto no fluorescente, que luego se oxida a 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF) que es fluorescente en presencia de ROS (Figura 6) (80).

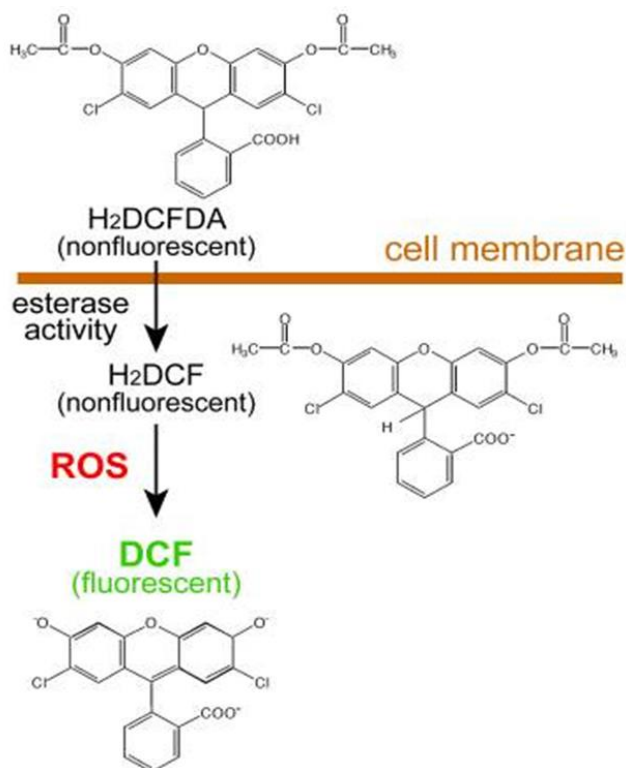


Figura 6. Detección de ROS mediante H₂DCFDA. La figura ilustra el ingreso del H₂DCFDA a la célula, donde es hidrolizado por esterasas a H₂DCF y posteriormente oxidado a DCF, un compuesto fluorescente que indica la presencia de ROS intracelulares. Fuente: Tomado de (72).

Para la medición de ROS, los nematodos de la cepa TJ356 fueron sincronizados y expuestos a las dos bacterias seleccionadas. Una vez alcanzado el primer día de adultez, se realizó un lavado con tampón M9. Posteriormente, en una placa de 96 pocillos se transfirieron aproximadamente entre 25-30 nematodos suspendidos en 50 μ L de M9.

A cada pozo se añadieron 50 μ L del reactivo H₂DCFDA a una concentración de 100 μ M, para llegar a una concentración final de 50 μ M. El blanco se preparó con 50 μ L de buffer M9 sin nematodos y 50 μ L de H₂DCFDA. Inmediatamente, la placa fue insertada en el lector de fluorescencia Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) para realizar una lectura basal a una longitud de onda de excitación de 485 nm y emisión de 520 nm. La placa fue

agitada continuamente a 300 rpm durante una hora y posteriormente se realizó una segunda lectura. Finalmente, el software SkanIt 7.1 proporcionó las unidades relativas de fluorescencia (URF) (80,81). Cada grupo de tratamiento fue ensayado por triplicado.

4.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism 8.0.2. Se aplicaron pruebas t-test, One-Way ANOVA y chi-cuadrado, complementadas con análisis post hoc como Test Dunnet y Tukey para realizar comparaciones entre los datos obtenidos (49). Adicionalmente, a través de las curvas de Kaplan-Meier se analizaron la longevidad de los nematodos con pruebas Log-rank. Los datos se presentan como la media \pm DE de experimentos diferentes cuando corresponda. Las diferencias se consideraron significativas con $P < 0.05$ (49).

5.1.2 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la muestra de agua del Río Alto Ubaté

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la muestra compuesta recolectada fueron interpretados con base en los valores de referencia establecidos en el Decreto 1594 de 1984 del Ministerio de Agricultura, el Decreto 2105 de 1983 del Ministerio de Salud, los cuales regulan la calidad del agua cruda destinada a potabilización y la Resolución 0631 de 2015 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible para los vertimientos puntuales en agua superficial. (82,83,84)

Los valores de DBO, DQO y SST fueron bajos indicando que el agua presenta una mínima presencia de materia orgánica biodegradable y oxidable, así como una baja cantidad de sólidos suspendidos, esto podría atribuirse sugiere a la dilución del agua durante la temporada de lluvias. El pH registrado fue de 7.5, valor que se encuentra cercano a la neutralidad y dentro del rango permitido (5.0–9.0), lo que indica un valor aceptable. Asimismo, se obtuvo una dureza total de 46 mg/L, una concentración de cloruros de 11,52 mg/L, una alcalinidad de 18 mg/L, sulfatos <10 mg/L y grasas y aceites <5 mg/L, todos dentro de los valores máximos permisibles establecidos por la normativa (Tabla 1) (82,83,84). Los nitratos no fueron detectados, lo cual está acorde con lo establecido en los decretos 1594/84 y 2105/83.

No obstante, la turbidez alcanzó un valor de 90.83 Unidades Nefelométrica de Turbidez (NTU), superando ampliamente el límite de 10 NTU para este tipo de agua, lo que sugiere una elevada presencia de partículas finas en suspensión, probablemente asociadas al arrastre de sedimentos por las lluvias, lo que podría comprometer la calidad del recurso. Además, se detectó la presencia de fosfatos y nitritos, compuestos que deberían estar ausentes en aguas destinadas a potabilización. En cuanto al hierro, su concentración se encontró ligeramente por encima del límite permitido (82,83). Finalmente, la contaminación biológica y fecal se evidenció con la presencia de coliformes totales en una concentración de 2247 NMP/100 mL y de *E. coli* con un valor de 20 NMP/100 mL. Estos valores se encuentran dentro de lo establecido para aguas crudas según la normativa (82,83); sin embargo, la concentración de coliformes totales resulta elevada y

no es aceptable para actividades recreativas con contacto primario (82). Los resultados detallados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis fisicoquímico y microbiológico realizado a la muestra de agua del Río Alto Ubaté

Parámetro	Resultado	Valor de referencia *
DBO	<2 mg/L	10 mg/L
DQO	<30 mg/L	90 mg/L
SST	<10 mg/L	20 mg/L
pH	7.5	5.0 - 9.0
Turbidez	90.83 NTU	<10 NTU
Dureza	46 mg/L	30-150 mg/L
Cloruros	11.52 mg/L	250 mg/L
Alcalinidad	18 mg/L	200 mg/L
Fosfatos	Positivo	0,5 mg/L / Negativo
Nitritos	Positivo	1 mg/L / Negativo
Nitratos	Negativo	10 mg/L/ Negativo
Sulfatos	<10 mg/L	400 mg/L
Hierro	0.336 mg/L	0.3 mg/L
Grasas y aceites	<5 mg/L	20 mg/L
Coliformes totales	2247 NMP/100mL	20000 NMP/100mL
<i>E. coli</i>	20 NMP/100mL	2000 NMP/100mL

*Valores de referencia establecidos según el Decreto 1594 de junio 26 de 1984 del Ministerio de Agricultura, que regula los usos del agua y los residuos líquidos. Decreto 2105 de julio 26 de 1983 del Ministerio de Salud, referente a la potabilización del agua para consumo humano y la Resolución 0631 del 17 de marzo de 2015 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible para los vertimientos puntuales en agua superficial.

5.1.3 Bacterias identificadas en el Río Alto Ubaté

El crecimiento bacteriano en los medios de cultivo MacConkey y agar sangre se presenta en la Figura 8. En el agar MacConkey se observaron colonias rosadas, redondas y bien definidas, características de bacterias fermentadoras de lactosa, presuntivamente correspondientes a *E. coli* (Figura 8A(a)). También se identificaron colonias de tonalidad amarilla, no fermentadoras de lactosa, compatibles con géneros como *Aeromonas*,

Acinetobacter y *Pseudomonas* (Figura 8A (b-d)). Asimismo, se observaron colonias rosadas, mucoides y redondeadas, también fermentadoras de lactosa, compatibles con el género *Klebsiella* (Figura 8A (e)).

En el agar sangre también se evidenció diversidad morfológica. Se observaron colonias pequeñas, brillantes y sin hemólisis, presuntamente pertenecientes a bacterias Gram positivas del género *Staphylococcus* (Figura 8B (f)). También se encontraron colonias amarillas, pequeñas y opacas, compatibles con *Micrococcus* sp (Figura 8B (h)). Adicionalmente, se identificaron dos tipos más de colonias: unas blancas, pequeñas y opacas; y otras de mayor tamaño, irregulares, rugosas y opacas, presuntamente correspondientes al género *Bacillus* (Figura 8B (g,i)).

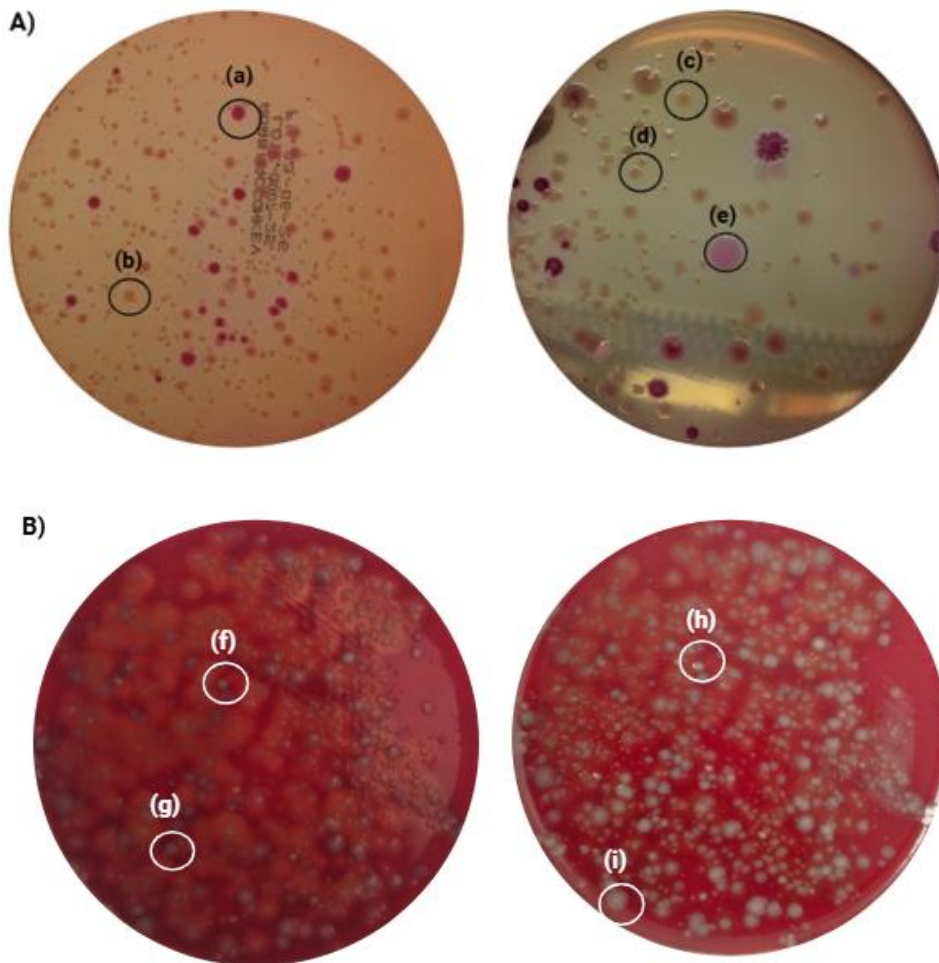


Figura 8. Crecimiento bacteriano masivo en medios de cultivo inoculados con agua del Río Alto Ubaté.

(A) Crecimiento de bacterias Gram negativas en agar MacConkey con morfologías diferenciadas, incluyendo colonias fermentadoras (a, e) y no fermentadoras de lactosa (b, c, d). **(B)** Crecimiento de bacterias Gram positivas en agar sangre con variaciones en color, tamaño, textura y presencia o ausencia de hemólisis (f-i).

Las colonias previamente aisladas fueron identificadas mediante el sistema automatizado MicroScan encontrando bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Aeromonas caviae* (*A. caviae*), *A. Iwoffii*, *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) y bacterias Gram positivas como *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.* y *Staphylococcus sp.* (Figura 9).

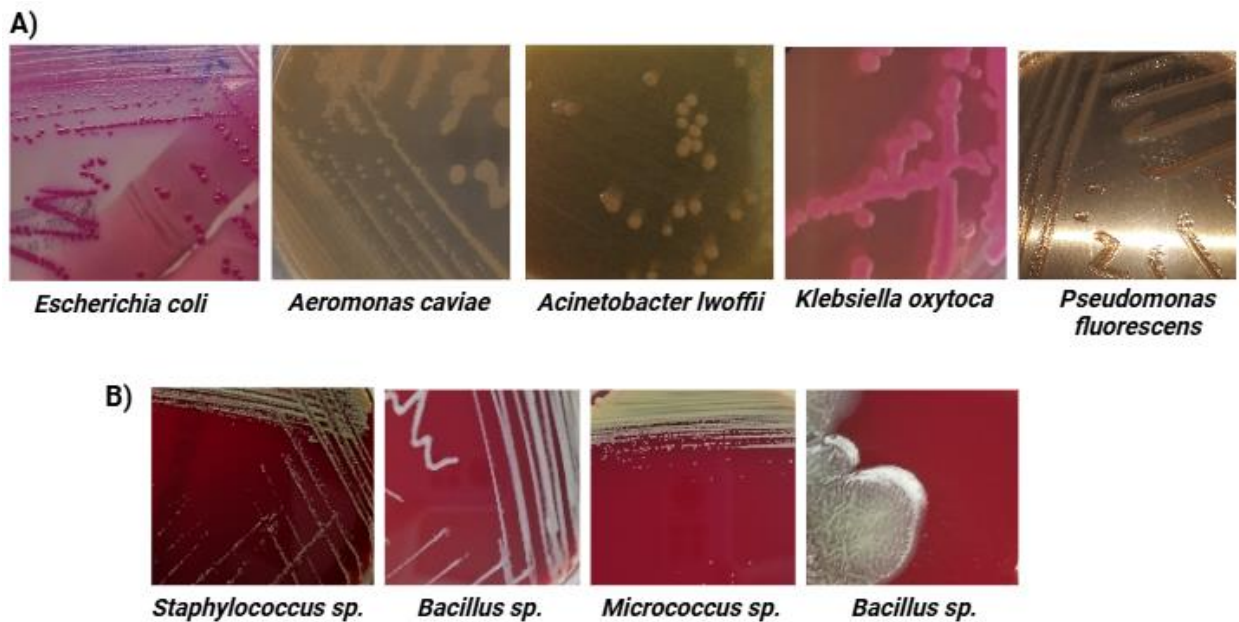


Figura 9. Colonias de aislados bacterianos presentes en el agua del Río Alto Ubaté. Se observan diferencias morfológicas características entre las colonias bacterianas, propias de cada tipo de cultivo, que facilitan su diferenciación y aislamiento. **A)** Bacterias aisladas y cultivadas en agar MacConkey. **B)** Bacterias aisladas y cultivadas en agar sangre.

Los porcentajes de identidad de las bacterias aisladas de la muestra de agua superaron el 97% según la identificación realizada con el sistema MicroScan (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis bacteriano realizado a la muestra de agua del Río Alto Ubaté.

Medio	Bacterias aisladas	% de identidad MicroScan
MacConkey	<i>Escherichia coli</i>	99.99%
	<i>Aeromonas caviae</i>	99.51%
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	99.99%
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.78%
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99.99%
Agar Sangre	<i>Micrococcus sp.</i>	99.99%
	<i>Bacillus sp.</i>	98.53%
	<i>Staphylococcus sp.</i>	98.15%

Se muestra la identificación bacteriana obtenida a partir de MicroScan y el porcentaje de identidad arrojado.

La revisión de la literatura realizada con el fin de determinar el potencial benéfico y patógeno de las bacterias a nivel sanitario y ambiental se presenta en la Tabla 3. El análisis comparativo mostró que algunas de las bacterias Gram negativas aisladas presentan un mayor potencial patogénico en agua (*E. coli*, *A. lwoffii*, *A. caviae*). Este comportamiento se asocia a la presencia de factores de virulencia, así como a su capacidad para desarrollar y diseminar mecanismos de resistencia antimicrobiana (85,86).

Por otro lado, bacterias como *P. fluorescens* y *K. oxytoca*, aunque también son Gram negativas, presentan un bajo potencial patogénico en condiciones ambientales. *P. fluorescens* es reconocida por su papel benéfico en el suelo, donde puede promover el crecimiento vegetal y participar en procesos de biocontrol (87). En cuanto a *K. oxytoca*, si bien puede comportarse como un patógeno oportunista en contextos clínicos, las cepas ambientales no necesariamente poseen los mismos determinantes de virulencia, por lo que su comportamiento patogénico puede ser limitado o ausente (88). Finalmente, según la literatura consultada las bacterias Gram positivas aisladas no mostraron un potencial perjudicial relevante (89,90,91).

De este modo, a partir de la revisión bibliográfica, se reconoce la relevancia sanitaria y ambiental de las bacterias identificadas. Estos microorganismos no solo representan un

riesgo para la salud humana debido a su patogenicidad, sino que también pueden contribuir a una posible diseminación de genes de resistencia en ecosistemas acuáticos (86). De este modo, se decidió enfocar el estudio utilizando las bacterias Gram negativas.

Tabla 3. Potencial benéfico y patógeno de las bacterias aisladas del Río Alto Ubaté en contextos sanitarios y ambientales

Bacteria	Aspectos benéficos	Aspectos patógenos	Ref.
<i>E. coli</i>	<p>Sanitario: Incluye cepas no patógenas que forman parte de la microbiota intestinal normal de los mamíferos, contribuyendo en los procesos digestivos.</p> <p>Ambiental: Ha sido ampliamente utilizada como hospedero en el desarrollo de sistemas de manipulación genética. Gracias a esto, ha facilitado la producción de incontables enzimas que contribuyen en procesos de biorremediación.</p>	<p>Sanitario: Incluye cepas patógenas implicadas comúnmente en infecciones del tracto urinario, bacteriemias y meningitis. Asimismo, comprende seis grupos de cepas enteropatógenas asociadas a cuadros diarreicos: enterohemorrágica, enterotoxigénica, enteropatógena, enteroinvasiva, enteroagregativa y de adherencia difusa.</p> <p>Ambiental: Su presencia y cantidad alertan sobre un riesgo potencial para la salud humana en cuerpos de agua. Pueden influir en la calidad del agua y causar brotes, además se han reportado cepas multirresistentes en el ambiente.</p>	(7), (85), (86)
<i>A. caviae</i>	<p>Sanitario: No se considera parte de la microbiota comensal en humanos y su presencia no necesariamente significa enfermedad, pero sí un riesgo potencial dependiendo de la cepa y estado inmunológico del hospedero.</p> <p>Ambiental: Son microorganismos acuáticos habituales en aguas superficiales, especialmente en ríos. Tienen una alta capacidad de adaptación en ambientes acuáticos y se ha reconocido un potencial de biorremediación de algunos compuestos orgánicos.</p>	<p>Sanitario: Puede causar infecciones en humanos, como septicemia, infecciones de heridas y enfermedades diarreicas, especialmente asociadas al tracto gastrointestinal en niños menores de tres años.</p> <p>Ambiental: Actúa como reservorio de genes de carbapenemasas en aguas residuales y naturales, facilitando la rápida propagación entre bacterias.</p>	(92), (93)
<i>A. lwoffii</i>	<p>Sanitario: Forman parte de la microbiota normal del tracto intestinal y del sistema respiratorio humano.</p>	<p>Sanitario: Es un patógeno zoonótico y oportunista asociado a infecciones nosocomiales. Puede causar infecciones del tracto urinario, en heridas y bacteriemia</p>	(94), (95)

	<p>Ambiental: Son bacterias ubicuas en el ambiente, comúnmente presentes en el agua y el suelo, además, pueden intervenir en la descomposición de materia orgánica.</p>	<p>asociado al uso de catéteres. Ha sido identificado en leche cruda de bovinos con mastitis subclínica.</p> <p>Ambiental: Aunque en ambientes acuáticos se ha reportado una baja prevalencia de resistencia adquirida a antibióticos, algunas especies del género <i>Acinetobacter</i> pueden adquirir y diseminar genes de resistencia a través del agua.</p>	
<i>P. fluorescens</i>	<p>Sanitario: Ha sido detectado en niveles bajos como parte de la microbiota en diversas regiones del cuerpo humano.</p> <p>Ambiental: La importancia radica en su presencia en el suelo y la rizosfera, donde contribuye a la salud y al crecimiento de las plantas gracias a sus propiedades antimicrobianas.</p>	<p>Sanitario: <i>P. fluorescens</i> no se considera un patógeno común en humanos. Sin embargo, aunque es menos virulenta que <i>P. aeruginosa</i>, puede ocasionar bacteriemia asociada al uso de equipos contaminados con soluciones intravenosas, y ha sido aislada en muestras del tracto respiratorio. Además, puede actuar como un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos.</p> <p>Ambiental: Puede adquirir genes de resistencia en ambientes acuático especialmente en aguas contaminadas con residuos hospitalarios y/o agrícolas.</p>	(7), (87)
<i>K. oxytoca</i>	<p>Sanitario: Se puede encontrar en el tracto gastrointestinal de mamíferos.</p> <p>Ambiental: Se ha aislado en fuentes de agua, vegetación y suelos, por lo que no están asociados necesariamente con contaminación fecal y no representan necesariamente un riesgo evidente para la salud.</p>	<p>Sanitario: Tiene potencial patológico especialmente en personas inmunocomprometidas, causando especialmente infecciones urinarias y en heridas.</p> <p>Ambiental: El género puede colonizar superficies interiores de tuberías de agua y tanques de almacenamiento, formando biopelículas.</p>	(7), (85), (88).
<i>Micrococcus sp.</i>	<p>Sanitario: Se consideran saprófitos inofensivos que colonizan o contaminan la piel y las mucosas humanas.</p> <p>Ambiental: Son ubicuos y han sido aislados de fuentes como el suelo y el agua dulce. Su presencia suele estar asociada a materia orgánica y a condiciones propias del entorno</p>	<p>Sanitario: Pueden actuar como patógenos oportunistas en personas inmunosuprimidas, y se han asociado a infecciones como peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal e infecciones relacionadas con catéteres venosos centrales.</p> <p>Ambiental: Presentan bajo riesgo y no se consideran tradicionalmente</p>	(89)

		como bioindicadores de contaminación fecal.	
Bacillus sp.	<p>Sanitario: Algunas cepas son utilizadas como probióticos en humanos.</p> <p>Ambiental: Las cepas ambientales (<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i>) han demostrado ser útiles en la modulación de la calidad del agua, favoreciendo el equilibrio microbiano y contribuyendo a la reducción de patógenos. Son microorganismos comunes en suelos favoreciendo la salud de las plantas y estimulando su crecimiento.</p>	<p>Sanitario: <i>Bacillus anthracis</i> y <i>Bacillus cereus</i> suelen causar infecciones en humanos, la primera es el agente etiológico del ántrax, mientras que <i>B. cereus</i> se asocia principalmente con intoxicaciones alimentarias.</p> <p>Ambiental: Las cepas ambientales suelen ser inofensivas.</p>	(90)
Staphylococcus sp.	<p>Sanitario: Algunas especies de <i>Staphylococcus</i> son consideradas comensales y constituyen parte de la microbiota normal de la piel y las mucosas en humanos.</p> <p>Ambiental: Varias especies del género <i>Staphylococcus</i> aisladas del medio ambiente, como <i>S. haemolyticus</i>, <i>S. saprophyticus</i> y <i>S. xylosus</i>, se destacan por su capacidad para producir biosurfactantes con propiedades de biodegradabilidad.</p>	<p>Sanitario: <i>S. aureus</i> es un patógeno de gran relevancia clínica. Otras especies como <i>S. epidermidis</i>, <i>S. haemolyticus</i> y <i>S. saprophyticus</i> también pueden actuar como agentes etiológicos frecuentes de infecciones en humanos, especialmente en contextos oportunistas o asociados a dispositivos médicos.</p> <p>Ambiental: Algunas cepas pueden formar biopelículas y diseminar genes de resistencia a antimicrobianos en ambientes acuáticos.</p>	(91)

En este contexto, se seleccionaron para los ensayos en *C. elegans* las bacterias *E. coli*, *A. lwoffii*, *A. caviae*, *P. fluorescens* y *K. oxytoca*, dada su relevancia sanitaria y ambiental, así como su potencial como reservorios ambientales de genes de resistencia a antibióticos (92).

5.2 Determinación de los efectos fisiológicos y citotóxicos en el modelo *C. elegans* después de la exposición a las bacterias patógenas en el Río Alto Ubaté

5.2.1 Caracterización fenotípica y fisiológica de la cepa silvestre N2 y transgénica TJ356 de *C. elegans*

Para la caracterización morfológica y fisiológica de las cepas, inicialmente se identificaron los diferentes estadios del desarrollo de *C. elegans* observando que no existen diferencias morfológicas evidentes ni en la duración del ciclo de vida entre el nematodo transgénico TJ356 y el silvestre N2. Posteriormente se evaluaron parámetros fisiológicos como la longevidad.

▪ Longevidad

La longevidad fue monitoreada diariamente, observándose un descenso progresivo en el número de nematodos vivos, con una pérdida de aproximadamente 1 a 2 larvas por día, atribuible al proceso de senescencia natural. La cepa transgénica TJ356 presentó una longevidad promedio de 18 días, significativamente menor en comparación con la cepa silvestre N2, que alcanzó una media de 21 días ($P = 0,0078$) (Figura 10).

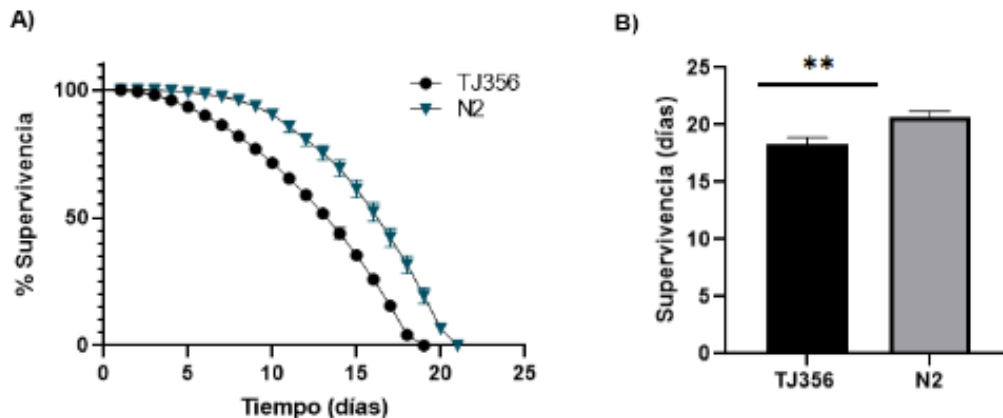


Figura 10. Curva de longevidad de *C. elegans* TJ356 y N2 bajo condiciones óptimas de alimentación y temperatura. Longevidad de la cepa transgénica TJ356 y cepa silvestre N2, bajo alimentación con *E. coli* OP50 y a temperatura de 20°C. **A)** Curva de supervivencia de Kaplan Meier con análisis Log-rank test con una significancia estadística de $P < 0,0001$ **B)** Las barras representan medias \pm DE. Se realizó t-test mostrando una significancia estadística de $**P = 0,0078$. Realizado con GraphPad Prism 8.0.2. El ensayo se realizó por triplicado.

▪ Reproducción

Se observó que, durante el ciclo reproductivo la cepa transgénica TJ356 alimentada con *E. coli* OP50, presentó un tamaño medio de cría de 179 larvas. Este valor representa una disminución del 20% en comparación con la cepa silvestre N2, que mostró una media de 225 larvas eclosionadas (96). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0,0001$) y se ilustra en la Figura 11.

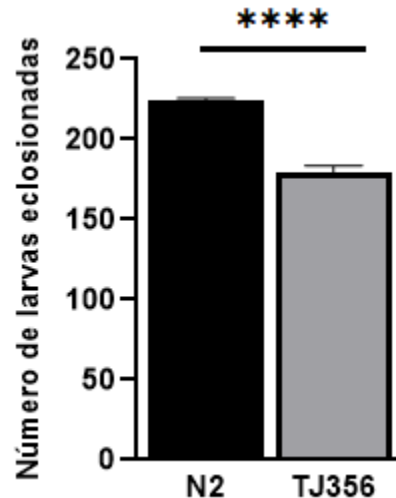


Figura 11. Reproducción de *C. elegans* TJ356 y N2 bajo condiciones óptimas de alimentación y temperatura. Comportamiento reproductivo de la cepa silvestre N2 y la cepa transgénica TJ356 de *C. elegans* alimentada con *E. coli* OP50. Se realizó t-test mostrando una significancia estadística de **** $P < 0,0001$. Realizado con GraphPad Prism 8.0.2. El ensayo se realizó por triplicado.

▪ Expresión y localización de DAF-16

Finalmente, para verificar que la cepa transgénica contara con la proteína DAF-16 completamente funcional, se evaluó la localización antes de realizar los ensayos fisiológicos y citotóxicos. Observándose una translocación al núcleo tras la exposición de la cepa TJ356 a estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno a 11 mM y una localización citosólica al mantener la cepa bajo condiciones normales de alimentación con *E. coli* OP50 (Figura 12).

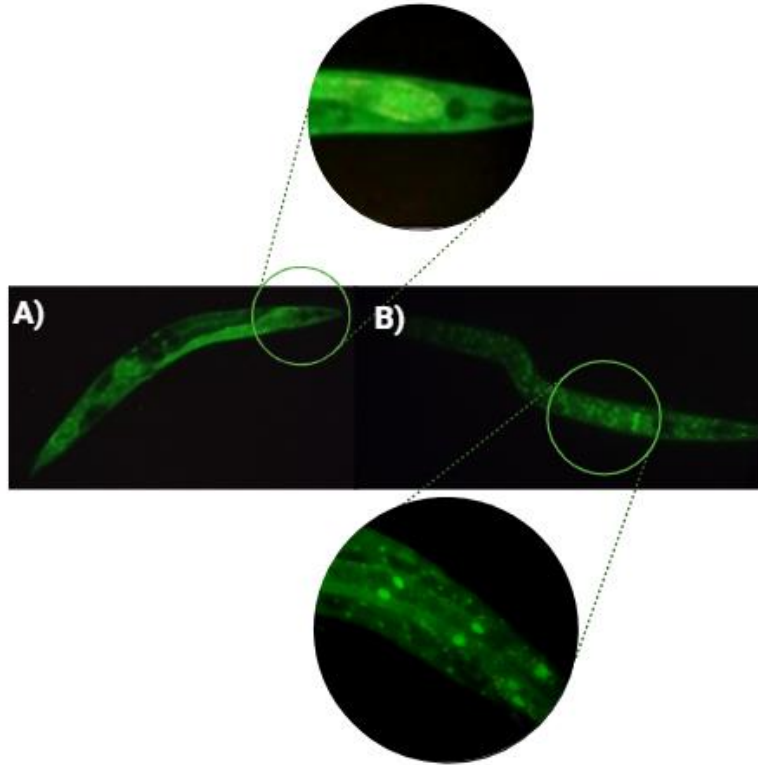


Figura 12. Localización de la proteína DAF-16 en la cepa TJ356. Localización de la proteína DAF-16 **A)** Localización citosólica. **B)** Localización nuclear. Fotografías del autor.

5.2.2 Viabilidad de la cepa N2 frente las cepas bacterianas Gram negativas seleccionadas

Al determinar la viabilidad de la cepa silvestre N2 frente a las bacterias seleccionadas se encontró que el grupo control conformado por nematodos alimentados con *E. coli* OP50, presentó una longevidad media de 21 días (Figura 10). La exposición a *K. oxytoca*, *P. fluorescens* y *A. caviae* resultó en longevidades medias de 21, 20 y 19 días, respectivamente, sin diferencias significativas respecto al control. En contraste, los nematodos alimentados con *E. coli* y *A. lwoffii* presentaron una longevidad media de 15 días, lo que representó una disminución significativa en comparación con el grupo control ($P < 0,001$), como se muestra en la Figura 13.

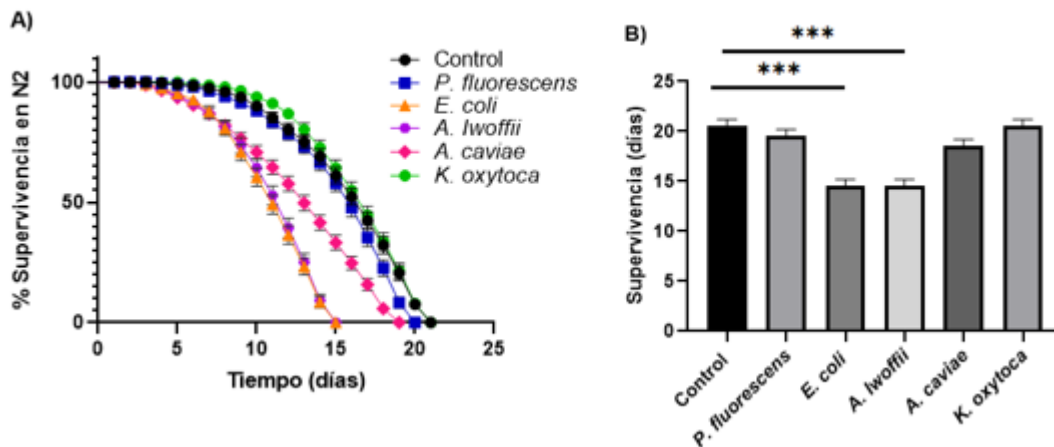


Figura 13. Curva de longevidad de *C. elegans* N2 frente a las cepas bacterianas Gram negativas seleccionadas. Se muestra el efecto de la exposición a diferentes cepas bacterianas aisladas del Río Alto Ubaté y cepas de referencia (*E. coli* OP50 como control) sobre la longevidad de nematodos de tipo silvestre N2. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 8.0.2 **A)** Curva de Kaplan Meier con análisis Log-rank con una significancia estadística en la supervivencia de $P < 0,0001$ en relación con el análisis general de los datos. **B)** Las barras representan medias \pm DE. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los grupos alimentados con *E. coli* y *A. lwoffii* en comparación con el control mediante Test Dunnett con *** $P = 0,0006$.

Las bacterias *E. coli* y *A. lwoffii*, previamente aisladas del Río Alto Ubaté, fueron seleccionadas para el ensayo de longevidad en la cepa transgénica TJ356, ya que en el ensayo de longevidad con la cepa silvestre N2 mostraron una reducción significativa en la vida media del nematodo al ser utilizadas como fuente de alimento, en comparación con el control estándar *E. coli* OP50 (Figura 13).

Adicionalmente, ambas especies presentan una relevancia sanitaria y ambiental, ya que han sido asociadas a infecciones humanas, incluyendo cuadros nosocomiales y enfermedades gastrointestinales, y poseen el potencial de adquirir y diseminar genes de resistencia antimicrobiana (85).

5.2.3 Efectos fisiológicos y citotóxicos de la cepa transgénica TJ356 de *C. elegans* cuando es alimentada con *E. coli* y *A. lwoffii*

Los análisis fisiológicos y citotóxicos se realizaron en la cepa TJ356, con el objetivo de evaluar los efectos en el nematodo al ser alimentado con las bacterias *E. coli* y *A. lwoffii*

▪ Longevidad

La cepa TJ356 alimentada con *E. coli* presentó una longevidad media de 15 días, mientras que con *A. lwoffii* fue de 16 días, ambos valores significativamente menores ($P < 0,0001$) en comparación con el grupo control alimentado con *E. coli* OP50, que mostró una longevidad media de 18 días (Figura 14).

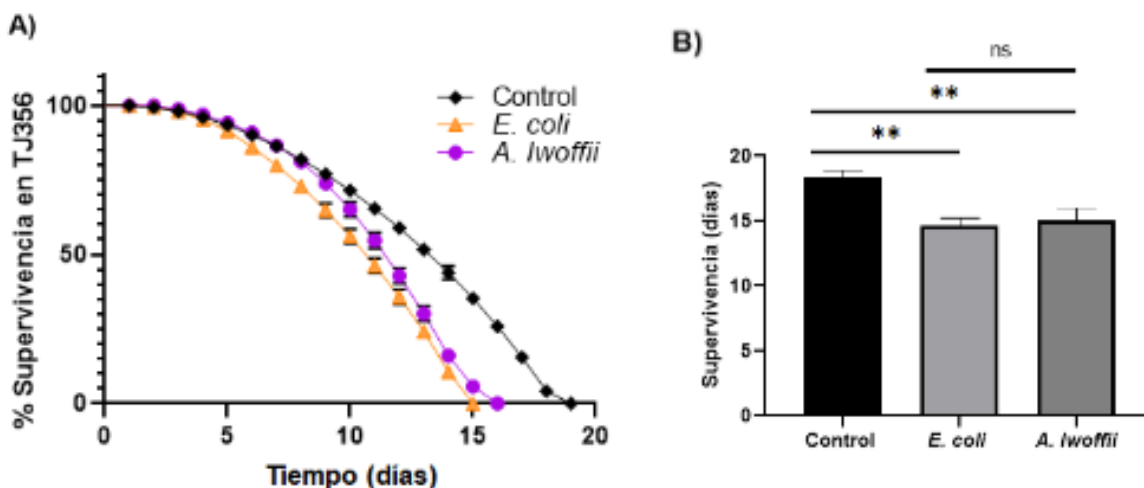


Figura 14. Curva de longevidad de *C. elegans* TJ356 al ser alimentada con bacterias aisladas del Río Alto Ubaté. Efecto de la longevidad de *C. elegans* TJ356 al ser alimentada con las bacterias *E. coli* y *A. lwoffii* aisladas del Río Alto Ubaté y cepa de referencia (*E. coli* OP50 como control). El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 8.0.2 **A)** Curva de Kaplan Meier con análisis Log-rank con una significancia estadística de **** $P < 0,0001$ en relación con el análisis general de los datos. **B)** Las barras representan medias \pm DE. Se encontró significancia estadística en comparación con el control mediante Test Tukey con ** $P = 0,0023$ para *E. coli* y ** $P = 0,0037$ para *A. lwoffii*. No hubo diferencia significativa entre *E. coli* y *A. lwoffii*. El ensayo se realizó por triplicado.

Estos resultados sugieren que ambas cepas bacterianas de *E. coli* y *A. lwoffii* ejercen un efecto negativo sobre la longevidad de *C. elegans* TJ356 cuando son utilizadas como fuente de alimento. En concordancia con los ensayos de longevidad realizados con la cepa silvestre N2.

▪ Reproducción

Los resultados de reproducción se muestran en la Figura 15, los nematodos TJ356 alimentados con *E. coli* y *A. lwoffii* tuvieron un tamaño de cría medio de 141 y 119 larvas respectivamente. Observándose una disminución estadísticamente significativa en comparación con el grupo control alimentado con *E. coli* OP50 con tamaño de cría medio de 179 larvas eclosionadas (Figura 11). Las bacterias *E. coli* y *A. lwoffii* disminuyeron el tamaño de cría en un 21% y 33% respectivamente, en comparación con el control alimentado con *E. coli* OP50 ($P < 0,0001$).

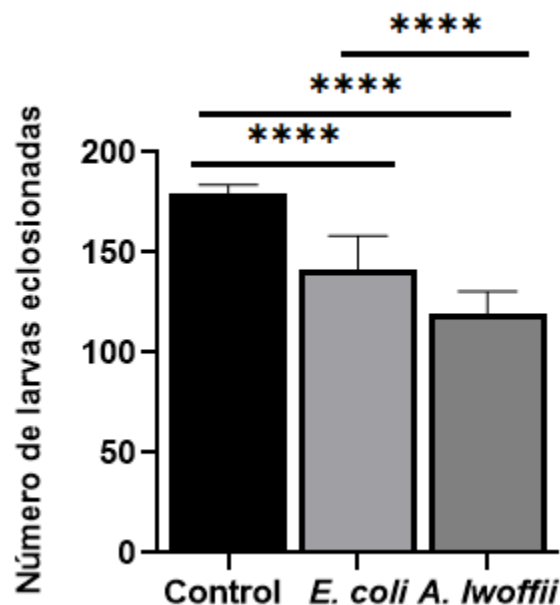


Figura 15. Reproducción de *C. elegans* TJ356 al ser alimentada con bacterias aisladas del Río Alto Ubaté. Se evidencia el efecto de la alimentación con *E. coli* y *A. lwoffii* sobre la reproducción de *C. elegans* cepa TJ356. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 8.0.2. Se aplicó un ANOVA One-way, que mostró una diferencia altamente significativa entre los grupos ($P < 0,0001$). Las barras representan medias \pm DE. La prueba post hoc de Tukey reveló diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control, con **** $P < 0,0001$ tanto para los nematodos alimentados con *E. coli* como para los alimentados con *A. lwoffii*. Asimismo, se observó una diferencia significativa entre los grupos alimentados con *E. coli* y *A. lwoffii* (**** $P < 0,0001$). El ensayo se realizó por triplicado.

Los resultados obtenidos en el ensayo de reproducción con la cepa TJ356 sugieren que la exposición a *E. coli* y *A. lwoffii* pueden inducir alteraciones fisiológicas que comprometen procesos clave como la fertilidad o viabilidad embrionaria.

- **Expresión y localización de DAF-16**

Al analizar la expresión y localización subcelular de DAF-16 en los nematodos transgénicos alimentados con *E. coli*, se observó que el factor de transcripción permanecía predominantemente en el citosol en su forma inactiva (Figura 16C) en un 87% de los nematodos (Figura 16E). Mientras que, en aquellos alimentados con *A. lwoffii*, se evidenció una translocación nuclear del factor de transcripción (Figura 16D) en un 80% de los nematodos observados (Figura 16E).

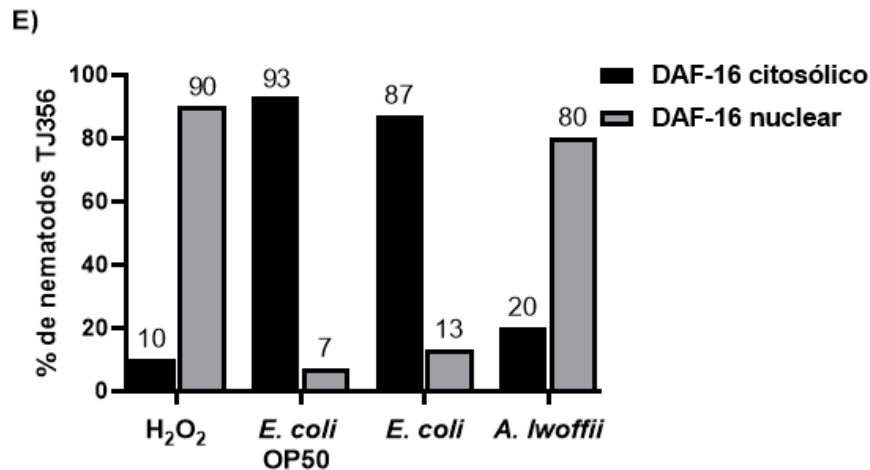
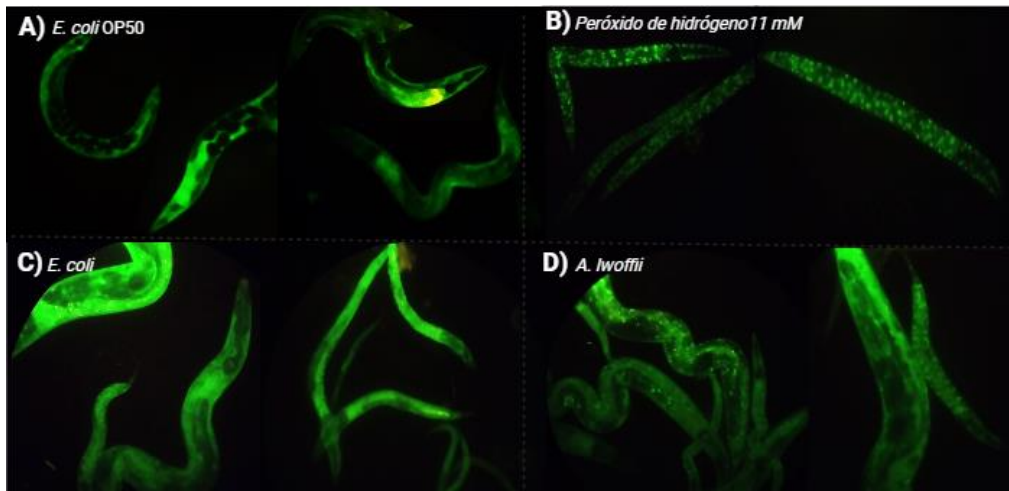


Figura 16. Localización de DAF-16 en *C. elegans* TJ356 al ser alimentada con bacterias aisladas del Río Alto Ubaté. Se muestra la localización de DAF-16 en los nematodos TJ356 bajo las siguientes condiciones: A) alimentados con *E. coli* OP50 (control negativo), B) tratados con peróxido de hidrógeno a 11 mM (control positivo), C) alimentados con *E. coli*, y D) alimentados con *A. lwoffii*. E) Se evaluó el porcentaje de nematodos con DAF-16 localizado en el núcleo versus el citoplasma en cada grupo experimental. El análisis estadístico se realizó mediante prueba de Chi-cuadrado, evidenciando diferencias altamente significativas entre los grupos ($P < 0,0001$). El ensayo se realizó por triplicado.

Estos resultados sugieren que *C. elegans* detecta un entorno desfavorable cuando es alimentado con *A. lwoffii* y responde activando rutas de defensa celular como la vía de señalización similar a la insulina (DAF-16); por el contrario, se sugiere que cuando el nematodo es alimentado con *E. coli* podría estar respondiendo mediante rutas alternativas sin activar mecanismos de defensa celular.

- **Producción de especies reactivas de oxígeno**

El análisis de la producción de ROS en la cepa transgénica alimentada con las bacterias seleccionadas se muestra en la Figura 17, en donde se observa una disminución estadísticamente significativa en la fluorescencia del reactivo DCF, indicativa de una menor producción de ROS en los nematodos alimentados con *E. coli* y *A. lwoffii* con una media de 42 URF y 81 URF respectivamente en comparación con el control negativo alimentado con *E. coli* OP50 con media de 652 URF y el control positivo tratados con peróxido de hidrógeno 11 mM con media de 2117 URF ($P < 0,0001$).

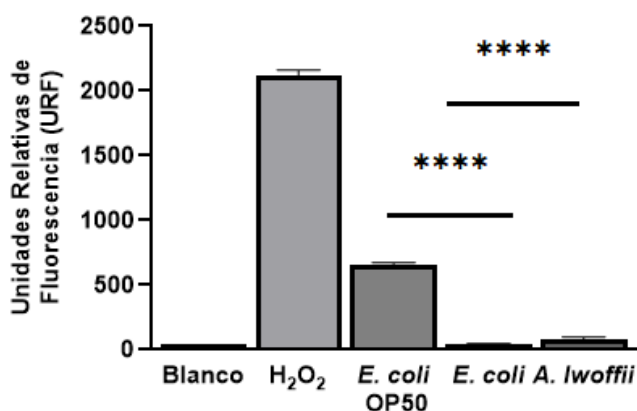


Figura 17. Producción de ROS en *C. elegans* TJ356 al ser alimentada con bacterias aisladas del Río Alto Ubaté. Se muestran los ensayos de estrés oxidativo en *C. elegans* TJ356 cuando es alimentado con *E. coli* y *A. lwoffii*. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 8.0.2. Se aplicó un ANOVA One-way, que mostró una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,0001$). Las barras representan medias \pm DE. La prueba post hoc de Dunnett reveló diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control, con **** $P < 0,0001$ tanto para *E. coli* como para *A. lwoffii*. El ensayo se realizó por triplicado.

La reducción significativa en la fluorescencia del reactivo DCF en los nematodos indica que la exposición a *E. coli* y *A. lwoffii* no induce niveles elevados de estrés oxidativo, lo que sugiere que estas bacterias no generan necesariamente una respuesta de tipo oxidativo en los nematodos.

6. Discusión

La contaminación bacteriana en ríos a nivel mundial representa una amenaza para la salud pública y los ecosistemas acuáticos (1), ya que la presencia de bacterias patógenas, no solo comprometen la calidad del agua, sino que también alteran el equilibrio biológico del hábitat, afectando organismos acuáticos e incrementando el riesgo de transmisión de enfermedades entéricas en poblaciones aledañas que dependen de estos cuerpos de agua para actividades de consumo, uso doméstico, recreativo, agrícola e incluso industrial (3)

En este contexto, el presente estudio se enfocó en identificar bacterias contaminantes con potencial patogénico presentes en el punto conocido como “El Guacal”, ubicado en el Río Alto Ubaté. Este sitio fue considerado representativo debido a su ubicación aguas abajo del municipio de Carmen de Carupa, desde donde se vierten aguas residuales domésticas, así como descargas provenientes de actividades mineras y de empresas lácteas rurales (70). Además, la cuenca se ve impactada por prácticas agrícolas intensivas, como el cultivo de papa, hortalizas, arveja y cebada, junto con una significativa actividad ganadera, lo que favorece el arrastre de nutrientes, residuos orgánicos y microorganismos hacia el cauce. El entorno también presenta urbanización, y aguas abajo se capta el recurso hídrico para abastecer la planta de potabilización del municipio de Ubaté. Adicionalmente, la accesibilidad del área lo convierte, en un sitio usado para actividades recreativas, lo cual resalta la importancia de evaluar su calidad (70).

Estudios previos sobre la calidad fisicoquímica del Río Alto Ubaté, como el realizado por la CAR en 2020 (3), evidencian que los valores de DBO, pH, cloruros y nitratos presentan un alto porcentaje de cumplimiento en los puntos monitoreados, ubicándose dentro de los rangos establecidos por la Resolución 3462 de 2009 (4). Estos resultados son concordantes con los hallazgos del presente estudio, en el cual la DBO se encontró en el rango favorable, mientras que el pH registrado se aproxima a la neutralidad y muestra correlación con los valores de alcalinidad observados. Asimismo, la ausencia de nitratos y las bajas concentraciones de cloruros y sulfatos coinciden con lo reportado por la CAR,

donde el 100 % de los puntos evaluados cumplieron los objetivos de calidad establecidos para estos parámetros (3).

En contraste con los informes de la CAR (3), en los que los sólidos suspendidos totales no alcanzaron los niveles de cumplimiento durante el período de monitoreo, en el presente estudio se registraron valores óptimos para este parámetro. Sin embargo, se observó una turbidez considerablemente elevada, lo cual sugiere la presencia significativa de materia orgánica disuelta y una alta carga de partículas finas en suspensión, posiblemente derivadas de descargas domésticas y actividades agropecuarias en la cuenca. Por otro lado, mientras que los informes de la CAR entre 2016 y 2019 (3) no reportaron presencia de nitritos en los puntos de monitoreo, en el presente estudio sí se detectaron, lo que podría estar relacionado con la actividad metabólica bacteriana derivada de la contaminación orgánica del cuerpo de agua (74).

De manera similar, informes previos han reportado niveles críticos de coliformes totales en el Río Alto Ubaté (3,6), con un bajo cumplimiento respecto a los límites establecidos por la normativa (4). En concordancia, los valores encontrados en este estudio sugieren que, si bien el agua puede destinarse a uso doméstico y humano con previa potabilización mediante tratamiento convencional, así como a uso agrícola, no resulta apta para fines recreativos con contacto primario, dado que supera las concentraciones permitidas (82). En este contexto, el monitoreo de la presencia o aumento de las bacterias en recursos hídricos adquiere importancia, dado que muchas comunidades dependen directamente de estas fuentes para múltiples usos y su presencia representa un riesgo, al estar asociada con enfermedades relacionadas con el uso del agua contaminada (7).

A nivel latinoamericano, la región concentra cerca de un tercio del agua dulce mundial; sin embargo, se enfrenta a limitaciones relacionadas con el acceso a agua potable y deficiencias en la gestión del recurso hídrico. La combinación de contaminación microbiológica, deficiencias en infraestructura de tratamiento y actividades humanas no reguladas ha contribuido con la baja calidad hídrica. Como lo evidencia Cuenca et al. en el 2025, la mala calidad del agua destinada al consumo humano contribuye a la propagación de enfermedades transmitidas por el agua (97). En Brasil, Ecuador y

Colombia en el Valle Medio de Magdalena, se han detectado niveles altos de metales pesados como cadmio, níquel y plomo, así como la presencia de coliformes totales y fecales, lo que evidencia una problemática sanitaria y ambiental (97).

En la caracterización microbiológica de fuentes hídricas, es fundamental diferenciar entre la presencia ambiental habitual de microorganismos y aquellos que pueden ser utilizados como indicadores fiables de contaminación. Diversos estudios han demostrado que tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas pueden hallarse en cuerpos de agua debido a procesos de escorrentía superficial o por el impacto de actividades antropogénicas, como los vertimientos de residuos domésticos, agrícolas, ganaderos y mineros (3,7).

Las bacterias Gram positivas, como *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.* y *Staphylococcus sp.*, a pesar de su capacidad para colonizar ambientes acuáticos, no se consideran tradicionalmente como marcadores de contaminación fecal. Su presencia suele estar asociada a materia orgánica y a condiciones propias del entorno, y no necesariamente a eventos de contaminación reciente o relevante desde el punto de vista sanitario (88–90). Esta consideración ha sido respaldada en otros trabajos, en los que se sugiere que su valor como marcadores microbiológicos es limitado, especialmente cuando el objetivo es identificar focos de contaminación fecal o evaluar riesgos para la salud pública (7,85).

En contraste, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), una bacteria comensal del tracto gastrointestinal humano, es ampliamente reconocida como un indicador de contaminación fecal debido a su resistencia y mayor capacidad de supervivencia en ambientes acuáticos, como lo señala Ríos et al. en 2017 (7). En este estudio, la ausencia de aislamiento de *E. faecalis* sugiere que la contaminación presente en el Río Alto Ubaté podría corresponder a eventos recientes o transitorios, más que a una carga fecal sostenida en el tiempo. En consecuencia, las bacterias Gram positivas detectadas no fueron consideradas en el análisis final como indicadores fiables de deterioro en la calidad del agua ni como reflejo de un riesgo ambiental relevante, en concordancia con lo reportado por otros autores (85).

Por otro lado, las bacterias Gram negativas como *E. coli* resulta significativa debido a que, esta especie ha sido establecida como un bioindicador de contaminación fecal reciente, según el Decreto 1575 de 2007 del Ministerio de la Protección Social (98). La presencia de *E. coli* en fuentes hídricas superficiales ha sido documentada ampliamente en la literatura científica, tanto en contextos rurales como urbanos, lo que refuerza su utilidad como marcador clave para la evaluación de riesgos sanitarios. Estudios como los de McLellan (99) y Widmer et al. (100) coinciden en señalar que la detección de este microorganismo es crucial para determinar el impacto que el uso del agua de estas fuentes representa para la salud pública. (100)

Adicionalmente, en este análisis se identificaron otras bacterias Gram negativas tales como *P. fluorescens*, *A. lwoffii* y *K. oxytoca*. Estos hallazgos coinciden con los reportados por Najjembe et al. en 2025 (101), quienes documentaron la presencia de géneros similares en muestras de agua de tanques de almacenamiento doméstico y agua de red municipal. Estas bacterias, ampliamente reconocidas como patógenos oportunistas, habitan habitualmente en el ambiente acuático, y su detección no necesariamente implica contaminación fecal. Sin embargo, su potencial patogénico es relevante, ya que pueden ocasionar enfermedades transmitidas por el agua (85). De este modo, la detección de estos microorganismos junto con genes de resistencia antimicrobiana en fuentes hídricas constituye una preocupación de salud pública, lo que subraya la necesidad de un monitoreo constante y de mejoras en los procesos de tratamiento de agua, a fin de mitigar la propagación de cepas potencialmente resistentes y patógenas (101).

En consecuencia, en este estudio se empleó el nematodo *C. elegans*, como modelo biológico para evaluar los efectos de contaminantes de origen bacteriano presentes en el Río Alto Ubaté, dado que, ha sido ampliamente utilizado en bioensayos de toxicidad en ecosistemas desde 1990 por Williams y Dusenbery (102), gracias a su alta sensibilidad, su homología genética con organismos superiores y a su sencillez experimental, que facilita su manejo y análisis (40).

La evaluación de la longevidad en la cepa silvestre N2 expuesta a las bacterias Gram negativas reflejó que la exposición a *P. fluorescens* no redujo de manera significativa la

esperanza de vida del nematodo, resultado que contrasta con lo reportado por Neidig et al. en 2018 (103), quienes describieron que algunas cepas de *P. fluorescens* pueden repeler y causar mortalidad en nematodos N2. Por otro lado, en línea con los hallazgos del presente trabajo, Kissoyan et al. en 2019 (104) encontraron que ciertas cepas de *P. fluorescens* podían proteger al nematodo frente a infecciones por patógenos. Estas diferencias podrían atribuirse a las cualidades nutricionales y metabólicas de cada aislamiento de *Pseudomonas*, lo que sustenta la idea de que la composición bacteriana modula procesos fisiológicos de *C. elegans*, incluyendo desarrollo y longevidad (15,40). Asimismo, *K. oxytoca* y *A. caviae* en estudios previos mostraron menor virulencia en comparación con otras especies del género *Aeromonas*, reflejando mayores tasas de supervivencia del nematodo expuesto (105,106), lo que coincide con los resultados de este estudio, donde no se observó un efecto negativo en la supervivencia de la cepa N2.

La cepa TJ356 ha sido descrita como más longeva y resistente al estrés (40), sin embargo, la salud y supervivencia de los nematodos dependen críticamente de su fuente bacteriana de alimento (15). Los resultados del trabajo con la cepa TJ356 permitió evaluar el impacto fisiológico de bacterias posiblemente patógenas aisladas del Río Alto Ubaté sobre variables clave como longevidad, reproducción, producción de ROS y translocación de DAF-16.

Los resultados evidenciaron que la exposición a *E. coli* y *A. Iwoffii* redujo significativamente tanto la esperanza de vida como el tamaño de la progenie de los nematodos en comparación con el control alimentado con *E. coli* OP50. Este hallazgo concuerda con reportes que señalan que la exposición a ciertas bacterias ambientales puede inducir toxicidad y afectar negativamente al nematodo (16). En particular, Deng et al. en 2021 (16) y Miyata et al. en 2008 (107), describen la capacidad de cepas ambientales como *Acinetobacter* y *E. coli* para generar efectos adversos sobre la supervivencia y reproducción en *C. elegans*, lo que respalda el uso de este modelo como bioindicador toxicológico ambiental. Sin embargo, la producción de ROS detectada se mantuvo baja tras la exposición a estas bacterias, en contraste con estudios previos donde algunas cepas de *A. Iwoffii* indujeron altos niveles de estrés oxidativo (16).

Esta diferencia puede explicarse por la distinta capacidad de algunas bacterias para regular ROS (56,108). En el presente estudio, la cepa control *E. coli* OP50 indujo niveles más altos de ROS en *C. elegans* TJ356 en comparación con las bacterias ambientales *E. coli* y *A. lwoffii*. Este resultado, aunque contradictorio, puede explicarse por las características metabólicas de OP50, que es nutricionalmente limitada y confiere mayor sensibilidad al estrés oxidativo en el nematodo, posiblemente debido a una alteración mitocondrial, lo que resulta en una acumulación mayor de ROS, de acuerdo con Revtovich et al. en 2019 (109) y Crawford et al. en 2021 (110).

En contraste, las dos bacterias ambientales *E. coli* y *A. lwoffii*, mostraron una disminución en la producción de ROS en el nematodo, coherente con lo descrito por Schifano et al. en 2019 (108) quienes propusieron que dichas bacterias podían neutralizar eficazmente los ROS mediante la expresión de enzimas antioxidantes propias, como catalasas, superóxido dismutasas y peroxidasas (111,112). Además, la activación de factores de transcripción del nematodo, como DAF-16, induce genes antioxidantes como *sod-3*, *ctl-1* y *gst-4*, reforzando una respuesta protectora que atenúa la acumulación intracelular de ROS (113). Gracias a estos mecanismos, estas bacterias patogénicas pueden resistir el ataque oxidativo y colonizar de manera eficiente el intestino del nematodo, alterando la homeostasis intestinal y provocando efectos fisiológicos negativos, incluyendo reducción de longevidad y capacidad reproductiva, asociados con genes de virulencia (16,108,111)

Esta modulación antioxidante no siempre resulta beneficiosa para el hospedero, ya que algunos patógenos, al resistir o disminuir la producción de ROS, facilitan la colonización intestinal, favoreciendo la persistencia bacteriana y contribuyendo a su potencial de patogenicidad (16,108). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la menor producción de ROS observada con las bacterias ambientales podría reflejar un estrés de tipo no oxidativo o un mecanismo de evasión inmunológica, que permite la colonización sostenida del intestino del nematodo.

Por otra parte, la evaluación de la translocación nuclear de DAF-16 se observó de forma específica frente a *A. lwoffii*, pero no con *E. coli*, lo que sugiere la existencia de rutas de respuesta al estrés distintas y no exclusivamente dependientes de ROS (114). Esto coincide con observaciones en otras muestras de agua ambiental, donde se evidenció la

activación de genes diana de DAF-16 sin una inducción aparente de ROS, según lo reportado por Xiao et al. (15), lo que respalda la capacidad de DAF-16 para responder a múltiples estímulos (107). Aunque tradicionalmente el estrés oxidativo se considera un estímulo clave para su activación, Kenyon en 2010 también señala otros factores capaces de desencadenar su actividad, como la restricción dietética, la pérdida de células germinales o la inhibición de la respiración (115).

Asimismo, se ha documentado que DAF-16 puede activarse en respuesta a infecciones por patógenos específicos, lo que sugiere que la inmunidad mediada por este factor de transcripción podría desencadenarse a partir de señales específicas del agente infeccioso (114). No obstante, se sugiere que la infección por ciertos patógenos, a pesar de causar estrés o daño, no necesariamente desencadena la activación típica de DAF-16 (115) como se evidenció en la respuesta de TJ356 frente a *E. coli*. De hecho, en 2010 Irazoqui et al. revela casos en los que la vía de DAF-16 no se activa o no resulta necesaria durante la infección (114). Por ejemplo, en gusanos infectados con *P. aeruginosa* o *S. aureus*, incluso en etapas avanzadas con daño tisular evidente, DAF-16 permanece inactivo en el citoplasma y no se transloca al núcleo debido a la supresión de la respuesta por parte del microorganismo de origen bacteriano (114).

En contraste, Evans et al. (116) demostraron que esta inhibición no se observó con *S. typhimurium* o *E. faecalis*, lo que permitió la localización nuclear de DAF-16 y, con ello, una posible capacidad protectora para el nematodo (116). Sin embargo, se debe considerar que la translocación nuclear de DAF-16 inducida por un estímulo estresante no siempre se correlaciona con una mayor resistencia al estrés o una prolongación de la longevidad; incluso, una acumulación nuclear intensa puede relacionarse con una menor resistencia al estrés y con una vida más corta, como sugiere la evidencia en 2017 por Urban et al. (117).

Asimismo, otros estudios han sugerido que la respuesta al estrés inducida por ciertos patógenos podría estar mediada por vías independientes de DAF-16, como la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) descrita en *C. elegans* por Irazoqui et al. en 2010 (118). En este sentido, *C. elegans* presenta diversos mecanismos de respuesta frente a la infección, involucrando múltiples rutas de señalización, entre ellas la vía NSY-

1-SEK-1-PMK-1, que actúa como un componente esencial de la respuesta inmune frente a diversos patógenos bacterianos y toxinas formadoras de poros. La existencia de estas vías paralelas —PMK-1, BAR-1, DAF-16, FSHR-1, CED-1/UPR—, muchas de las cuales muestran especificidad frente a patógenos particulares. Esto sugiere que *C. elegans* ha desarrollado estrategias de inmunidad innata complejas, no dependientes exclusivamente de un solo factor. (118)

En conjunto, los resultados observados podrían explicarse por diferencias en las cepas bacterianas, su grado de virulencia o la activación de mecanismos de toxicidad independientes de ROS, pero que igualmente impactan parámetros fisiológicos relevantes, como la reproducción y la longevidad. Estas observaciones ponen de manifiesto la complejidad de las interacciones hospedero - microbio y la alta variabilidad en las respuestas del nematodo frente a distintos estresores bacterianos ambientales (25,64).

7. Conclusiones

- Se evidenció la presencia de microorganismos Gram negativos relevantes, como *E. coli*, *P. fluorescens*, *A. Iwoffii*, *A. caviae* y *K. oxytoca*, en el punto de muestreo “El Guacal” del Río Alto Ubaté, asociada con vertimientos domésticos, agropecuarios e industriales. Estos hallazgos coinciden con estudios previos y confirman la contaminación microbiológica del tramo, representando un riesgo potencial para la salud pública y el equilibrio ecológico de la zona.
- Se observó que la exposición a *E. coli* y *A. Iwoffii* generó una disminución significativa en la longevidad y la capacidad reproductiva de los nematodos TJ356, sin un incremento proporcional en la producción de ROS, lo que sugiere mecanismos de toxicidad independientes del estrés oxidativo. Adicionalmente, se detectó la translocación nuclear de DAF-16 en respuesta a *A. Iwoffii*, mientras que con *E. coli* no se observó, destacando la complejidad de la regulación de rutas de respuesta en el modelo.
- Los resultados respaldan el uso de *C. elegans* TJ356 como un bioindicador ambiental sensible, capaz de evidenciar efectos fisiológicos y citotóxicos ante la exposición a bacterias contaminantes presentes en cuerpos de agua. Esto refuerza su aplicabilidad como herramienta para la vigilancia ecotoxicológica de fuentes hídricas.

8. Recomendaciones

Con el fin de dar continuidad y fortalecer los alcances de esta investigación, se proponen las siguientes líneas de trabajo a futuro:

- Ampliar el muestreo espacial y temporal a lo largo de la cuenca del Río Ubaté, considerando los distintos usos del suelo, para realizar un análisis microbiológico integral que permita comparar la calidad del agua entre tramos y épocas del año.
- Fortalecer el análisis microbiológico mediante técnicas moleculares y bioensayos con *C. elegans* TJ356, evaluando la letalidad, la relación dosis-respuesta, la resistencia antimicrobiana de las cepas, y empleando cepas mutantes y modelos alternativos para precisar las rutas de respuesta involucradas.
- Promover el uso de *C. elegans* como bioindicador ambiental y fomentar la educación y participación comunitaria, impulsando prácticas responsables para reducir la presión contaminante sobre los recursos hídricos del Río Alto Ubaté.
- Integrar los resultados del monitoreo microbiológico y bioensayos, en herramientas de gestión ambiental, como sistemas de alerta temprana, mapas de riesgo hídrico o planes de saneamiento básico, para apoyar la toma de decisiones por parte de autoridades locales y entidades ambientales.

Apropiación Social del Conocimiento y/o publicaciones

Publicaciones:

- Libro: *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental: Aportes desde la investigación en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Contribución con el Capítulo 3: *C. elegans* en investigación ambiental de la UCMC.

Aceptado para publicación con concepto favorable por parte del sello editorial de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Presentaciones en eventos:

- Ponencia del trabajo titulado: “*Evaluación de la contaminación bacteriana del Río Alto Ubaté sobre la cepa transgénica TJ356 de Caenorhabditis elegans como bioindicador ecotoxicológico*”, en el XII Encuentro Institucional de Grupos de Investigación y XV Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación llevado a cabo el 22,23 y 24 de octubre de 2025 en la UCMC.
- Ponencia del trabajo titulado: “*Evaluación de la contaminación bacteriana del Río Alto Ubaté sobre la cepa transgénica TJ356 de Caenorhabditis elegans como bioindicador*” en la XI Jornada Distrital de Epidemiología y Salud Pública 2025 llevado a cabo el 22,23 y 24 de octubre de 2025 en el Centro de Convenciones Ágora, Bogotá.
- Ponencia del trabajo titulado: “*Evaluación de la contaminación bacteriana del Río Alto Ubaté sobre la cepa transgénica TJ356 de Caenorhabditis elegans como bioindicador*” en el VI Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular, llevado a cabo el 19,20 y 21 de noviembre de 2025 en el Centro de eventos Fórum en la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Agua para consumo humano. 2023. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
2. Comisión de Regulación de Agua Potable y Saneamiento Básico. Más de 13 millones de usuarios sin acceso a agua. Comunicado de Prensa. 2024. Disponible en: <https://www.cra.gov.co/prensa/noticias/mas-13-millones-usuarios-sin-acceso-agua>
3. Sanabria L, Bello C, Rincón J, Villamil R, Masmela E, Ferrer J, et al. Prórroga objetivos de calidad del Río Ubaté–Suárez. Jurisdicción CAR. 2020. Disponible en: <https://www.car.gov.co/uploads/files/6152324b38b58.pdf>
4. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. Resolución número 3462 del 28 de diciembre de 2009. p. 1-7. Disponible en: <https://www.car.gov.co/vercontenido/2310>
5. Ministerio de la Protección Social; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Resolución número 2115 del 22 de junio de 2007. p. 1-7. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Resolución_115_de_2007.pdf
6. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR). Estado del recurso hídrico en la cuenca del río Alto Suárez, Jurisdicción CAR Cundinamarca. Proceso de establecimiento de la meta global de carga contaminante en la cuenca del río Alto Suárez, Jurisdicción CAR. Quinquenio 2023-2027. 2023. Disponible en: <https://www.car.gov.co/uploads/files/6440675d86e7d.pdf>
7. Ríos S, Agudelo R, Gutiérrez L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Rev Fac Nac Salud Pública. 2017; 35:236-47. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/318842980_Patogenos_e_indicadores_microbiologicos_de_calidad_del_agua_para_consumo_humano
8. Clavijo A, Kronberg MF, Rossen A, Moya A, Calvo D, Salatino SE, Pagano EA, Morábito JA, Munarriz ER. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. Sci Total Environ. 2016 Nov 1;569-570:252-261. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.057. Epub 2016 Jun 22. PMID: 27343944.
9. UNICEF. Día Mundial del Agua 2024. Colombia: Alianzas por el agua. 2024. Disponible en: <https://www.unicef.org/colombia/historias/dia-mundial-del-agua-2024>

10. UNICEF. ODS. Objetivo 6: Garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos. Agua limpia y saneamiento. Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/water-and-sanitation/>
11. Karengera A, Bao C, Riksen JAG, van Veelen HPJ, Sterken MG, Kammenga JE, Murk AJ, Dinkla IJT. Development of a transcription-based bioanalytical tool to quantify the toxic potencies of hydrophilic compounds in water using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Dec 20;227:112923. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112923. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34700171.
12. Ficociello G, Inverni A, Massimi L, Buccini G, Canepari S, Uccelletti D. Assessment of the effects of atmospheric pollutants using the animal model *Caenorhabditis elegans*. *Environ Res.* 2020 Dec;191:110209. doi: 10.1016/j.envres.2020.110209. Epub 2020 Sep 13. PMID: 32937173.
13. Binti S, Melinda RV, Joseph BB, Edeen PT, Miller SD, Fay DS. A life cycle alteration can correct molting defects in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 2022 Mar;483:143-156. doi: 10.1016/j.ydbio.2022.01.001. Epub 2022 Jan 15. PMID: 35038442; PMCID: PMC8867747.
14. Rodríguez D, Sánchez R. Modelos biológicos utilizados en estudios de ecotoxicología y su impacto en la salud humana. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2024. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/381549374_Modelos_biologicos_utilizados_en_estudios_de_ecotoxicologia_y_su_impacto_en_la_salud_humana
15. Xiao G, Zhao L, Huang Q, Du H, Guo D, Xia M, Li G, Chen Z, Wang D. Biosafety assessment of water samples from Wanzhou watershed of Yangtze Three Gorges Reservoir in the quiet season in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep.* 2018 Sep 20;8(1):14102. doi: 10.1038/s41598-018-32296-3. Erratum in: *Sci Rep.* 2018 Oct 17;8(1):15589. doi: 10.1038/s41598-018-34066-7. PMID: 30237459; PMCID: PMC6148280.
16. Deng Y, Du H, Tang M, Wang Q, Huang Q, He Y, Cheng F, Zhao F, Wang D, Xiao G. Biosafety assessment of Acinetobacter strains isolated from the Three Gorges Reservoir region in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep.* 2021 Oct 5;11(1):19721. doi: 10.1038/s41598-021-99274-0. PMID: 34611259; PMCID: PMC8492797.
17. Meneely PM, Dahlberg CL, Rose JK. Working with worms: *C. elegans* as a model organism. *Curr Protoc Essent Lab Tech.* 2019;19(1):e35. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpet.35>

18. Kurz CL, Tan MW. Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans*. *Aging Cell*. 2004 Aug;3(4):185-93. doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00108.x. PMID: 15268752.
19. Ye Y, Gu Q, Sun X. Potential of *Caenorhabditis elegans* as an antiaging evaluation model for dietary phytochemicals: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020 Nov;19(6):3084-3105. doi: 10.1111/1541-4337.12654. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33337057.
20. Denzel MS, Lapierre LR, Mack HID. Emerging topics in *C. elegans* aging research: Transcriptional regulation, stress response and epigenetics. *Mech Ageing Dev*. 2019 Jan;177:4-21. doi: 10.1016/j.mad.2018.08.001. Epub 2018 Aug 19. PMID: 30134144; PMCID: PMC6696993.
21. Rasch J, Krüger S, Fontvieille D, Ünal CM, Michel R, Labrosse A, Steinert M. Legionella-protozoa-nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on *Caenorhabditis elegans* colonization. *Int J Med Microbiol*. 2016 Sep;306(6):443-51. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.05.012. Epub 2016 May 25. PMID: 27288243.
22. Abbas A, Valek L, Schneider I, Bollmann A, Knopp G, Seitz W, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J, Wagner M. Ecotoxicological impacts of surface water and wastewater from conventional and advanced treatment technologies on brood size, larval length, and cytochrome P450 (35A3) expression in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018 May;25(14):13868-13880. doi: 10.1007/s11356-018-1605-2. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29512011.
23. Liu X, Ge P, Lu Z, Cao M, Chen W, Yan Z, Chen M, Wang J. Ecotoxicity induced by total, water soluble and insoluble components of atmospheric fine particulate matter exposure in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 2023 Mar;316:137672. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.137672. Epub 2022 Dec 29. PMID: 36587918.
24. Kim S, Paik YK. Developmental and reproductive consequences of prolonged non-aging dauer in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Apr 11;368(3):588-92. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.131. Epub 2008 Feb 7. PMID: 18261976.
25. Darby C, Cosma CL, Thomas JH, Manoil C. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):15202-7. doi: 10.1073/pnas.96.26.15202. PMID: 10611362; PMCID: PMC24797.
26. Hayden AN, Leptich EJ, Arey RN. Invited review: Unearthing the mechanisms of age-related neurodegenerative disease using *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2022 May;267:111166. doi: 10.1016/j.cbpa.2022.111166. Epub 2022 Feb 14. PMID: 35176489.

27. Mizumoto K, Jin Y, Bessereau JL. Synaptogenesis: unmasking molecular mechanisms using *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2023 Feb 9;223(2):iyac176. doi: 10.1093/genetics/iyac176. PMID: 36630525; PMCID: PMC9910414.
28. Khanna A, Kumar J, Vargas MA, Barrett L, Katewa S, Li P, et al. A genome-wide screen of bacterial mutants that enhanced dauer formation in *C. elegans*. *Sci Rep*. 2016 Dec 13;6:38764. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep38764>
29. McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Thornton J, Gems D. Diapause-associated metabolic traits reiterated in long-lived daf-2 mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*. 2006 May;127(5):458-72. doi: 10.1016/j.mad.2006.01.006. Epub 2006 Mar 7. Erratum in: *Mech Ageing Dev*. 2006;127(12):922. Corrected and republished in: *Mech Ageing Dev*. 2006 Dec;127(12):922-36. doi: 10.1016/j.mad.2006.10.002. PMID: 16522328.
30. Knetzger N, Bachtin V, Lehmann S, Hensel A, Liebau E, Herrmann F. The Anthelmintic Quassinoids Ailanthone and Bruceine a Induce Infertility in the Model Organism *Caenorhabditis elegans* by an Apoptosis-like Mechanism Induced in Gonadal and Spermathecal Tissues. *Molecules*. 2021 Dec 3;26(23):7354. doi: 10.3390/molecules26237354. PMID: 34885936; PMCID: PMC8659173.
31. Rodríguez D, Lozano YY, Sánchez RM. *Caenorhabditis elegans* como modelo de infección para el estudio de antimicrobianos. *Nova*. 2021 Jun;19(36):109-32. <https://doi.org/10.22490/24629448.5295>
32. Zhu R, Chin-Sang ID. *C. elegans* insulin-like peptides. *Mol Cell Endocrinol*. 2024 May 1;585:112173. doi: 10.1016/j.mce.2024.112173. Epub 2024 Feb 10. PMID: 38346555.
33. Baugh LR, Hu PJ. Starvation Responses Throughout the *Caenorhabditis elegans* Life Cycle. *Genetics*. 2020 Dec;216(4):837-878. doi: 10.1534/genetics.120.303565. PMID: 33268389; PMCID: PMC7768255.
34. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. In: *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*. Pasadena (CA): WormBook; 2005-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK299460/>
35. Rodrigues DT, Padilha HA, Soares ATG, de Souza MEO, Guerra MT, Ávila DS. The *Caenorhabditis elegans* neuroendocrine system and their modulators: An overview. *Mol Cell Endocrinol*. 2024 May 15;586:112191. doi: 10.1016/j.mce.2024.112191. Epub 2024 Feb 20. PMID: 38382589.

36. McCulloch D, Gems D. Body size, insulin/IGF signaling and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 2003 Jan-Feb;38(1-2):129-36. doi: 10.1016/s0531-5565(02)00147-x. PMID: 12543270.
37. Saitoh Y, Katane M, Miyamoto T, Sekine M, Sakamoto T, Imai H, Homma H. Secreted d-aspartate oxidase functions in *C. elegans* reproduction and development. *FEBS J*. 2019 Jan;286(1):124-138. doi: 10.1111/febs.14691. Epub 2018 Nov 17. PMID: 30387556.
38. Hart AC. Behavior. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*. 2006 Jul 3. Pasadena (CA): WormBook; 2005-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19734/>
39. Henderson ST, Bonafè M, Johnson TE. daf-16 protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006 May;61(5):444-60. doi: 10.1093/gerona/61.5.444. PMID: 16720740.
40. Sánchez R, Gualteros V, Gómez M. Cepa transgénica TJ356 de *Caenorhabditis elegans*: un modelo en toxicología ambiental. Cap IV. *Diario de Campo. Experiencias de Investigación*. 2023;12(2). Available from: https://www.researchgate.net/profile/Dayana-Rodriguez-Morales/publication/381549307_Polimorfismos_en_los_receptores_tipo_toll_y_susceptibilidad_a_presentar_espondiloartropatias_asociado_con_la_infeccion_por_Chlamydia_trachomatis_Capitulo_III_-_Diario_de_Campo_Experiencias_en_Investig/links/667393ff1dec0c3c6f93c9e6/Polimorfismos-en-los-receptores-tipo-toll-y-susceptibilidad-a-presentar-espondiloartropatias-asociado-con-la-infeccion-por-Chlamydia-trachomatis-Capitulo-III-Diario-de-Campo-Experiencias-en-Investig.pdf#page=108
41. Wolkow CA, Kimura KD, Lee MS, Ruvkun G. Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science*. 2000 Oct 6;290(5489):147-50. doi: 10.1126/science.290.5489.147. PMID: 11021802.
42. Podshivalova K, Kerr RA, Kenyon C. How a Mutation that Slows Aging Can Also Disproportionately Extend End-of-Life Decrepitude. *Cell Rep*. 2017 Apr 18;19(3):441-450. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.062. PMID: 28423308; PMCID: PMC5526670.
43. Braeckman BP, Houthoofd K, Vanfleteren JR. Assessing metabolic activity in aging *Caenorhabditis elegans*: concepts and controversies. *Aging Cell*. 2002 Dec;1(2):82-8; discussion 102-3. doi: 10.1046/j.1474-9728.2002.00021.x. PMID: 12882336.
44. Vanfleteren JR, De Vreese A. The gerontogenes age-1 and daf-2 determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*. 1995 Oct;9(13):1355-61. doi: 10.1096/fasebj.9.13.7557026. PMID: 7557026.

45. Apfeld J, Kenyon C. Cell nonautonomy of *C. elegans* daf-2 function in the regulation of diapause and life span. *Cell*. 1998 Oct 16;95(2):199-210. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81751-1. PMID: 9790527.
46. Kirkwood TB. Genes that shape the course of ageing. *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Oct;14(8):345-7. doi: 10.1016/j.tem.2003.08.003. PMID: 14516929.
47. Fabrizio P, Alcolei A, Solari F. Considering *Caenorhabditis elegans* Aging on a Temporal and Tissue Scale: The Case of Insulin/IGF-1 Signaling. *Cells*. 2024 Feb 5;13(3):288. doi: 10.3390/cells13030288. PMID: 38334680; PMCID: PMC10854721.
48. Ishii N, Goto S, Hartman PS. Protein oxidation during aging of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med*. 2002 Oct 15;33(8):1021-5. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00857-2. PMID: 12374613.
49. Henderson ST, Johnson TE. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. 2001 Dec 11;11(24):1975-80. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00594-2. Erratum in: *Curr Biol*. 2005 Apr 12;15(7):690. PMID: 11747825.
50. Yasuda K, Adachi H, Fujiwara Y, Ishii N. Protein carbonyl accumulation in aging dauer formation-defective (daf) mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1999 Feb;54(2):B47-51; discussion B52-3. doi: 10.1093/gerona/54.2.b47. PMID: 10051850.
51. Jenkins NL, McColl G, Lithgow GJ. Fitness cost of extended lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Biol Sci*. 2004 Dec 7;271(1556):2523-6. doi: 10.1098/rspb.2004.2897. PMID: 15590605; PMCID: PMC1440519.
52. Murakami H, Bessinger K, Hellmann J, Murakami S. Aging-dependent and -independent modulation of associative learning behavior by insulin/insulin-like growth factor-1 signal in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*. 2005 Nov 23;25(47):10894-904. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3600-04.2005. PMID: 16306402; PMCID: PMC6725869.
53. Hwang I, Oh H, Santo E, Kim DY, Chen JW, Bronson RT, Locasale JW, Na Y, Lee J, Reed S, Toth M, Yu WH, Muller FL, Paik J. FOXO protects against age-progressive axonal degeneration. *Aging Cell*. 2018 Feb;17(1):e12701. doi: 10.1111/accel.12701. Epub 2017 Nov 26. PMID: 29178390; PMCID: PMC5771393.
54. Zečić A, Braeckman BP. DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and Its Role in Metabolic Remodeling. *Cells*. 2020 Jan 2;9(1):109. doi: 10.3390/cells9010109. PMID: 31906434; PMCID: PMC7017163.

55. Balkrishna A, Gohel V, Pathak N, Singh R, Tomer M, Rawat M, Dev R, Varshney A. Anti-oxidant response of lipidom modulates lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans* and in OxLDL-induced human macrophages by tuning inflammatory mediators. *Biomed Pharmacother.* 2023 Apr;160:114309. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114309. Epub 2023 Jan 28. PMID: 36709598.
56. Sánchez-Blanco A, Kim SK. Variable pathogenicity determines individual lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 2011 Apr;7(4):e1002047. doi: 10.1371/journal.pgen.1002047. Epub 2011 Apr 14. PMID: 21533182; PMCID: PMC3077391.
57. Chen X, Ding P, Chen H, Li T, Zhang M, Yu Y, Hu G. Brominated flame retardants in surface sediment from Western Guangdong, South China: Occurrence, distribution and toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *J Environ Sci (China).* 2024 Nov;145:97-106. doi: 10.1016/j.jes.2023.08.009. Epub 2023 Aug 21. PMID: 38844327.
58. Zhang F, Berg M, Dierking K, Félix MA, Shapira M, Samuel BS, Schulenburg H. *Caenorhabditis elegans* as a Model for Microbiome Research. *Front Microbiol.* 2017 Mar 23;8:485. doi: 10.3389/fmicb.2017.00485. PMID: 28386252; PMCID: PMC5362939.
59. Wu CY, Davis S, Saudagar N, Shah S, Zhao W, Stern A, Martel J, Ojcius D, Yang HC. *Caenorhabditis elegans* as a Convenient Animal Model for Microbiome Studies. *Int J Mol Sci.* 2024;25(12):6670. doi:10.3390/ijms25126670.
60. Lei M, Tan Y, Tu H, Tan W. Neuronal basis and diverse mechanisms of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Front Immunol.* 2024 May 1;15:1353747. doi: 10.3389/fimmu.2024.1353747. PMID: 38751431; PMCID: PMC11094273.
61. Brokate-Llanos AM, Garzón A, Muñoz MJ. *Escherichia coli* carbon source metabolism affects longevity of its predator *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* 2014 Nov-Dec;141-142:22-5. doi: 10.1016/j.mad.2014.09.001. Epub 2014 Sep 26. PMID: 25263107.
62. Pais IS, Valente RS, Sporniak M, Teixeira L. *Drosophila melanogaster* establishes a species-specific mutualistic interaction with stable gut-colonizing bacteria. *PLoS Biol.* 2018 Jul 5;16(7):e2005710. doi: 10.1371/journal.pbio.2005710. PMID: 29975680; PMCID: PMC6049943.
63. Chan JP, Wright JR, Wong HT, Ardasheva A, Brumbaugh J, McLimans C, Lamendella R. Using Bacterial Transcriptomics to Investigate Targets of Host-Bacterial Interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep.* 2019 Apr 3;9(1):5545. doi: 10.1038/s41598-019-41452-2. PMID: 30944351; PMCID: PMC6447554.

64. Labrousse A, Chauvet S, Couillault C, Kurz CL, Ewbank JJ. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr Biol*. 2000 Nov 30;10(23):1543-5. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00833-2. PMID: 11114526.
65. Depraitère C, Darmon M. Croissance de l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* sur différentes espèces bactériennes [Growth of "Dictyostelium discoideum" on different species of bacteria (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris)*. 1978 Oct;129 B(3):451-61. French. PMID: 747269.
66. Haegerbaeumer A, Höss S, Heining P, Traunspurger W. Is *Caenorhabditis elegans* representative of freshwater nematode species in toxicity testing? *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018 Jan;25(3):2879-2888. doi: 10.1007/s11356-017-0714-7. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29143265.
67. Santamaría F, Romero J. Análisis simplificado de oxígeno disuelto en el río Ubaté. *Rev Esc Colomb Eng*. 2014 Dic;95:21-5. Disponible en: <http://www.escuelaing.edu.co/revista.htm>
68. Sanabria L, Villamil R, Ortiz H, Galindo O, Cortés J, Vargas C, et al. Estado del Recurso Hídrico en la Cuenca del Río Alto Suárez, Jurisdicción CAR Cundinamarca. CAR; 2023.
69. Arévalo M, Arcos A. Determinación y análisis de la calidad de agua de la cuenca hidrográfica de los ríos Ubaté-Suarez, para la actualización del POMCA. Universidad de La Salle. Facultad de Ingeniería; 2014.
70. CAR. Elaboración de los Estudios de Diagnóstico, Prospectiva y Formulación para la Cuenca Hidrográfica de los Ríos Ubaté y Suárez (Departamento de Cundinamarca). Cuenca Río Alto Ubaté 2401-02. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/398826346/Estudios-de-Cuenca-Hidrografica>.
71. Gagneten AM, Regaldo L, Vaschetto PA, Marchese M. Variables ambientales. In: *Ambientes acuáticos de la provincia de Santa Fe: protocolos de monitoreo con perspectiva socioecológica*. Santa Fe: Ediciones UNL; 2022. p. 249.
72. IDEAM. Instructivo de Toma y Preservación de Muestras Sedimentos y Agua Superficial para la Red de Monitoreo de Calidad del IDEAM. 2020. Disponible en: <http://sgi.ideam.gov.co>.
73. CORNARE. Instructivo Recolección Muestras de Agua. 2014. Disponible en: https://www.cornare.gov.co/laboratorio/I-MA-01_Recoleccion_Muestras_de_Agua_V.05.f.

74. Sereviche C, Castillo M, Acevedo R. Manual de Métodos Analíticos para la Determinación de Parámetros Físicoquímicos Básicos en Aguas. 2013. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/329153132_Manual_de_Metodos_Analiticos_para_la_Determinacion_de_Parametros_Fisicoquimicos_Basicos_en_Aguas.
75. Hervé B. Nuevas Tecnologías En Diagnóstico Microbiológico: Automatización Y Algunas Aplicaciones En Identificación Microbiana Y Estudio De Susceptibilidad. Clin Las Condes. 2015;26(6):753-63. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-nuevas-tecnologias-en-diagnostico-microbiologico-S0716864015001510>.
76. Eisenmann DM. Wnt signaling. WormBook. 2005. doi:10.1895/wormbook.1.7.1.
77. Jiang Y, Chen J, Wu Y, Wang Q, Li H. Sublethal Toxicity Endpoints of Heavy Metals to the Nematode *Caenorhabditis elegans*. PLoS One. 2016 Jan 29;11(1):e0148014. doi: 10.1371/journal.pone.0148014. PMID: 26824831; PMCID: PMC4732754.
78. Solano D, Marmolejo E. Evaluación de los efectos intestinales y cambios en la longevidad del nematodo *Caenorhabditis elegans* cepa mutante AX1410 y cepa silvestre N2 expuestas a la acción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*. Tesis de grado. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2022.
79. Tejada L, Olivero J. *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology. Rev Environ Contam Toxicol. 2016;237:1-35. doi: 10.1007/978-3-319-23573-8_1. PMID: 26613986.
80. Yoon DS, Lee MH, Cha DS. Measurement of Intracellular ROS in *Caenorhabditis elegans* Using 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate. Bio Protoc. 2018 Mar 20;8(6):e2774. doi: 10.21769/BioProtoc.2774. PMID: 29744374; PMCID: PMC5937271.
81. González J. Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Witheringia coccoloboides* sobre agregados de α -sinucleína en la cepa NL5901 de *Caenorhabditis elegans*. Tesis de maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2018.
82. Ministerio de Agricultura. Decreto 1594 de 1984, 26 de junio de 1984. Por el cual se reglamenta parcialmente el Título I de la Ley 9 de 1979 y el Decreto-Ley 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos. Bogotá: Diario Oficial No 36.700; 1984 Jun 26.
83. Ministerio de Salud. Decreto 2105 de 1983, 26 de julio de 1983. Por el cual se reglamenta parcialmente el Título II de la Ley 9 de 1979 en cuanto a potabilización del agua. Bogotá: Diario Oficial No 36.320; 1983 Jul 26.

84. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Resolución 631 de 17 de marzo de 2015. Por la cual se establecen parámetros y valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y al alcantarillado público. Bogotá; 2015.
85. Saxena G, Bharagava RN, Kaithwas G, Raj A. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *J Water Health*. 2015 Jun;13(2):319-39. doi: 10.2166/wh.2014.275. PMID: 26042966.
86. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol*. 2017 Sep;123(3):570-581. doi: 10.1111/jam.13468. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28383815.
87. Scales BS, Dickson RP, LiPuma JJ, Huffnagle GB. Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct;27(4):927-48. doi: 10.1128/CMR.00044-14. PMID: 25278578; PMCID: PMC4187640.
88. Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Jul;67(7):3325-7. doi: 10.1128/AEM.67.7.3325-3327.2001. PMID: 11425763; PMCID: PMC93022
89. Public Health Agency of Canada. *Micrococcus sp.* Chronic Diseases and Injuries in Canada. 2011 Jun.
90. Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD. Ecology of Bacillaceae. *Microbiol Spectr*. 2015 Apr;3(2):TBS-0017-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013. PMID: 26104706.
91. Cortés A, Díaz M, Garcia R, Sharma A. The genus *Staphylococcus*: Harmful and Beneficial Microorganisms in the Environment. *Pak J Life Soc Sci*. 2017;15(2):72-83. Available from: https://www.researchgate.net/publication/322368847_The_genus_Staphylococcus_Harmful_and_Beneficial_Microorganisms_in_the_Environment.
92. Tanabe M, Sugawara Y, Denda T, Sakaguchi K, Takizawa S, Koide S, Hayashi W, Yu L, Kayama S, Sugai M, Nagano Y, Nagano N. Municipal wastewater monitoring revealed the predominance of *bla*_{GES} genes with diverse variants among carbapenemase-producing organisms: high occurrence and persistence of *Aeromonas caviae* harboring the new *bla*_{GES} variant *bla*_{GES-48}. *Microbiol Spectr*. 2023 Dec 12;11(6):e0218823. doi: 10.1128/spectrum.02188-23. Epub 2023 Oct 9. PMID: 37811969; PMCID: PMC10715227.

93. Kivanc M, Yilmaz M, Demir F. The occurrence of *Aeromonas* in drinking water, tap water and the porsuk river. *Braz J Microbiol.* 2011 Jan;42(1):126-31. doi: 10.1590/S1517-83822011000100016. PMID: 24031613; PMCID: PMC3768929.
94. Chen Q, Zhou W, Cheng Y, et al. Four novel *Acinetobacter lwoffii* strains isolated from the milk of cows in China with subclinical mastitis. *BMC Vet Res.* 2024;20:274. doi:10.1186/s12917-024-04119-3.
95. Narciso-da-Rocha C, Vaz-Moreira I, Svensson-Stadler L, Moore ER, Manaia CM. Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter spp.* in water from the source to the tap. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Jan;97(1):329-40. doi: 10.1007/s00253-012-4190-1. Epub 2012 Jun 6. PMID: 22669636.
96. Parada L, Gualteros A, Sánchez R. Caracterización fenotípica de la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* como un modelo en enfermedades neurodegenerativas. *Nova.* 2017;15:69-78. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702017000200069&lng=es.
97. Cuenca C, Vera Y, Banchón C. Public health and safe water in Latin America: Sustainable solutions to climate change. *RSD.* 2025 Jun 22;14(6):e8714649088. Disponible en: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/49088>.
98. Función Pública. Decreto 1575 de 2007. Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua de Consumo Humano. Disponible en: <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=30007>.
99. McLellan SL. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Aug;70(8):4658-65. doi: 10.1128/AEM.70.8.4658-4665.2004. PMID: 15294799; PMCID: PMC492333.
100. Widmer K, Van Ha NT, Vinitnantharat S, Sthiannopkao S, Wangsaatmaja S, Prasetiati MA, Thanh NC, Thepnoo K, Sutadian AD, Thao HT, Fapyane D, San V, Vital P, Hur HG. Prevalence of *Escherichia coli* in surface waters of Southeast Asian cities. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013 Nov;29(11):2115-24. doi: 10.1007/s11274-013-1376-3. Epub 2013 May 22. PMID: 23695802.
101. Najjembe CA, Aladejana OM, Uwanibe JN, Happi CT, Folarin OA. Microbiological and Molecular Characterization of Bacterial Communities in Domestic Water Sources in Nabuti Village, Mukono District, Central Uganda. *Microbiol Res.* 2025;16(5):99. doi:10.3390/microbiolres16050099.

102. Williams PL, Dusenbery DB. Aquatic toxicity testing using the nematode, *Caenorhabditis elegans*. Environ Toxicol Chem. 1990;9(10):1285-90. doi:10.1002/etc.5620091007.
103. Neidig N, Paul RJ, Scheu S, Jousset A. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacterivorous nematodes. Microb Ecol. 2011 May;61(4):853-9. doi: 10.1007/s00248-011-9821-z. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21360140; PMCID: PMC3098371.
104. Kissoyan KAB, Drechsler M, Stange EL, Zimmermann J, Kaleta C, Bode HB, Dierking K. Natural *C. elegans* Microbiota Protects against Infection via Production of a Cyclic Lipopeptide of the Viscosin Group. Curr Biol. 2019 Mar 18;29(6):1030-1037.e5. doi: 10.1016/j.cub.2019.01.050. Epub 2019 Feb 28. PMID: 30827913.
105. Berg M, Zhou XY, Shapira M. Host-Specific Functional Significance of *Caenorhabditis* Gut Commensals. Front Microbiol. 2016 Oct 17;7:1622. doi: 10.3389/fmicb.2016.01622. PMID: 27799924; PMCID: PMC5066524.
106. Chen PL, Wu CJ, Tsai PJ, Tang HJ, Chuang YC, Lee NY, Lee CC, Li CW, Li MC, Chen CC, Tsai HW, Ou CC, Chen CS, Ko WC. Virulence diversity among bacteremic *Aeromonas* isolates: ex vivo, animal, and clinical evidences. PLoS One. 2014 Nov 6;9(11):e111213. doi: 10.1371/journal.pone.0111213. PMID: 25375798; PMCID: PMC4222899
107. Miyata S, Begun J, Troemel ER, Ausubel FM. DAF-16-dependent suppression of immunity during reproduction in *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 2008 Feb;178(2):903-18. doi: 10.1534/genetics.107.083923. Epub 2008 Feb 1. PMID: 18245330; PMCID: PMC2248360.
108. Schifano E, Marazzato M, Ammendolia MG, Zanni E, Ricci M, Comanducci A, Goldoni P, Conte MP, Uccelletti D, Longhi C. Virulence behavior of uropathogenic *Escherichia coli* strains in the host model *Caenorhabditis elegans*. Microbiologyopen. 2019 Jun;8(6):e00756. doi: 10.1002/mbo3.756. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30381890; PMCID: PMC6562141.
109. Revtovich AV, Lee R, Kirienko NV. Interplay between mitochondria and diet mediates pathogen and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet. 2019 Mar 13;15(3):e1008011. doi: 10.1371/journal.pgen.1008011. PMID: 30865620; PMCID: PMC6415812.
110. Crawford N, Martell M, Nielsen T, Khalil B, Imtiaz F, Nguidjo E, Newell-Caito JL, Bornhorst J, Schwerdtle T, Caito SW. Methylmercury-Induced Metabolic Alterations in

Caenorhabditis elegans Are Diet-Dependent. *Toxics*. 2021;9(11):287. doi:10.3390/toxics9110287.

111. Xu N, Yang X, Yang Q, Guo M. Comparative Genomic and Transcriptomic Analysis of Phenol Degradation and Tolerance in *Acinetobacter lwoffii* through Adaptive Evolution. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 20;24(22):16529. doi: 10.3390/ijms242216529. PMID: 38003719; PMCID: PMC10671910.

112. Jávega B, Herrera G, O'Connor JE. Flow Cytometric Analysis of Oxidative Stress in *Escherichia coli* B Strains Deficient in Genes of the Antioxidant Defence. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 10;23(12):6537. doi: 10.3390/ijms23126537. PMID: 35742981; PMCID: PMC9223410.

113. Zhu A, Zheng F, Zhang W, Li L, Li Y, Hu H, Wu Y, Bao W, Li G, Wang Q, Li H. Oxidation and Antioxidation of Natural Products in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Apr 2;11(4):705. doi: 10.3390/antiox11040705. PMID: 35453390; PMCID: PMC9029379

114. Irazoqui JE, Troemel ER, Feinbaum RL, Luhachack LG, Cezairliyan BO, Ausubel FM. Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathog*. 2010 Jul 1;6(7):e1000982. doi: 10.1371/journal.ppat.1000982. PMID: 20617181; PMCID: PMC2895663.

115. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):504-12. doi: 10.1038/nature08980. Erratum in: *Nature*. 2010 Sep 30;467(7315):622. PMID: 20336132.

116. Evans EA, Kawli T, Tan MW. *Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog*. 2008 Oct;4(10):e1000175. doi: 10.1371/journal.ppat.1000175. Epub 2008 Oct 17. PMID: 18927620; PMCID: PMC2568960.

117. Urban N, Tsitsipatis D, Hausig F, Kreuzer K, Erler K, Stein V, Ristow M, Steinbrenner H, Klotz LO. Non-linear impact of glutathione depletion on *C. elegans* life span and stress resistance. *Redox Biol*. 2017 Apr;11:502-515. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.003. Epub 2016 Dec 6. PMID: 28086197; PMCID: PMC5228094.

118. Irazoqui JE, Urbach JM, Ausubel FM. Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jan;10(1):47-58. doi: 10.1038/nri2689. PMID: 20029447; PMCID: PMC2965059.

Anexos

Anexo 1: Registro de valores del Ensayo de Longevidad en *C. elegans* TJ356

% Supervivencia TJ356									
Día	TJ356/ <i>E. coli</i> OP50			TJ356/ <i>E. coli</i>			TJ356/ <i>A. lwoffii</i>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	93	86	86	93	93	93	100	100	100
3	80	73	73	80	86	73	86	86	80
4	73	66	66	66	66	73	80	86	66
5	66	60	60	60	46	66	73	80	53
6	53	53	46	40	33	53	73	73	46
7	53	46	46	40	33	40	66	60	46
8	46	40	40	33	33	33	60	46	40
9	40	40	33	26	26	26	46	33	33
10	40	36	26	20	26	26	33	33	20
11	36	26	26	20	20	13	20	26	13
12	36	20	26	13	20	13	13	20	6
13	26	20	20	13	20	6	6	20	6
14	26	13	20	6	13	0	6	13	0
15	13	13	20	0	0	0	6	0	0
16	13	6	13				0		
17	6	6	6						
18	6	0	0						
19	0								

Anexo 2: Tablas de registro de valores de reproducción

Reproducción									
	TJ356/ <i>E. coli</i> OP50			TJ356 / <i>E. coli</i>			TJ356/ <i>A. lwoffii</i>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Nematodo 1	180	184	175	143	153	169	116	101	116
Nematodo 2	187	177	176	115	148	148	125	108	137
Nematodo 3	174	181	184	153	160	113	101	134	131
Nematodo 4	186	181	179	141	150	135	113	123	118
Nematodo 5	177	175	173	136	114	154	112	133	120
Promedio	180,8	179,6	177,4	137,6	145	143,8	113,4	119,8	124,4

Anexo 3: Tablas de registro de valores de localización de DAF-16 en nematodos TJ356

	DAF- 16 CITOSOLICO		DAF-16 NUCLEAR	
	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
H2O2	3	10%	27	90%
<i>E. coli</i> OP50	28	93%	2	7%
<i>E. coli</i>	26	87%	4	13%
<i>A. lwoffii</i>	6	20%	24	80%

Anexo 4: Tablas de registro de Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) de medición de ROS

Especies Reactivas de Oxígeno (URF)				
	R1	R2	R3	Promedio
Blanco	20,2624	24,0088	22,5193	22,2635
TJ356/ H2O2	106,081	105,428	141,505	117,671333
TJ356/ <i>E. coli</i> OP50	33,7759	42,4688	28,4404	34,8950333
TJ356/ <i>E. coli</i>	16,4376	16,9337	24,2137	19,195
TJ356/ <i>A. lwoffii</i>	23,7328	26,8681	15,2442	21,9483667

Medida 1: Excitación: 485nm / Emisión 520 nm

1ra lectura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20,2624				28,4404							
B			105,428				23,7328					
C	24,0088				16,4376							
D			141,505				26,8681					
E	22,5193				16,9337							
F			33,7759				15,2442					
G	106,081				24,2137							
H			42,4688									

Especies Reactivas de Oxígeno (URF)				
	R1	R2	R3	Promedio
Blanco	40,9919	40,52	40,4083	40,6400667
TJ356/ H2O2	2076,21	2165,8	2109,43	2117,14667
TJ356/ <i>E. coli</i> OP50	636,463	678,233	641,615	652,103667
TJ356/ <i>E. coli</i>	37,1764	41,5547	46,2431	41,6580667
TJ356/ <i>A. lwoffii</i>	87,0919	96,1098	60,3424	81,1813667

Medida 2: Excitación: 485nm / Emisión 520 nm

2da lectura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40,9919				641,615							
B			2165,8				87,0919					
C	40,52				37,1764							
D			2109,43				96,1098					
E	40,4083				41,5547							
F			636,463				60,3424					
G	2076,21				46,2431							
H			678,233									

Anexo 5: Consolidado de análisis estadístico en GraphPad Prism 8.0.2

Survival Curve comparison	A
	LONGEVIDAD N2
Comparison of Survival Curves	
Log-rank (Mantel-Cox) test (recommended)	
Chi square	460.7
df	5
P value	<0.0001
P value summary	****
Are the survival curves sig different?	Yes

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons	LONGEVIDAD N2				
Number of families	1				
Number of comparisons per family	5				
Alpha	0.05				
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control <i>E. coli</i> OP50 vs. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.000	-1.396 to 3.396	No	ns	0.5347
Control <i>E. coli</i> OP50 vs. <i>Escherichia coli</i>	6.000	3.604 to 8.396	Yes	***	0.0006
Control <i>E. coli</i> OP50 vs. <i>Acinetobacter lwoffii</i>	6.000	3.604 to 8.396	Yes	***	0.0006
Control <i>E. coli</i> OP50 vs. <i>Aeromonas caviae</i>	2.000	-0.3961 to 4.396	No	ns	0.0983
Control <i>E. coli</i> OP50 vs. <i>Klebsiella oxytoca</i>	0.000	-2.396 to 2.396	No	ns	>0.9999

Survival Curve comparison		A	
		LONGEVIDAD N2/TJ356	LONGEVIDAD N2 Y TJ356
df	1	Table Analyzed	LONGEVIDAD N2 Y TJ356
P value	<0.0001	Column B	N2
P value summary	****	vs.	vs.
Are the survival curves sig different?	Yes	Column A	TJ356
		Unpaired t test	
		P value	0.0078
		P value summary	**
		Significantly different (P < 0.05)?	Yes

Survival Curve comparison		A
		LONGEVIDAD TJ356
Comparison of Survival Curves		
Log-rank (Mantel-Cox) test (recommended)		
Chi square		158.3
df		2
P value		<0.0001
P value summary		****
Are the survival curves sig different?		Yes

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons						
		LONGEVIDAD TJ356				
Number of families	1					
Number of comparisons per family	3					
Alpha	0.05					
Tukey's multiple comparisons test		Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control <i>E. coli</i> OP50 vs. <i>Escherichia coli</i>		3.667	1.799 to 5.534	Yes	**	0.0023
Control <i>E. coli</i> OP50 vs. <i>Acinetobacter lwoffi</i>		3.333	1.466 to 5.201	Yes	**	0.0037
<i>Escherichia coli</i> vs. <i>Acinetobacter lwoffi</i>		-0.3333	-2.201 to 1.534	No	ns	0.8514

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		REPRODUCCIÓN TJ356				
Number of families	1					
Number of comparisons per family	3					
Alpha	0.05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
<i>E. coli</i> OP50 vs. <i>Escherichia coli</i>	37.80	27.12 to 48.48	Yes	****	<0.0001	
<i>E. coli</i> OP50 vs. <i>Acinetobacter lwoffii</i>	60.07	49.39 to 70.75	Yes	****	<0.0001	
<i>Escherichia coli</i> vs. <i>Acinetobacter lwo</i>	22.27	11.59 to 32.95	Yes	****	<0.0001	

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons		ROS TJ356					
Number of comparisons per family	4						
Alpha	0.05						
Dunnett's multiple comparisons	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	C-?	
<i>E. coli</i> OP50 vs. Blanco	611.5	554.3 to 668.7	Yes	****	<0.0001	A	Blanco
<i>E. coli</i> OP50 vs. H ₂ O ₂	-1465	-1522 to -1408	Yes	****	<0.0001	B	H ₂ O ₂
<i>E. coli</i> OP50 vs. <i>E. coli</i>	610.4	553.2 to 667.6	Yes	****	<0.0001	D	<i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> OP50 vs. <i>A. lwoffii</i>	570.9	513.7 to 628.1	Yes	****	<0.0001	E	<i>A. lwoffii</i>

Contingency	
Table Analyzed	DAF-16
P value and statistical significance	
Test	Chi-square
Chi-square, df	228.3, 3
P value	<0.0001
P value summary	****
One- or two-sided	NA
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes