



UNIVERSIDAD  
**MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

---

**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

---

**Estudio del impacto de la microbiota natural de *Caenorhabditis elegans* en  
la conducta y fisiología**

Sebastián Ignacio Urquiza Zurich

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago – Chile

2020



UNIVERSIDAD  
**MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias  

---

**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

---

**Estudio del impacto de la microbiota natural de *Caenorhabditis elegans* en  
la conducta y fisiología**

Sebastián Ignacio Urquiza Zurich

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutora: Dra. Andrea Leonor Calixto Mohor

Santiago – Chile

2020

Este trabajo está dedicado a las personas que hicieron esto posible, principalmente a mi familia. A mis padres, que me han dado salud, educación, cariño y valores para convertirme en la persona que soy hoy. Especialmente, a mi hermano menor Nicolás por siempre estar cuando lo necesito y que sin él todo sería muy diferente

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia paterna por todo el apoyo que me brindaron a lo largo de mi vida y mis estudios. Mis padres, por ser el pilar fundamental desde que tengo memoria y uso de razón. Mi hermano, por siempre brindarme su ayuda y apoyo. A Francisca, por apoyarme desde el principio, y a José Pablo, Santiago y Agustín por recordarme que hay tiempo para todo y que uno nunca deja de ser niño. Sin ellos no hubiese podido alcanzar mis metas y logros.

También agradezco a mis amigas y amigos por siempre estar ahí para mí cuando más lo necesitaba durante estos cinco años de carrera. Espero que mantengamos esta amistad sin importar lo que nos depara el futuro. Quiero agradecer a todos los miembros – y exmiembros- del laboratorio por ayudarme y apoyarme a lo largo de mi formación profesional: Carolina, Lidia, Ornella, Arlés, Scarlett, Marcela y Mauricio, gracias por toda su ayuda. Asimismo, agradecer a mi tutora y mentora Andrea Calixto, por ayudarme en mi formación como científico y como persona para enfrentarme a la vida, entregarme todas las herramientas necesarias y, principalmente, por creer en mí desde el primer día.

Agradezco a todas y todos los docentes que ayudaron a mi formación como profesional, al entregarme el conocimiento necesario y permitirme formar mi propio pensamiento crítico para el mundo laboral y cotidiano. Agradezco a todas las personas que conocí a lo largo de estos cinco años que, directa o indirectamente, contribuyeron con su granito de arena para convertirme en la persona y profesional que soy.

## INFORMACIÓN DEL LABORATORIO Y/O CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Esta tesis de pregrado fue realizada en el Laboratorio de Microbioma y Conducta, el cual formaba parte del Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor (Camino La Pirámide 5750, Huechuraba, Santiago de Chile). El laboratorio se fundó a finales del año 2012, y se ubicó originalmente en el subterráneo del Edificio Corporativo de la misma universidad. Tres años más tarde se movió a la superficie, en el Bloque B.

La investigación del laboratorio tiene como objetivo entender la dieta y el ambiente modifican la expresión génica, el fenotipo y el comportamiento. Específicamente estudiamos como *C. elegans* y su dieta bacteriana interactúan y se comunican para gatillar cambios conductuales agudos y transgeneracionales tanto en microbios como en animales. Nemátodos y bacterias son manejables genéticamente, permitiendo la detección de moléculas específicas y cuantificar su efecto en la conducta y fenotipo. Para diseccionar ambas entidades a nivel de expresión génica, analizamos sus transcriptomas e identificamos moléculas candidatas en gusanos y bacterias que median un comportamiento, seguido por la validación funcional in vivo.

Financiamiento: Millennium Scientific Initiative of the Chilean Ministry of Economy, Development, and Tourism (P029-022-F), Proyecto Apoyo Redes Formación de Centros (REDES180138), CYTED grant P918PTE 3 y Fondo Desarrollo para la Publicación (FDP) 2019, Universidad Mayor.

## ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **ALM:** Neurona mecanosensorial, del inglés *Anterior Lateral Microtubule*.
- **AMP:** Ampicilina.
- **ARN:** Ácido ribonucleico.
- **ARNi:** ARN de interferencia.
- **AVM:** Neurona mecanosensorial, del inglés *Anterior Ventral Microtubule*.
- **AxØ:** Categoría morfológica neuronal del axón degenerado, del inglés *Axon Degenerated*.
- **AxT:** Categoría morfológica neuronal del axón truncado, del inglés *Axon Truncated*.
- **AxTL:** Categoría morfológica neuronal del axón truncado largo, del inglés *Axon Truncated Long*.
- **AxW:** Categoría morfológica neuronal del axón tipo silvestre, del inglés *Axon Wild Type*.
- **AZT:** Azitromicina.
- **Ca:** Calcio.
- **CIT:** Agar citrato.
- **CLO:** Cloranfenicol.
- **COR:** Agar corriente.
- **D.O.:** Densidad óptica.
- **DIC:** Contraste Diferencial Interferencial, del inglés *Differential Interferential Contrast*.
- **GEN:** Gentamicina.
- **GFP:** Proteína Fluorescente Verde, del inglés (*Green Fluorescent Protein*).
- **ISO1:** Aislado 1, del inglés *ISOLATE 1*.
- **ISO2:** Aislado 2, del inglés *ISOLATE 2*.
- **ISO3:** Aislado 3, del inglés *ISOLATE 3*.
- **KAN:** Kanamicina.
- **L1:** Estadio larvario número 1, del inglés *Larval stage 1*.
- **L2:** Estadio larvario número 2, del inglés *Larval stage 2*.
- **L3:** Estadio larvario número 3, del inglés *Larval stage 3*.
- **L4:** Estadio larvario número 4, del inglés *Larval stage 4*.
- **LB:** Luria Bertani.

- **LIA:** Agar Hierro Lisina, del inglés (*Lysine Iron Agar*).
- **M9:** Buffer M9.
- **MC:** Motoneuronas colinérgicas.
- **MEC-10:** Subunidad del canal iónico MEC-4.
- **MEC-12:** Proteína  $\beta$  tubulina.
- **MEC-2:** Proteína tipo estomatina.
- **MEC-4(d):** Mutación (valina-treonina), en la subunidad MEC-4.
- **MEC-4:** Subunidad formadora del poro del canal mecanotransductor MEC-4.
- **MEC-6:** Proteína transmembrana tipo-peroxidasa.
- **MEC-7:** Proteína  $\alpha$  tubulina.
- **MIO:** Agar Movilidad-Indol-Ornitina.
- **Na:** Sodio.
- **NAL:** Ácido nalidíxico
- **NGM:** Medio de crecimiento de Nemátodos, del inglés *Nematode Growth Medium*.
- **nm:** Nanómetros.
- **O.N.:** Durante la noche, del inglés *Over Night*.
- **Pad de agarosa:** Porta objetos con una capa de agarosa a 2% para visualización de gusanos.
- **pb:** Pares de bases.
- **PLM:** Neurona mecanosensorial, del inglés *Posterior Lateral Microtubule*.
- **PVM:** Neurona mecanosensorial, del inglés *Posterior Ventral Microtubule*.
- **r.p.m.:** Revoluciones por minuto.
- **STREP:** Estreptomina.
- **TET:** Tetraciclina.
- **TSI:** Agar Triple-Hierro-Azúcar, del inglés *Triple-Sugar-Iron*.
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.

## I. INDICE

### Índice de Contenidos

AGRADECIMIENTOS.....	iv
INFORMACIÓN DEL LABORATORIO Y/O CENTRO DE INVESTIGACIÓN .....	v
ABREVIATURAS .....	vi
I. INDICE .....	i
II. RESUMEN .....	iv
III. SUMMARY .....	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema de investigación .....	1
1.2 Marco Teórico o antecedentes de la investigación.....	2
<b>1.2.1 C. elegans como modelo biológico .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2 Modelo de neurodegeneración en el laboratorio .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.3 Nemátodos y bacterias: concepto de holobionte .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.4 C. elegans y microbiota intestinal: modelo de estudio bacterívoro.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.5 Alimentación y conducta.....</b>	<b>9</b>
1.3 Justificación de la investigación .....	11
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Hipótesis.....	13
2.2 Objetivo General .....	13
2.3 Objetivos Específicos.....	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Cultivo y aislamiento de bacterias .....	14
3.2 Curva de crecimiento bacteriano .....	14
3.3 Dilución seriada y Unidades Formadoras de Colonias (UFC) .....	15
3.4 Bateria Bioquímica .....	16
3.5 Tinción de Gram .....	16
3.6 Bateria de antibióticos .....	17
3.7 Criterios macroscópicos para colonias.....	17
3.8 Extracción de ADN.....	18
3.9 Tratamiento con RNAsa .....	19
3.10 Secuenciación muestras bacterianas .....	19



3.11 Ensamble de genomas .....	19
3.12 Análisis Filogenético .....	20
3.13 Ensayo de conducta .....	20
3.14 Ensayo de preferencia bacteriana.....	21
3.15 Cálculo del índice de preferencia (Choice Index) .....	22
3.16 Sincronización de gusanos .....	22
3.17 Curva de desarrollo de gusanos .....	23
3.18 Ensayo de neuroprotección .....	24
3.19 Ensayo de respuesta al tacto.....	25
3.20 Análisis estadístico .....	25
3.21 Análisis de microscopía de fluorescencia.....	25
<b>4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 Caracterización de los aislados bacterianos.....	27
<b>4.1.1 Secuenciación del ADN genómico, ensamble de genomas y análisis filogenético .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.2 Determinación de la cinética de crecimiento y Unidades Formadoras de Colonias (UFC)</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1.3 Análisis de la batería bioquímica de los aislados bacterianos .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.4 Determinación de sensibilidad y resistencia a antibióticos .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.5 Determinación de características macroscópicas y tinción de Gram .....</b>	<b>35</b>
4.2 Análisis de la conducta de <i>C. elegans</i> frente a los aislados bacterianos.....	35
<b>4.2.1 Determinación del bombeo faríngeo.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2.2 Determinación del tiempo de defecación .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.3 Análisis del ensayo preferencia de bacterias en <i>C. elegans</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.4 Análisis de la curva de desarrollo de <i>C. elegans</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.5 Análisis del movimiento de <i>C. elegans</i> dentro del césped.....</b>	<b>50</b>
4.3 Análisis de la morfología neuronal del gusano <i>mec-4d</i> frente a las dietas bacterianas .....	50
4.4 Determinación de funcionalidad neuronal de <i>C. elegans</i> .....	52
<b>5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
5.1 <i>Salmonella enterica</i> (ISO1), <i>Stenotrophomonas humi</i> (ISO2), <i>Bacillus pumilus</i> (ISO3) y su caracterización como posibles dietas bacterianas para <i>C. elegans</i> .....	54
5.2 Las bacterias como consorcio cambian la conducta de <i>C. elegans</i> a diferencia de las bacterias individuales .....	58
5.3 <i>Bacillus pumilus</i> (ISO3) es una bacteria candidata con un potencial efecto neuroprotector en <i>C. elegans</i> .....	62

<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS</b> .....	67
7.1 Implicancias.....	67
7.2 Recomendaciones .....	68
7.3 Proyecciones Futuras .....	68
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	70
<b>9. ANEXOS/MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	81

SOLO USO ACADÉMICO

## II. RESUMEN

La búsqueda de nuevos microorganismos en la naturaleza para estudiar su interacción entre ellos y otros organismos proporciona una poderosa herramienta para comprender los beneficios y daños para la salud animal y humana. Entender cómo interactúan las bacterias en los ecosistemas genera conocimiento para el desafío del cambio climático. A medida que el clima cambia, también lo hacen las comunidades bacterianas tanto en su abundancia como en su fisiología. En la naturaleza, *Caenorhabditis elegans* se alimenta de bacterias del suelo de frutas y vegetación en descomposición, y estas se establecen como su microbiota salvaje. El propósito de esta tesis fue analizar el efecto de bacterias individuales y sus mezclas en la conducta y fisiología del gusano. Con ello, nos planteamos la siguiente pregunta: ¿existe diferencia en la conducta y fisiología del gusano al alimentarlo con diferentes dietas bacterianas individuales y como consorcio?

Para responder esta pregunta, aislamos un gusano del suelo el cual venía con su microbiota natural. Se aisló e identificó las bacterias mediante secuenciación de su ADN y posterior ensamble de sus genomas. Se identificó cada aislado como ISO1 (*Salmonella entérica*), ISO2 (*Stenotrophomonas humi*) e ISO3 (*Bacillus pumilus*). Se realizó ensayos de conducta como bombeo faríngeo, defecación, preferencia entre bacterias, desarrollo, movimiento y distribución dentro de la placa para comparar dietas individuales con las mezcladas. Para analizar el efecto fisiológico se utilizó un modelo de neurodegeneración desencadenado genéticamente causado por la expresión constitutiva de la degenerina *mec-4d* causando un desequilibrio osmótico a nivel celular, activación de proteasas y colapso energético de las neuronas. En este contexto, se evaluó la morfología y funcionalidad de la neurona post-embionaria AVM en el gusano *mec-4d* con las diferentes dietas bacterianas.

La alimentación de los gusanos con las bacterias individuales produjo un mayor bombeo faríngeo en comparación a las mezclas. ISO3 generó mayor número de bombeos en el gusano (327 bombeos/min). Por otro lado, el tiempo de defecación de los gusanos alimentados con mezclas presentó ser menor que en las individuales. ISO2 generó que el gusano tenga un intervalo de tiempo mayor entre una defecación y otra (50 segundos). El gusano prefiere las dietas de los aislados bacterianos en lugar de *E. coli* OP50. La mezcla de las tres bacterias es la dieta con mayor preferencia en comparación a las bacterias del laboratorio. Los gusanos en *E. coli* HT115, ISO3 e ISO23 presentaron un tipo de movimiento con ceses y giros recurrentes (*dwelling*), común cuando están en una comida con un aporte nutricional alto.

En conclusión, se logró identificar y caracterizar los aislados bacterianos mediante técnicas de bioinformática y microbiología. Existe una diferencia en la conducta del gusano al ser alimentado con bacterias individuales en comparación a los consorcios. La mezcla de bacterias retrasa el desarrollo del gusano en comparación a las dietas individuales. Finalmente, ISO3 demostró ser candidata para el estudio de la neuroprotección en comparación a las otras bacterias. También, generó mayor cambio dentro de las conductas de las mezclas, lo que sugiere un potencial candidato para la interacción con otras bacterias y el gusano. Una de las proyecciones biotecnológicas es el uso de bacterias del medio ambiente para el estudio de su composición a nivel de nutrientes para los organismos y posible uso clínico.

SOLO USO ACADÉMICO

### III. SUMMARY

The search for new microorganisms in nature to study their interaction with each other and other organisms provides a powerful tool to understand the benefits and harms for animal and human health. Understanding how bacteria interact in ecosystems generates knowledge for the challenge of climate change. As the climate changes, so do bacterial communities in both abundance and physiology. In the wild, *Caenorhabditis elegans* feeds on soil bacteria from decaying fruits and vegetation, and these establish themselves as their wild microbiota. The purpose of this thesis was to analyze the effect of individual bacteria and their mixtures on the worm's behavior and physiology. With this, we ask ourselves the following question: Is there a difference in the worm's behavior and physiology when feeding it with different individual bacterial diets and as a consortium?

To answer this question, we isolated a worm from the ground which came with its natural microbiota. The bacteria were isolated and identified by sequencing their DNA and subsequent assembly of their genomes. Each isolate was identified as ISO1 (*Salmonella enterica*), ISO2 (*Stenotrophomonas humi*) and ISO3 (*Bacillus pumilus*). Behavioral tests such as pharyngeal pumping, defecation, preference between bacteria, development, movement and distribution within the plate were performed to compare individual diets with those mixed. To analyze the physiological effect, a genetically triggered neurodegeneration model caused by the constitutive expression of degenerin *mec-4d* causing an osmotic imbalance at the cellular level, activation of proteases and energy collapse of neurons was used. In this context, the morphology and functionality of the post-embryonic AVM neuron in the *mec-4d* worm was evaluated with the different bacterial diets.

Feeding worms with the individual bacteria produced greater pharyngeal pumping compared to the mixtures. ISO3 generated a greater number of pumps in the worm (327 pumps/min). On the other hand, the defecation time of the worms fed with mixtures showed to be less than in the individual ones. ISO2 generated that the worm has a longer time interval between defecation (50 seconds). The worm prefers the diets of the bacterial isolates instead of *E. coli* OP50. The mixture of the three bacteria is the most preferred diet compared to laboratory bacteria. The worms in *E. coli* HT115, ISO3 and ISO23 presented a type of movement with stops and recurring turns (*dwelling*), common when they are in a meal with a high nutritional contribution.

In conclusion, it was possible to identify and characterize the bacterial isolates using bioinformatics and microbiology techniques. There is a difference in the worm's behavior when fed with individual

bacteria compared to consortia. The bacterial mix delays the development of the worm compared to individual diets. Finally, ISO3 proved to be a candidate for the study of neuroprotection compared to other bacteria. Also, it generated greater change within the behaviors of the mixtures, which suggests a potential candidate for interaction with other bacteria and the worm. One of the biotechnological projections is the use of bacteria from the environment to study their composition at the level of nutrients for organisms and possible clinical use.

SOLO USO ACADÉMICO

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Planteamiento del problema de investigación

En la naturaleza, todos los organismos vivos tienen la capacidad natural de adquirir y seleccionar sus alimentos. Esta capacidad les ayuda a sobrevivir en su hábitat natural y decidir sobre continuar la búsqueda dentro de la gama de alimentos. Se ha reportado que los animales seleccionan su comida de acuerdo con su entorno y requisitos dietéticos (1). Los organismos viven constantemente en contacto con otros organismos de distinto tipo en una compleja red de interacciones ecológicas, que incluyen relaciones depredador-presa, huésped-parásito y en simbiosis (2). La ingesta de alimentos y el gasto de energía están estrictamente regulados por la interacción entre neurotransmisores, hormonas y nutrientes de cada individuo (3).

Todos los organismos deben encontrar y detectar buenas fuentes de alimentos que promuevan el crecimiento, supervivencia y evitar fuentes de alimentos perjudiciales que retrasen el crecimiento o causen enfermedades (4). Para muchos organismos, incluidos los humanos, el olfato es una forma importante de discriminar entre los diferentes tipos de alimentos (5). Hoy en día, la alimentación se ha estudiado ampliamente utilizando organismos modelo como gusano, mosca y ratón (6,7). Sin embargo, los estudios realizados en modelos biológicos están controlados por las condiciones de un laboratorio. Esto representa un sesgo al intentar entender las relaciones naturales, debido a la cantidad de factores que no se han estudiado o que simplemente no se conocen.

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es un ejemplo típico de un organismo modelo que se ha desconectado de su ecología natural. Recientemente se está determinando su hábitat y ecología natural, alimentación, depredadores, patógenos y respuestas adaptativas a sus desafíos ambientales (8,9,10). Es por ello que en este último tiempo se estudian las comunidades bacterianas en las cuales, *C. elegans* se encuentra en la naturaleza, y cómo se comporta frente a ellas.

En el laboratorio, *C. elegans* se alimenta rutinariamente con la cepa bacteriana OP50 de *Escherichia coli* B, un auxótrofo de uracilo que forma céspedes delgados en las placas de cultivo para permitir una fácil visualización microscópica del gusano (2). *C. elegans* utiliza el olfato para detectar y distinguir entre las fuentes de alimentos. Poco se sabe acerca de las preferencias de *C. elegans* para las cepas bacterianas aisladas de su entorno natural, así como los compuestos volátiles atractivos

liberados (11,12). Dentro de los compuestos volátiles atractivos liberados se incluyen los alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres y aminas, y puede discriminar entre mezclas de compuestos volátiles liberados por diferentes tipos de bacterias (13,14). Es de sumo interés entender el comportamiento de *C. elegans* frente a bacterias del medio ambiente que podrían estar cambiando su conducta y fisiología.

## 1.2 Marco Teórico o antecedentes de la investigación

### 1.2.1 *C. elegans* como modelo biológico

*C. elegans* es un nemátodo de vida libre, bacterívoro, mide 1 mm de longitud y 80  $\mu\text{m}$  de diámetro en su estado adulto. Fue introducido como modelo por Sydney Brenner en 1974, con el objetivo de estudiar el desarrollo del sistema nervioso central y los mecanismos genéticos que lo subyacen (15). En la actualidad, *C. elegans* es ampliamente utilizado para el estudio de procesos biológicos como la señalización celular, el metabolismo y envejecimiento (16). Es principalmente hermafrodita, con apariciones espontáneas de machos de un 0,2% por generación debido a la no disyunción del cromosoma X (17).

Su ciclo de vida bajo condiciones de laboratorio (20°C) es de tres días y medio, desde su etapa embrionaria pasando por cuatro estadios larvarios desde L1 a L4, hasta llegar a la adultez y gravidez para perpetuar su descendencia (Figura 1). Cada hermafrodita puede generar una progenie de aproximadamente 300 gusanos, y con la presencia de un macho esta puede aumentar hasta 1200 (18). Una de las ventajas es que es translúcido y puede ser examinado a nivel celular *in vivo*. Se pueden observar los núcleos de cada célula utilizando microscopía de contraste de interferencia diferencial Nomarski. Con ello, permitió el estudio completo del proceso de división celular desde el huevo hasta su adultez (19,20). Además de una completa descripción anatómica, el linaje celular está caracterizado, conociéndose el destino físico de cada una sus células (20).

*C. elegans* tiene 1062 células somáticas, de las cuales 302 son neuronas, con un patrón de conexiones sinápticas conocido e invariante (21). Este conocimiento ha permitido establecer circuitos neuronales asociados a diversos comportamientos tales como la mecanosensación (22). Otras ventajas son el uso de marcadores fluorescentes, que permite observar células individuales, facilita el seguimiento y observación de procesos degenerativos y regenerativos de ciertos tipos celulares como neuronas. Debido a la auto fertilización de los hermafroditas, su linaje es invariable

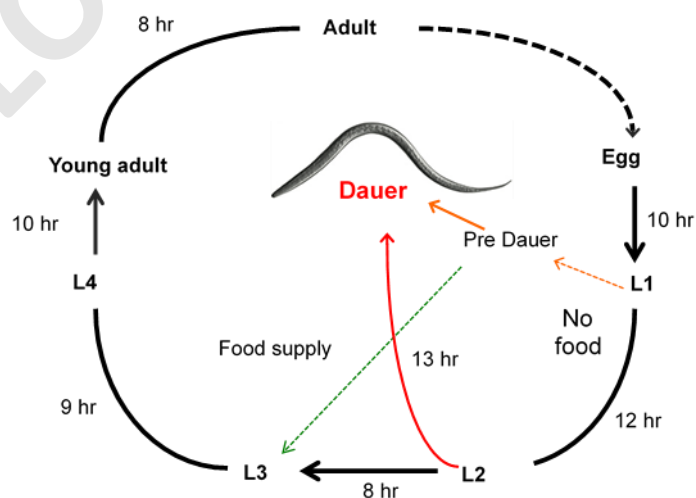


(23,24). Adicionalmente, *C. elegans* es un potente modelo para la manipulación genética, ya sea por mutagénesis (15) o usando ARN de interferencia (ARNi) (25-27). Además, existen cepas mutantes con una gran variedad de comportamientos y fenotipos, que están disponibles para la comunidad de investigadores que trabajan con gusanos.

En 1998 se publicó el genoma completo de *C. elegans* con un tamaño de 97 Mb y como el primer organismo multicelular en ser secuenciado (28,29). La investigación del ADN de *C. elegans* revela homólogos de muchos genes humanos, y el desarrollo de recursos como bibliotecas de ARNi (25) y el proyecto del millón de mutaciones (31) permiten la interrogante global del genoma. Sin embargo, más del 40% del repertorio de genes del gusano todavía no tiene una función conocida (30).

*C. elegans* realiza una gran variedad de comportamientos tales como locomoción, alimentación, defecación, postura de huevos, respuesta sensorial al tacto, olfato y gusto, así como complejos comportamientos como apareamiento, aprendizaje y la entrada a dauer (32).

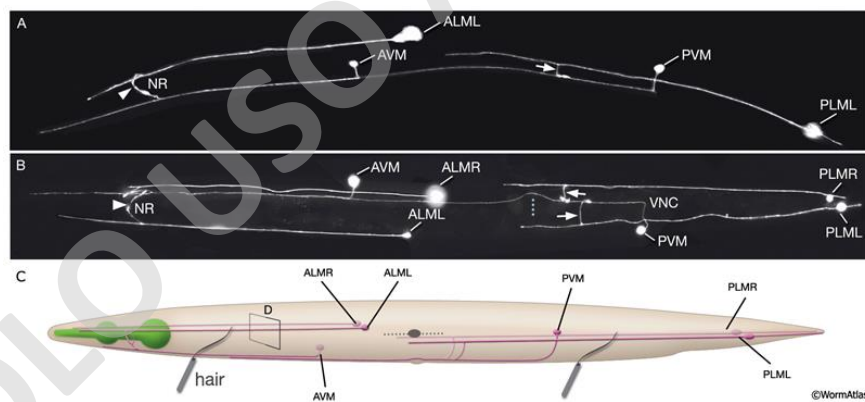
Junto a su accesibilidad como modelo de estudio, la comunidad de investigadores que trabaja con *C. elegans* tiene diversos recursos en línea a su disposición. Las principales fuentes de datos son Wormbase (33) y WORMATLAS (34) que entregan información actualizada sobre genes individuales, patrones de expresión génica, fenotipos mutantes, ontología génica, función de proteínas e información sobre más de 5500 interacciones proteicas, entre otros. Asimismo, el *Caenorhabditis* Genetics Center (<http://biosci.umn.edu/CGC/CGChomepage.htm>), almacena una gran variedad de cepas mutantes disponibles a la comunidad para facilitar el uso y manejo de *C. elegans*.



**Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *C. elegans*.** Se observa el tiempo promedio en horas que dura cada transición de un estadio larvario a otro en el desarrollo de *C. elegans*. La larva dauer se forma cuando las condiciones ambientales no son adecuadas para el desarrollo, tales como sobrepoblación, falta de comida y altas temperaturas. El ciclo de desarrollo está descrito bajo 20°C y alimentándose con *E. coli* OP50.

### 1.2.2 Modelo de neurodegeneración en el laboratorio

Como se mencionó anteriormente, *C. elegans* posee un sistema nervioso compuesto por 302 neuronas (20), divididas en dos grandes grupos: sistema nervioso somático (282 neuronas) y faríngeo (20 neuronas). *C. elegans* depende de seis neuronas sensoriales para detectar el tacto suave, que responden a estímulos como la composición del terreno en el cual se desplaza, animales circundantes de todo tipo, y escapar de posibles depredadores (22, 35). Las neuronas que conforman este circuito son denominadas células microtubulares por su composición intracelular de protofilamentos (36). Con ello, cuatro mecanoreceptores se ubican lateralmente, dos en la mitad anterior del gusano (ALMR y ALML), dos en la mitad posterior (PLMR y PLML), y dos se ubican ventralmente, la AVM (microtúbulo anterior ventral) en la mitad anterior y la PVM (microtúbulo ventral posterior) en la mitad posterior. Las cuatro neuronas laterales son de origen embrionario, mientras que las neuronas ventrales son post-embriónicas (22, 37) (Figura 2). Por su distribución, las seis neuronas del tacto abarcan todo el gusano para censar con todo su cuerpo estímulos mecánicos suaves, y responder con cambios en la velocidad y dirección del movimiento (22).



**Figura 2. Esquema del circuito del tacto suave de *C. elegans*.** Circuito del tacto suave formado por seis neuronas mecanosensoras, AVM, PVM, PLM y ALM. **A.** Ubicación espacial de las seis neuronas. **B.** Descripción de la conexión entre ellas. Su distribución permite cubrir todo el cuerpo del gusano. **C.** Representación gráfica de las neuronas respecto de los puntos de estimulación para el tacto suave. Figura extraída de Alkema *et al.*, 2012.

Uno de los puntos importantes del trabajo con el tacto suave fue entender las bases moleculares de la mecanotransducción. El tacto suave representa un estímulo mecánico que puede ser gatillado por elementos en su entorno natural y que ayudan a censar el exterior (38). Se realizó mutagénesis

saturantes con bromuro de etidio y posterior al tratamiento se analizó a gusanos que perdieran la habilidad de responder al tacto suave. Los candidatos que se encontraron se denominaron *mec* (*mechanosensory defective*), que codifican proteínas que forman parte del complejo mecanotransductor, proteínas de la matriz extracelular, factores de transcripción, reguladores de empalme alternativo (*splicing* alternativo), entre otros. Los principales elementos del complejo mecanotransductor son las subunidades MEC-4 (39,40) y MEC-10 (41) pertenecientes a la familia de degenerinas y canales epiteliales de sodio (Na<sup>+</sup>).

La proteína MEC-4 se expresa exclusivamente en las seis neuronas del tacto (42) y MEC-10 se encuentra en las seis neuronas del tacto y en las neuronas sensoriales FLP y PVD, que median la respuesta al estiramiento (41). Los dominios extracelulares de ambas proteínas están asociados a una especializada matriz extracelular específica de las células del tacto. En cambio, los dominios intracelulares MEC-4 están asociados a los microtúbulos, MEC-12 y MEC-7,  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina respectivamente, mediante la acción de MEC-2, una proteína tipo estomatina (43). MEC-6 es una proteína de transmembrana que posee una actividad peroxidasa, actúa como una subunidad auxiliar, favoreciendo la actividad del canal MEC-4 (44).

El estímulo mecánico activa el complejo mecanotransductor, genera la apertura del canal y permite el ingreso de Na<sup>+</sup> a la célula (45). La entrada de Na<sup>+</sup> desencadena la respuesta de la neurona y la integración perceptiva del estímulo sensitivo. Estudios sobre el funcionamiento de MEC-4 descubrieron que las mutaciones específicas *e1611*, *u231*, y *u56* en el gen *mec-4*, producen la proteína defectuosa MEC-4(d) y la muerte progresiva en las neuronas del tacto, mediante necrosis (39). La mutación *u231* (39,40) provoca la apertura constitutiva del canal, favoreciendo el ingreso de Na<sup>+</sup> en altas cantidades al interior de la célula y la entrada de Ca<sup>2+</sup> por el tipo del canal, fundamental en el proceso de muerte neuronal (45). La entrada de Ca<sup>2+</sup> a través del canal MEC-4d y la posterior salida de más Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico son claves en la muerte neuronal mediada por la mutación *mec-4d* (46). El Ca<sup>2+</sup> citoplasmático en altas concentraciones es citotóxico, ya que activa enzimas tipo proteasas y genera disfunción mitocondrial, lo que desencadena la muerte neuronal por necrosis (47).

La mutación *mec-4d(e1611)* y la expresión específica de la proteína fluorescente verde (GFP) en las neuronas mecanoreceptoras son un excelente modelo para la visualización *in vivo* de procesos neurodegenerativos. Las neuronas embrionarias ALM y PLM ya han degenerado cuando el gusano

eclosiona, mientras que la AVM nace a las 12 horas post-eclosión, permitiendo la visualización completa del proceso degenerativo (48).

### **1.2.3 Nemátodos y bacterias: concepto de holobionte**

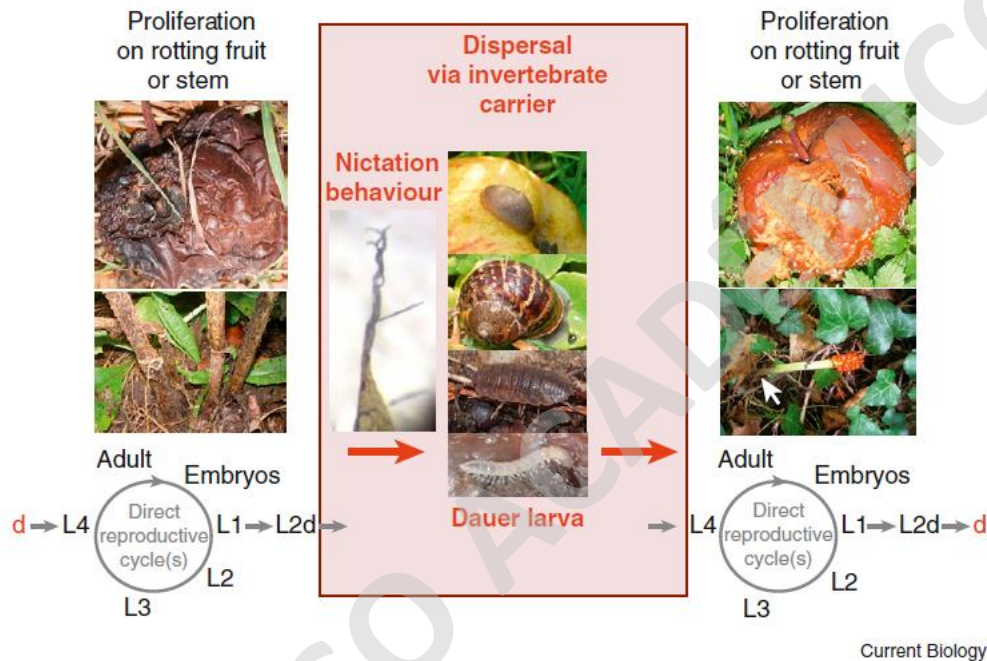
Las bacterias fueron los primeros habitantes en la Tierra, desde hace al menos 3.500 millones de años, y es probable que contribuyan al origen y evolución de los animales que se encuentran en la actualidad (49). Aunque el origen del grupo de los metazoos es incierto, los registros fósiles parecidos a gusanos sugieren que los nemátodos existieron ya en el supereón precámbrico (50). Los gusanos fueron uno de los primeros animales en la Tierra, por lo que su adaptación mutua con las bacterias apunta a una notable plasticidad genética, subyacente a estrategias moleculares y de comportamiento de rápida evolución para la supervivencia.

En este contexto, los nemátodos y las bacterias han tenido tiempo de mejorar, adaptar y aprender estrategias para convivir. Son un excelente modelo de "holobionte" para estudiar las relaciones entre especies (51). Se entiende por holobionte a entidades formadas por la asociación de diferentes especies que dan lugar a unidades ecológicas (52). Después de su encuentro, el holobionte cambia a muchos niveles de simbiosis y estrategias de supervivencia a lo largo del tiempo.

El éxito del filo o *phylum* nematoda en poblar prácticamente cada nicho, reside en parte en su capacidad para establecer relaciones productivas con bacterias que pueblan esos entornos. En la naturaleza, *C. elegans* vive en el suelo y se alimenta de una gran diversidad de bacterias comensales y patógenas, que proporcionan nutrientes y pueden causar enfermedades. Sin embargo, se ha demostrado que otras bacterias son capaces de pasar intactas a través del sistema digestivo y reproducirse en el intestino del gusano (53). El tipo de bacteria de la cual se alimenta *C. elegans* influye fuertemente en la fisiología, desarrollo y comportamiento (54).

Los gusanos tienen preferencias alimenticias, distinguen los alimentos que son benéficos de los que son dañinos para su salud (14). Aunque los determinantes bacterianos del comportamiento y la fisiología aún no son claros, se han descrito algunas moléculas bacterianas específicas que influyen en la tasa de desarrollo, como la vitamina B12 (55). Algunas de las estrategias a corto plazo utilizadas por los gusanos incluyen aprender a evitar las bacterias patógenas (11) y el despliegue de péptidos antibacterianos en el intestino (56).

En un contexto filogenético y de biogeografía, el género *Caenorhabditis* actualmente comprende alrededor de 25 especies descritas, de las cuales solo siete se han mantenido en un laboratorio vivas o congeladas. Aunque las especies de *Caenorhabditis* que forman el "grupo elegans" son morfológicamente similares, son muy divergentes a nivel genético (57) (Figura 3). Las comunidades microbianas, sin duda, juegan un papel crucial en la ecología del gusano y han dado forma a muchas características de su biología.



**Figura 3: Ciclo de vida de *C. elegans* en su hábitat natural.** *C. elegans* prolifera en varios tipos de material vegetal en descomposición, como las frutas. Las larvas dauer pueden dispersarse activamente para colonizar nuevas fuentes de alimentos. Paralelamente, su comportamiento de nictación, agitándose de pie sobre su cola en superficies puntiagudas como hojas, puede permitir dispersarse a través de transportadores, como babosas, caracoles, isópodos o miriápodos, hasta que se encuentre una nueva fuente de alimento, donde el desarrollo reanuda en L3 post-dauer. Figura extraída de Félix *et al.*, 2010.

#### 1.2.4 *C. elegans* y microbiota intestinal: modelo de estudio bacterívoro

La microbiota del humano está compuesta por bacterias, arqueas, virus y microorganismos eucariotas que residen en nuestro cuerpo. Estos microorganismos tienen un tremendo potencial para impactar nuestra fisiología, tanto en la salud como en la enfermedad (58). Contribuyen con funciones básicas como metabólicas, protegen contra patógenos y entrenan nuestro sistema inmune (59). Hasta hace poco, casi toda la investigación en *C. elegans* se realiza en ausencia de su microbiota nativa. La microbiota de *C. elegans* está enriquecida y en algunos casos, es selectiva para

distintos filotipos en comparación a muestras que provienen de diferentes sustratos en donde se encuentran como frutas y materia vegetal en descomposición.

Dentro de los grupos bacterianos dominantes incluyen varias Gamma-proteobacteria como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae* y *Xanthomonodaceae* y Bacteroidetes como *Sphingobacteriaceae*, *Weeksellaceae*, *Flavobacteriaceae* (60). El estudio de la microbiota en *C. elegans* es un campo de estudio con una evolución natural constante, porque varias características hacen que este nemátodo sea ideal para el análisis experimental de las interacciones huésped-microorganismo.

En primer lugar, es altamente susceptible a la manipulación genética. En segundo lugar, la presencia de microorganismos se puede controlar de manera eficiente utilizando un tratamiento con hipoclorito de sodio. Esta manipulación permite la esterilización de la muestra y la disolución de los gusanos grávidos, liberando los huevos en una solución. Los huevos presentan un recubrimiento que evita su degradación, esto permite el cultivo de nemátodos en condiciones axénicas o monoxénicas (61). En tercer lugar, el nemátodo es transparente, de modo que la colonización de microorganismos en el intestino se puede visualizar fácilmente mediante microscopía simple. Finalmente, varias lecturas de historia de vida relevantes para estudiar las interacciones de la microbiota de *C. elegans* están bien establecidas: por ejemplo, aquellas relacionadas con la resistencia al estrés, crecimiento de la población y la fecundidad (18). En el laboratorio, *C. elegans* existe típicamente en cultivo monoxénico.

La simbiosis que se genera de la interacción huésped-microorganismo existe en casi todos los animales, y las bacterias simbióticas pueden ser benéficas, dañinas o inocuas para el huésped. Por ejemplo, las cepas inofensivas como *E. coli* que se encuentran comúnmente en el intestino son una parte normal de la microbiota intestinal. Con ello, pueden beneficiar a sus huéspedes al producir vitamina K (62) y evitar que las bacterias patógenas colonicen el intestino (63,64). Otros puntos importantes son la exploración de componentes alimenticios, candidatos a fármacos (65) e identificación de nuevas cepas probióticas antioxidantes para uso potencial en animales y humanos (66).

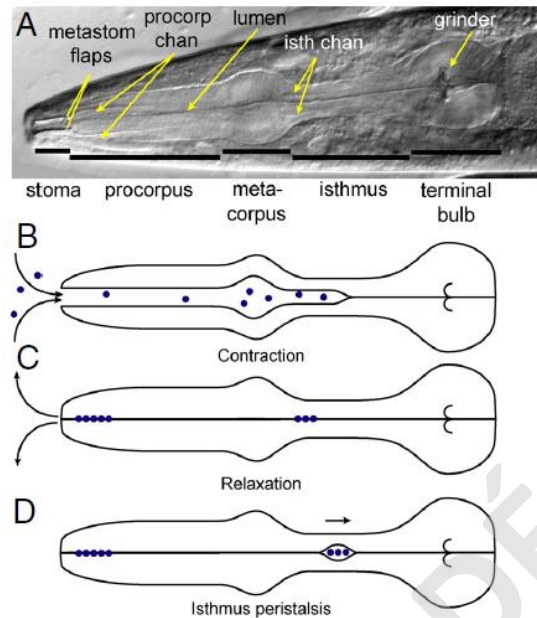
### 1.2.5 Alimentación y conducta

Como se mencionó anteriormente, los organismos están facultados de ser capaces de discernir la comida en base a diferentes características como su aporte nutricional y aroma. Con ello, los animales pueden obtener y alimentarse de diferente manera. *C. elegans* se denomina un alimentador de filtro: atrae las bacterias suspendidas en líquido hacia su faringe, atrapa las bacterias y expulsa el líquido hacia el exterior. La cavidad bucal y sus aletas metastomales regulan el flujo de suspensiones bacterianas densas y excluyen el ingreso de partículas excesivamente grandes a la faringe (67).

En la anatomía del gusano, la faringe es un tubo neuromuscular de doble bulbo que conecta el estoma y el intestino (68). La faringe está separada del resto del cuerpo por la lámina basal, una formación extracelular de tejido conectivo, contiene 20 células musculares y 20 neuronas. Se descubrió que las motoneuronas colinérgicas (MC) se requerían individualmente para un bombeo rápido en la presencia de alimentos (69). El bombeo consta de dos fases: (i) contracción del músculo faríngeo, que abre el lumen faríngeo y atrae las bacterias en suspensión, y (ii) relajación, que cierra rápidamente el lumen (Figura 4). La relajación es clave para filtrar lo que entra a la faringe, porque el cierre del lumen expulsa fluidos mientras las partículas de comida permanecen atrapadas en la faringe (70).

Dentro del bulbo terminal se encuentra el *grinder* (tritador) una región de la cutícula que forma un conjunto tripartito de estructuras entrelazadas parecidas a dientes a través de las cuales se procesan todos los alimentos y ayudan a la digestión (71). Sin embargo, para el segundo día de la edad adulta, la mayoría de los gusanos contendrán algunas bacterias vivas en sus intestinos (72).

El deterioro en la eficiencia del *grinder* es un factor común en el envejecimiento de *C. elegans* (73) y también se considera un factor de riesgo para infecciones de patógenos como *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium (74). Las bacterias que ingresan a la faringe de *C. elegans* durante la contracción se regurgitarían durante la relajación (71). La tasa de bombeo depende del historial de alimentación, calidad y familiaridad de los alimentos (75). Además, los ensayos de alimentación tradicionales se basan en el conteo manual del número medio de bombeos en intervalos breves de tiempo (76). El movimiento de bombeo faríngeo se detecta más fácilmente a través del movimiento del *grinder*.



**Figura 4: Anatomía de la faringe y su comportamiento.** **A.** Imagen DIC de la parte anterior del gusano adulto (campo de visión, 177 x 57  $\mu\text{m}$ ). El corpus incluye el procorpus y el metacorus. El intestino es posterior al bulbo terminal. **B-C.** Bombeo faríngeo. La contracción del músculo faríngeo extrae líquido que contiene partículas de comida suspendidas (puntos) en el lumen faríngeo. La relajación expulsa fluidos mientras atrapa partículas. Las flechas curvas indican flujo de fluidos. **D.** El peristaltismo del istmo transporta alimentos desde el istmo anterior hasta el bulbo terminal y el intestino (3). Figura extraída de Samuel *et al.*, 2009.

Dentro de la conducta y alimentación, *C. elegans* discrimina los alimentos tanto físicamente, según el tamaño, como químicamente, según el sabor y el olfato (77). Puede ajustar sus preferencias olfativas después de la exposición a bacterias patógenas, evitando los olores de patógenos y aumentando su atracción por olores de bacterias no patógenas familiares (11). El estado conductual de *C. elegans* varía en respuesta a los suministros bacterianos.

La cantidad y calidad de los alimentos pueden modular las etapas de comportamiento de *C. elegans*. Es por ello que al buscar una buena comida presentan dos modos de movimiento: *dwelling* y *roaming*. El *dwelling*, es un tipo de movimiento con ceses y giros recurrentes que es común cuando los animales están en buena comida. El *roaming* que es un tipo de movimiento rápido e incesante que generalmente ocurre cuando los gusanos están en una bacteria con aporte nutricional bajo o mediocre (69). Si los gusanos reciben suficiente comida de alta calidad, finalmente se saturarán, dejarán de comer y moverse. Las respuestas adaptativas conductuales requieren la comunicación activa entre las bacterias y el intestino del animal (78).



*C. elegans* puede distinguir entre los olores de varias especies de bacterias y muestra fuertes preferencias innatas por especies bacterianas particulares (1,5,12,14). Identificar estas claves químicas etológicamente relevantes es esencial para comprender la base molecular de las interacciones entre *C. elegans* y microorganismos (79).

Recientemente, se han identificado compuestos volátiles atractivos específicos importantes para la atracción a bacterias particulares (80). El diacetilo ha sido identificado como un atractivo compuesto volátil que atrae a una bacteria no patógena, *Lactobacillus sp.* que fue aislado de fruta podrida donde también se encontró *C. elegans* (81).

Con lo descrito anteriormente, *C. elegans* es un excelente modelo no solo para el descubrimiento de genes y sus funciones asociadas, sino que además para entender los mecanismos moleculares que subyacen cada uno de estos fenómenos. Entre los organismos modelo utilizados para estudiar acciones recíprocas entre microorganismos y huéspedes, *C. elegans* puede ser el más ventajoso en el contexto de sus atributos únicos como el ciclo de vida corto, facilidad de mantención en el laboratorio y la disponibilidad de diferentes mutantes genéticos. Además, proporciona un modelo ordenado para investigar la microbiota intestinal, mediante la cual el nemátodo se cultiva en placas que contienen un césped de la bacteria deseada y luego se examina para determinar la colonización intestinal, crecimiento y otros fenotipos.

### **1.3 Justificación de la investigación**

Si bien más de 15,000 artículos sobre diversos aspectos biológicos de *C. elegans* atestiguan las virtudes indiscutibles del gusano como un organismo modelo principal, su biología en la naturaleza sigue siendo misteriosa (57). Los estudios sobre la función de la microbiota serán fundamentales para comprender su papel en la homeostasis humana y la patogénesis de la enfermedad. La microbiota intestinal es esencial para la digestión y nutrición del huésped, y puede generar nutrientes a partir de sustratos que de otro modo no serían digeribles por el huésped (59).

*C. elegans* es un organismo modelo importante, tanto desde la dimensión de la patogénesis como desde el punto de vista del metabolismo, envejecimiento y la biología del desarrollo. Por lo tanto, una comunidad natural simplificada relacionada con la que se encuentra en la naturaleza ahora se puede estudiar en el laboratorio por su impacto en su fisiología (2). Además, no solo es pionero en un sistema simple con un animal de rápido crecimiento que se puede usar para la ecología

experimental de la comunidad en un entorno estandarizado, sino que también se une a otros sistemas modelo (82, 83, 84) para facilitar un mayor examen de las vías conservadas que median la influencia de los microbios naturales en la fisiología del huésped y viceversa.

Es por ello que nos planteamos la siguiente pregunta biológica: ¿cómo influirán bacterias del medio ambiente de forma individual y como consorcio en la conducta y fisiología del gusano? Con esto, hemos planteado en crear una microbiota simplificada relacionada con la que se encuentra en la naturaleza para determinar diferencias en la conducta del gusano frente a las bacterias que están domesticadas en el laboratorio.

Parte de mi motivación por realizar esta investigación se debe a mi principal interés en la biología de sistemas y de como muchos factores pueden estar interviniendo en un proceso en particular. Agregar que el estudio de las comunidades bacterianas y la salud presenta un paso hacia el futuro de posibles terapias y de una mayor comprensión sobre nuestra alimentación como sociedad ya que “somos lo que comemos”. Dentro de los objetivos de la investigación en general es comprender y poder identificar las moléculas que intervienen en mejorar o empeorar la fisiología del gusano, e identificar un posible consorcio bacteriano que podría ser de ayuda para el gusano. Nuestra comprensión de la relación entre *C. elegans* y *E. coli* OP50 está evolucionando de un simple modelo de organismo/sustrato estático a un modelo más dinámico en el que los roles del huésped y el microbio se alteran en el transcurso de su asociación.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

El cambio en la dieta bacteriana estándar del laboratorio por bacterias del medio ambiente y la mezcla entre ellas modifica la conducta y fisiología de *Caenorhabditis elegans*.

### 2.2 Objetivo General

Determinar la identidad de los componentes de un microbiota natural de *C. elegans* y los efectos conductuales que causa.

### 2.3 Objetivos Específicos

- 1) Identificar y caracterizar los componentes de una microbiota natural de *C. elegans* mediante técnicas genómicas y microbiológicas.
- 2) Cuantificar los parámetros conductuales y fisiológicos de *C. elegans* como el bombeo faríngeo, defecación, preferencia entre bacterias, desarrollo, integridad y funcionalidad neuronal frente a los aislados y los consorcios.

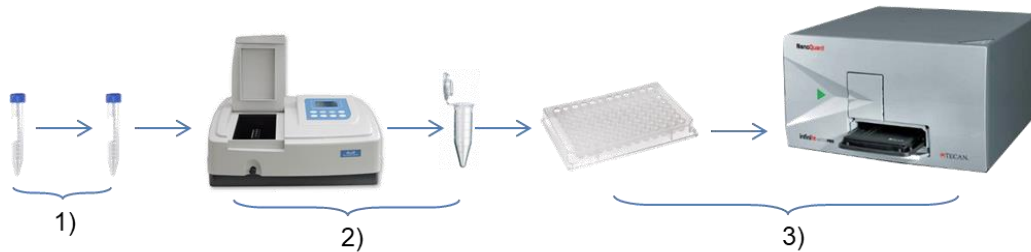
### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Cultivo y aislamiento de bacterias**

El cultivo de los aislados bacterianos se realizó utilizando medio de cultivo Luria Bertani (LB). Se creció las bacterias a 30°C en un shaker (Lab Companion SI-300R Refrigerated Benchtop Shaker) a 200 r.p.m. Para los ensayos y experimentos se ocupó preinóculos de 3 mL de medio LB líquido sin antibiótico en tubos Falcon de 15 mL que se dejó crecer overnight (O.N.) (14-16 horas) con los parámetros anteriores. Para el aislamiento de colonias se utilizó placas de 60 mm con LB sólido. A partir de un cultivo líquido fresco de cada bacteria se flameó el asa de metal en el mechero, después se sumergió el asa en el cultivo líquido. Luego, se sembró mediante técnica de estrías y se flameó el asa cada vez para repetir el procedimiento. Se dejó las placas en un incubador (Thermo Scientific Heratherm Microbiological Incubator IMC18) a 30°C O.N. Una vez crecían las bacterias se guardó las placas en la nevera a 4°C para ser utilizadas en otros experimentos y detener su crecimiento.

#### **3.2 Curva de crecimiento bacteriano**

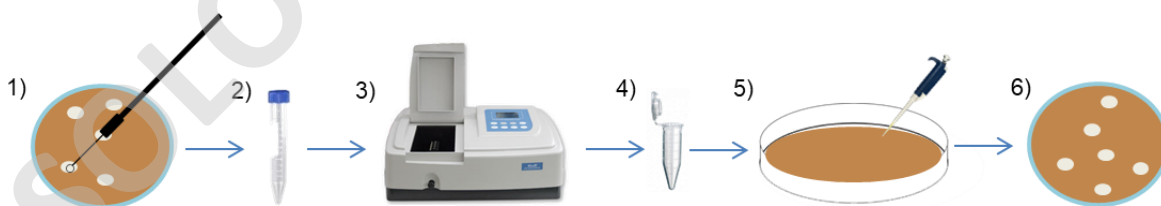
Para la confección de la curva de crecimiento de las bacterias se utilizó Microplacas Nunc™ MicroWell™ de 96 pocillos (ThermoFisher Scientific) para ser leídas en el Nanoquant Tecan Infinite 200Pro. Se creció un preinóculo de cada bacteria de 3 mL en medio LB líquido sin antibiótico en un tubo Falcon de 15 mL en los parámetros descritos anteriormente. El preinóculo se creció en 10 mL de LB líquido sin antibiótico en un tubo Falcon de 50 mL y después se diluyó para alcanzar una densidad óptica (D.O.) aproximadamente de 0,1 nm, la cual se midió en el espectrofotómetro (BK-UV1900/BK-V1900 Scanning UV/VIS Spectrophotometer) a 600 nm para tener un cultivo inicial. En cada pocillo se colocó 50 µl de cada bacteria y 150 µl LB líquido sin antibiótico con un volumen final de 200 µl en cada pocillo. Como control se llenó la segunda hilera de pocillos con 200 µl de medio LB sin antibiótico. Los parámetros de crecimiento se establecieron en base un script preestablecido por el equipo. Se dejó a 30°C con agitación orbital de 200 r.p.m. con mediciones cada 10 minutos durante 18 horas.



**Figura 5: Esquema del diseño experimental de la cinética de crecimiento bacteriano empleado en esta investigación.** 1) Crecimiento bacteriano a partir de un preinóculo de bacterias que creció en condiciones descritas en los métodos. 2) Medición de absorbancia a 600 nm de las muestras de bacteria y su respectiva dilución de cada muestra en tubos eppendorf. 3) Curva de crecimiento en placas de 96 pocillos y equipo Nanoquant Tecan Infinite 200Pro.

### 3.3 Dilución seriada y Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

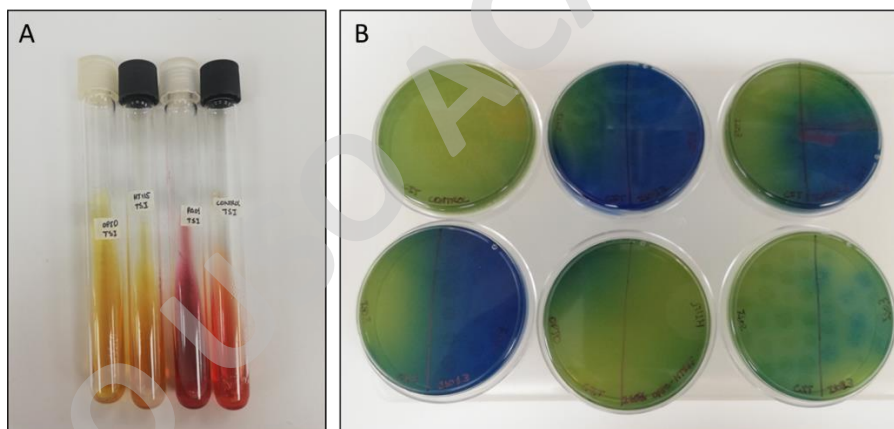
Para la determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada aislado bacteriano a diferentes absorbancias (D.O.: 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 nm) se realizó una dilución seriada y una siembra en placas de LB sólido sin antibiótico para su posterior conteo. Se tomó una colonia de cada aislado bacteriano y se creció en 20 mL de medio LB líquido sin antibiótico en tubos Falcon de 50 mL en las condiciones descritas anteriormente. Se tomó alícuotas de 1 mL cada 1 hora para ir medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm. Una vez se obtuvo la absorbancia esperada, se preparó 6 diluciones a partir de 1 ml de cultivo. La muestra se diluyó en tubos eppendorf de 2 mL, se tomó 100  $\mu$ l del tubo, se diluyó en 900  $\mu$ l de agua destilada y se inoculó 20  $\mu$ l del tubo en la placa de LB sólido sin antibiótico. Con ayuda de un rastrillo de vidrio se esparció la muestra por la placa hasta que se secó por completo. Finalmente, se incubó las placas a 30 °C O.N. para realizar el conteo de colonias al día siguiente.



**Figura 6: Esquema experimental de dilución seriada y conteo de colonias.** 1) Se tomó una colonia de la placa de LB sólido con el asa de metal. 2) Se colocó en un tubo Falcon de 15 mL con medio líquido LB para crecerla O.N. 3) Se midió la absorbancia de las bacterias en el espectrofotómetro. 4) Se realizó 6 diluciones a partir de 1 mL de cultivo y se extrajo 100  $\mu$ l de cada tubo para completarlo con 900  $\mu$ l de agua destilada. 5) Se sembró 20  $\mu$ l del tubo eppendorf con bacteria con un rastrillo de vidrio. 6) Se incubó las placas para realizar su conteo al día siguiente.

### 3.4 Batería Bioquímica

Para la elaboración de la batería bioquímica se preparó medios especiales para que crecieran los aislados bacterianos. La lista de agares fue: Agar Corriente (COR), Agar Urea (UREA), Agar Citrato (CIT), Agar Triple-Sugar-Iron (TSI), Agar Lysine-Iron-Agar (LIA) y medio Movilidad-Indol-Ornitina (MIO) (Tabla S2). La preparación y medida de los agares se encuentra en el material suplementario. Se separó en dos grupos para analizar la fisiotaxonomía de las bacterias: los aislados individuales y como consorcio en un medio. Para el primer grupo se preparó los agares en tubos de ensayo de vidrio y a partir de un cultivo líquido fresco se sembró una vez se secó el agar. Se preparó un total de 42 tubos con los diferentes agares (6 tubos con cada bacteria más un tubo control). Se creció *E. coli* OP50, *E. coli* HT115, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) PAO1 y los tres aislados bacterianos (Figura 7A). Para el segundo grupo se preparó 36 placas de 30 mm con los diferentes agares y no se utilizó la *P. aeruginosa* PAO1. Se dividió las placas en segmentos para colocar una gota de cada cultivo por porción de la placa (Figura 7B). Todas las baterías bioquímicas crecieron a 30°C en un incubador O.N.



**Figura 7: Clasificación fisiotaxonomía mediante una batería bioquímica de bacterias. A.** Fotografía de batería bioquímica de bacterias individuales en tubos de ensayo de vidrio con Agar TSI. **B.** Fotografía de batería bioquímica de las mezclas de los aislados bacterianos en placas de 30 mm en Agar Citrato.

### 3.5 Tinción de Gram

Para seguir caracterizando a los aislados bacterianos se realizó una tinción de Gram. Para esto se preparó un frotis bacteriano del aislado 1, 2, 3, *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 a partir de una colonia. En el portaobjetos se colocó una gota de agua destilada, se flameó el asa en el mechero y luego se enfrió en la placa de cada bacteria. Se tomó una colonia de bacteria y se disolvió en el agua destilada para ser esparcida a lo largo de portaobjetos. Se fijó el frotis exponiéndolo a la llama del mechero

hasta secarlo. Para la tinción, se verificó que la muestra no estuviese caliente con el dorso de la mano, luego se cubrió completamente con cristal violeta durante tres minutos. Después, se dejó escurrir el cristal violeta y se agregó solución Lugol por dos minutos. A continuación, se lavó las muestras alternadamente con alcohol-acetona 60% y agua destilada. Luego, se dejó escurrir y se agregó safranina al 1% por un minuto. Finalmente, se lavó las muestras con agua y se secó con papel absorbente para ser observadas en el microscopio óptico con inmersión (100 X).

### 3.6 Batería de antibióticos

Se realizó un ensayo de sensibilidad y resistencia a 8 antibióticos para los aislados bacterianos, como control se utilizó *E. coli* OP50, *E. coli* HT115 y una porción sin bacteria para verificar una posible contaminación. Se utilizó ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), kanamicina (KANA), azitromicina (AZT), ácido nalidíxico (NAL), cloranfenicol (CLO), estreptomina (STREP) y carbemilina (CARBE). Se preparó placas de 30 mm con LB sólido para sembrar las bacterias, se colocó 30 µl de cada antibiótico en las placas y con un marcador se separó la placa en 6 secciones. Se flameó el asa de metal en el mechero, se esperó a que se enfriara para sumergirla en el cultivo líquido y se sembró cada bacteria en las placas con antibiótico. Se incubó las placas O.N. a 30°C.

### 3.7 Criterios macroscópicos para colonias

Para complementar la caracterización de los aislados bacterianos, se realizó una descripción macroscópica de las colonias de los aislados y de las bacterias control *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115. Para ello se creció las bacterias en 5 mL de medio LB líquido sin antibiótico en tubos Falcon de 15 mL por 3 horas. Después se realizó el protocolo de aislamiento por estrías y se incubó a 30°C O.N. Una vez crecidas las colonias, se clasificó según los siguientes criterios de la Tabla 1.

**Tabla 1:** Criterios macroscópicos para describir las colonias bacterianas utilizadas en esta investigación.

Criterio	Características
Tamaño	Grande (mayor a 1 mm de diámetro), Medio (1 mm de diámetro), Pequeño (menor a 1 mm de diámetro).
Forma	Circular, Filamentosa, Irregular, Puntiforme, Rizoide, Ovalado.
Apariencia de la superficie	Brillante, Opaco, Suave, Rugosa, Granular, Cremosa.
Elevación	Plana, Elevada, Convexa, Redonda, Centro elevado, Umbilicada.
Densidad	Opaca, Transparente, Translúcida.
Consistencia	Cremosa, Viscosa, Friable, Membranosa.
Margen	Entera, Ondulada, Lobulada Filamentosa, Rizado.
Color	Negro, Blanco, Naranja, etc.

### 3.8 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico de los aislados bacterianos se creció bajo las condiciones descritas anteriormente hasta alcanzar una D.O. entre 0,4-0,6 nm. Se utilizó el kit comercial Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories). Se tomó 1,8 mL de cultivo fresco a un tubo colector (Collection Tube) de 2 mL estéril y se centrifugó (Centrifuge 5424R, eppendorf) las muestras a 10,000 g (10,519 r.p.m.) por 30 segundos a temperatura ambiente (20-22°C). Se removió el sobrenadante con la micropipeta y se resuspendió el pellet en 300 µl de MicroBead Solution para luego vortexear las muestras. Se transfirió las muestras a un MicroBead Tube, se agregó 50 µl de solución MD1 a cada muestra y se colocaron en el Tissue Lyser (TissueLyser II, Qiagen) a máxima velocidad por 10 minutos. Se centrifugó las muestras a 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo colector nuevo, se agregó 100 µl de solución MD2 y se utilizó el vortex (Corning® LSE™ Vortex Mixer with Standard Tube Head, 230V, EU Plug) por 5 segundos. Se incubó las muestras a 4°C por 5 minutos y se centrifugó a 10,000 g por 1 minuto a temperatura ambiente. Sin tocar el pellet, se transfirió el sobrenadante a un tubo colector limpio, se añadió 900 µl de solución MD3 a las muestras y se mezcló con el vortex por 5 segundos. Se cargó 700 µl de las muestras a la columna (Spin Filter) y se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. Después, se añadió 300 µl de solución MD4 y se centrifugó las muestras a 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el líquido de los tubos para repetir la centrifugación por 1 minuto. Se traspasó las columnas a tubos colectores nuevos, se agregó 50 µl de solución MD5 al centro de la membrana de la columna y se centrifugó las muestras a 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó las columnas y se guardó las



muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se cuantificó las muestras de ADN genómico en un Nanoquant Tecan Infinite 200Pro.

### **3.9 Tratamiento con RNAsa**

Las muestras de ADN genómico de los aislados bacterianos se trataron con RNAsa A de Qiagen para degradar ARN de las muestras. Esta enzima tiene una concentración de 100 mg/mL y por cada 50  $\mu\text{l}$  de ADN se deben agregar 0,5  $\mu\text{l}$  de RNAsa A en un tubo eppendorf estéril. Luego de agregar la enzima a cada muestra, se incubó las muestras por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en el termoblock (Genius Dry Bath Incubator, MD series). Finalmente, se guardó las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.10 Secuenciación muestras bacterianas**

Se secuenció las muestras de ADN genómico de cada aislado bacteriano en las instalaciones de Genoma Mayor SpA, Camino La Pirámide N°5750, Huechuraba, bajo el nombre del proyecto GM1758. Genoma Mayor SpA envió un informe sobre el control de calidad de las muestras en el que incluye electroforesis en gel de agarosa, control de calidad de las genotecas con Agilent 2100 y un control de calidad de las lecturas generadas de cada muestra con FastQC. No se solicitó el trabajo bioinformático.

### **3.11 Ensamble de genomas**

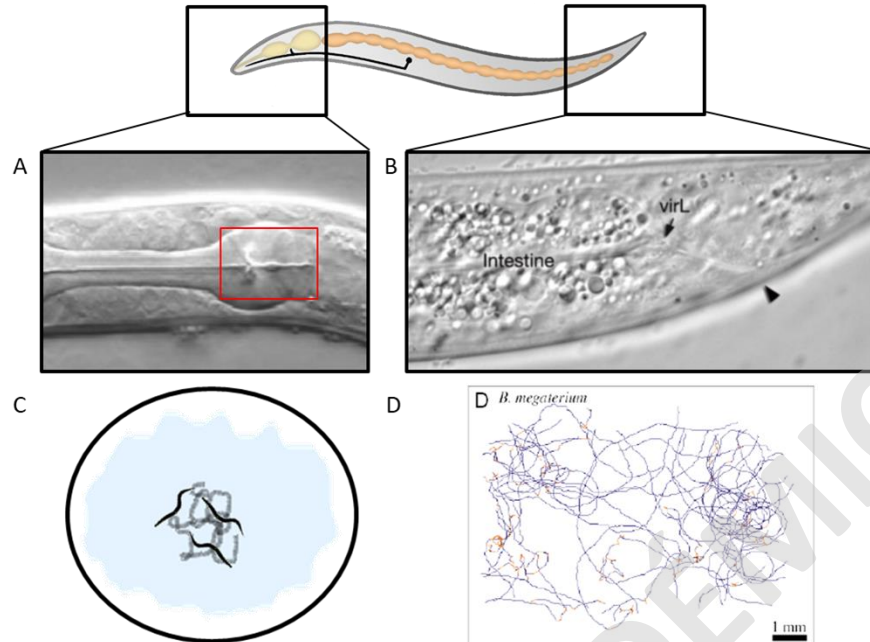
Para el ensamble de los genomas de las muestras de los aislados bacterianos se utilizó los datos crudos (raw data) entregado por la secuenciación. Como las lecturas de las muestras presentaron una buena calidad al ser analizadas en FastQC, no se necesitó hacer el trimming de las lecturas. Para el ensamble de los genomas se trabajó en la consola de Ubuntu (Ubuntu 18.04 LTS) y se instaló el sistema de gestión de paquetes/herramientas conda que está escrito en lenguaje de programación Python. Se utilizó SPAdes que es un algoritmo de ensamble utilizado para genomas de gran tamaño, funciona a través de extremos pareados (paired-ends) y extremos simples (single-ends). Finalmente, una vez obtenidos los ensamblados de cada muestra se utilizó Quast (<http://quast.bioinf.spbau.ru/>) que es una herramienta de evaluación de calidad la cual evalúa los ensamblados del genoma mediante el cálculo de varias métricas (N50, número de contigs, entre otras) y tiene un filtro que solamente analiza los contigs de más de 500 pares de bases (pb).

### 3.12 Análisis Filogenético

Para hacer la filogenia de los aislados bacterianos se utilizó la secuencia del gen *prfA* que codifica para la proteína reguladora de listerolisina. Se realizó construyó un árbol filogenético utilizando el programa MEGA-CC 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Compute Core. Para el método estadístico se utilizó Maximum Likelihood con un ensayo filogenético conocido como método Bootstrap. Finalmente se utilizó un modelo evolutivo GTR +G (Generalised Time-reversible model Gamma distributed).

### 3.13 Ensayo de conducta

Para determinar la conducta del gusano frente a las diferentes dietas bacterianas, se estableció tres criterios para evaluar su conducta: bombeo faríngeo, tiempo de defecación y movimiento en la placa (*dwelling* y *roaming*). Se realizó todos los experimentos con gusanos en estadio L4 y adulto joven, y se visualizó en una lupa estereoscópica (Nikon SMZ745T + aumento Nikon G-AL 2x) para poder observar la faringe y ano del gusano. Para el bombeo faríngeo se cuantificó la cantidad de bombeos por minuto del gusano, se utilizó un contador manual y se estableció que por cada 10 bombeos contables era un click del contador manual. Para el tiempo de defecación se cuantificó el número de veces que el gusano defecó por minuto, para luego anotar el tiempo que se demoró en defecar. Por último, para determinar el movimiento dentro de la placa, se tomó un gusano y se dejó en placas con bacterias que crecieron durante 24 horas a temperatura ambiente. Se observó las huellas del gusano en la primera hora después de colocarlo y se hizo un seguimiento por otra hora más (2 horas en total). Si el gusano muestra movimiento con ceses y giros recurrentes describe como un *dwelling* y si el gusano presenta un movimiento rápido e incesante se describe como *roaming*. Se realizó todos los experimentos en tres réplicas biológicas por triplicado.

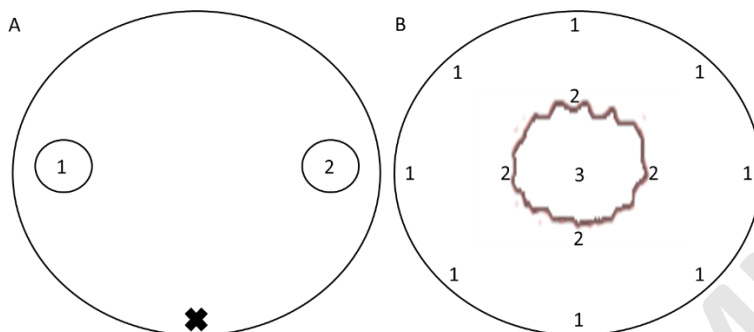


**Figura 8: Representación del ensayo de conducta en *C. elegans*.** **A.** Fotografía en Nomarski de la faringe del gusano, el cuadrado en rojo representa el segundo bulbo faríngeo más próximo al intestino (bulbo terminal) y donde se señala el triturador (*grinder*), esta porción se ocupó para medir el bombeo faríngeo. **B.** Fotografía en Nomarski de la porción posterior del gusano donde se observa la porción final del intestino y el ano con una flecha negra (A-B WormAtlas). **C.** Esquema del movimiento del gusano en la placa con bacterias representando un *dwelling*. **D.** Figura de Avery *et al.*, 2006 que indica en naranja el movimiento tipo *dwelling* y en azul el tipo *roaming* del gusano en la placa utilizando el equipo WormTracker.

### 3.14 Ensayo de preferencia bacteriana

Para el ensayo de preferencia de las bacterias se realizó con dos enfoques: el primero el gusano escoge a qué bacteria prefiere y el segundo en qué lugar de la placa inoculada prefiere estar. Se utilizó los aislados individuales comparados con las bacterias control *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115, los consorcios contra las bacterias control y las bacterias control entre sí. Para el primer caso se preparó placas de NGM sin antibiótico de 60 mm, se inoculó con bacteria a una absorbancia de 0,4 nm en cada lado de la placa generando un césped de aproximadamente 1 cm de diámetro (30  $\mu$ l aproximadamente). Luego, se dejó las placas 24 horas a temperatura ambiente para que se secaran y al otro día se colocó aproximadamente 30 gusanos en estadio L4 alimentados con *E. coli* OP50. Se colocó los gusanos en una placa de NGM sin antibiótico para limpiarlos de bacteria antes de colocarlos en las placas de preferencia. Se estableció una medición inicial de 30 min luego de ser puestos en la placa y se siguió con 1, 2, 3, 4, 12 y 24 horas para su cuantificación. Para el segundo caso, se creció las bacterias hasta alcanzar un D.O. de 0,4 nm, se inoculó 300  $\mu$ l en placas de NGM sin antibiótico y se dejó secar por 24 horas al igual que el caso anterior. Se colocó aproximadamente

30 gusanos en estadio L4 que fueron alimentados con *E. coli* OP50 y se cuantificó su distribución en la placa cada una hora por tres horas. Se realizó todos los casos anteriores con tres réplicas biológicas por triplicado.



**Figura 9: Esquema experimental del ensayo de preferencia de bacterias.** A. Representación de una placa de 60 mm en donde se inoculó bacterias en cada lado de la placa y una X en el lugar donde se deponen los gusanos. B. Representación de una placa de 30 mm en donde se indica con números del 1 (en la periferia de la placa y fuera del césped, *out*), 2 (en el borde del césped, *border*) y 3 (en el césped, *in lawn*) los lugares en donde el gusano se puede localizar y se cuantificó.

### 3.15 Cálculo del índice de preferencia (Choice Index)

Para entender cuánto realmente prefiere el gusano a cada bacteria o consorcio de bacterias se calculó el índice de preferencia (Choice Index) que se utilizó en Ahnn *et al.*, 2009 con utilizando la siguiente fórmula:

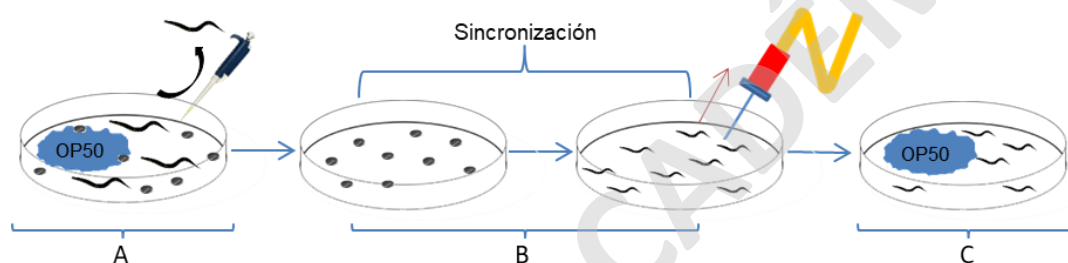
$$\text{Choice index (CI)} = \frac{\text{No. of worms in tested bacteria} - \text{No. of worms in OP50}}{\text{Total number of used worms}}$$

En la fórmula se utiliza el número de gusanos testeados en una bacteria en específico (por ejemplo, ISO1), menos el número de gusanos que escogieron *E. coli* OP50 y dividido por el número total de gusanos que se utilizó para el ensayo de preferencia por cada placa. El índice de preferencia queda determinado por: un valor negativo que representa una completa preferencia hacia *E. coli* OP50, un valor positivo que representa una completa preferencia hacia la bacteria testeada y si es igual a 0 representa una distribución igualitaria dentro de las dos bacterias.

### 3.16 Sincronización de gusanos

Todo experimento que utiliza gusanos se debe partir de una población inicial en su primer estadio larvario (L1) para no tener mezclas de diferentes estadios y sea más fácil su manipulación. Para ello, se lava una placa de NGM con buffer M9 que tenga huevos en ella para remover todos los otros

gusanos sin que los huevos se despeguen de la placa (lavado suave). Se recomienda lavar la placa dos veces y dejar esperar dos horas aproximadamente para la eclosión. Los gusanos que quedan en la placa con huevos pueden ser retirados de forma manual utilizando un pick de platino. Cuando comienzan a eclosionar los huevos, se utiliza una pipeta de boca con una aguja de vidrio que se fabrica estirando la punta de una pipeta Pasteur de vidrio que permite aspirar a los gusanos en estadio L1. Para ello, se recolectó sumergiendo la aguja de vidrio en buffer M9 con AMP en un tubo eppendorf de 2 mL para evitar contaminación. Debido a la capilaridad de la aguja los gusanos son tomados y se colocan aproximadamente entre 30 a 40 gusanos en una placa de NGM con bacteria. El M9 será absorbido por la placa y los gusanos se moverán a la comida. Se dejó los gusanos a 20°C hasta utilizarlos en algún experimento.



**Figura 10: Esquema experimental de sincronización de gusanos.** A. Una placa con *E. coli* OP50 con gusanos grávidos y huevos se lava con buffer M9 para solo dejar los huevos. B. Se esperan dos horas hasta que los huevos eclosionen a gusanos L1 y con ayuda de una pipeta de boca se toman los gusanos para traspasarlos a otra placa. C. Los gusanos son colocados en una placa con NGM inoculada con la bacteria de interés, en este caso *E. coli* OP50.

### 3.17 Curva de desarrollo de gusanos

Para determinar el crecimiento de los gusanos en las diferentes dietas bacterianas se realizó un seguimiento de tres días (24, 48 y 72 horas). Se sincronizó gusanos a partir de placas de NGM con *E. coli* OP50 y se colocó entre 30 a 40 gusanos por placa de bacterias. Una vez se colocó los gusanos L1 en la placa se considera tiempo 0 hrs. Se clasificó en tres categorías para cuantificar el desarrollo del gusano: gusanos menores a L4 (L1-L3), gusanos L4 (L4) y gusanos adultos (Adults). Para la visualización de los gusanos se utilizó una lupa estereoscópica. Se inoculó placas de NGM sin antibiótico con bacterias que se cultivaron hasta alcanzar una D.O. de 0,4 nm que se midió en un espectrofotómetro a 600 nm. Se realizó todos los experimentos con tres réplicas biológicas por triplicado.

### 3.18 Ensayo de neuroprotección

Para el análisis de la morfología de la neurona AVM del gusano *mec-4d*, se sincronizó gusanos en placas de NGM sin antibiótico inoculadas con los aislados bacterianos individuales, mezclados (diadas y triada) y como control se usó *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115. Se esperó 72 horas para poder obtener gusanos en estadio L4 y adultos jóvenes para observar el fenómeno de neurodegeneración. Se tomó aproximadamente 30 gusanos por placa y se montó en un portaobjetos con una cama de agarosa al 2% (pad de agarosa). Se inmovilizó los gusanos en el portaobjetos con 2  $\mu$ l de levamisol 1 mM y se observó en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse Ni). Se clasificó y cuantificó los gusanos en cuatro categorías: axón wild type (AxW), axón truncado largo (AxL), axón truncado corto (AxT), sin axón y soma necrótico (Ax $\emptyset$ ) (Figura 11). Se realizó los experimentos con tres réplicas biológicas por triplicado en cada condición.

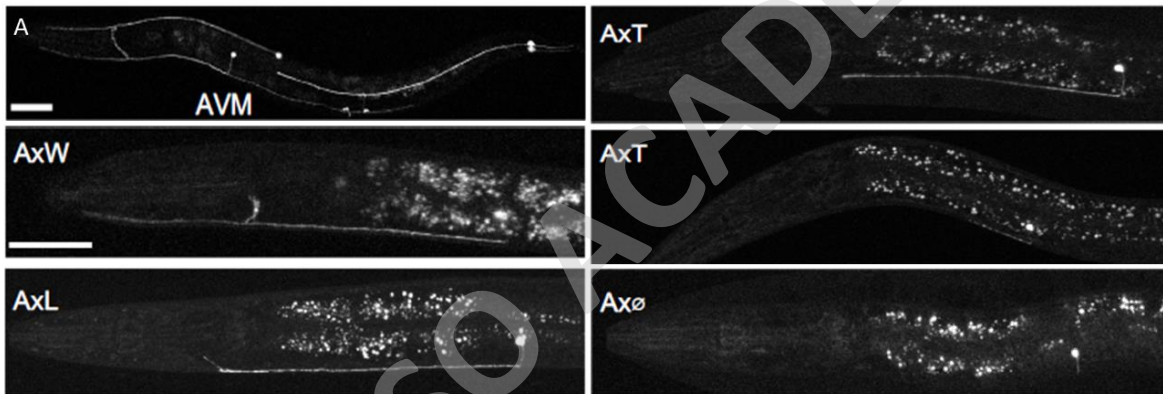


Figura 11: GFP que se expresa en neuronas receptoras táctiles en gusanos de tipo salvaje y *mec-4d* con categorías axonales de la neurona AVM. A. Representa todas las neuronas que pertenecen al complejo mecanoreceptor y se indica la AVM (Urrutia *et al.*, 2019).

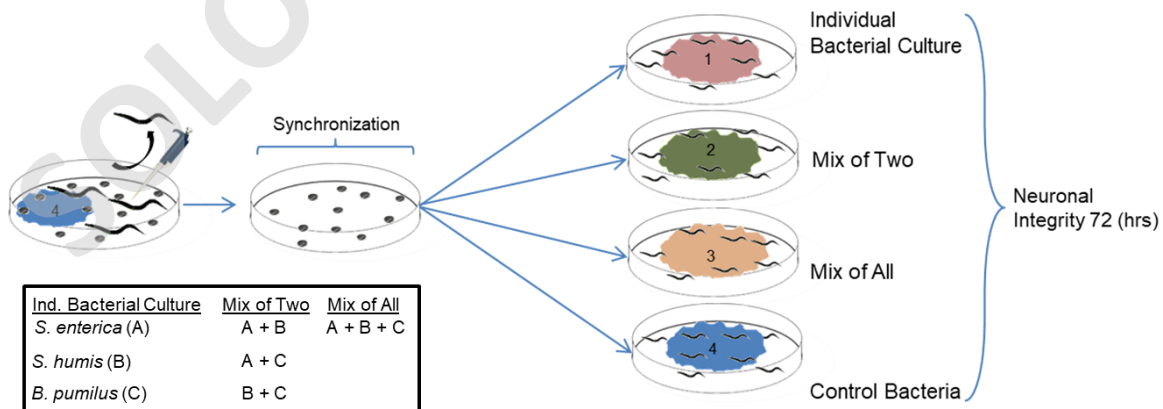
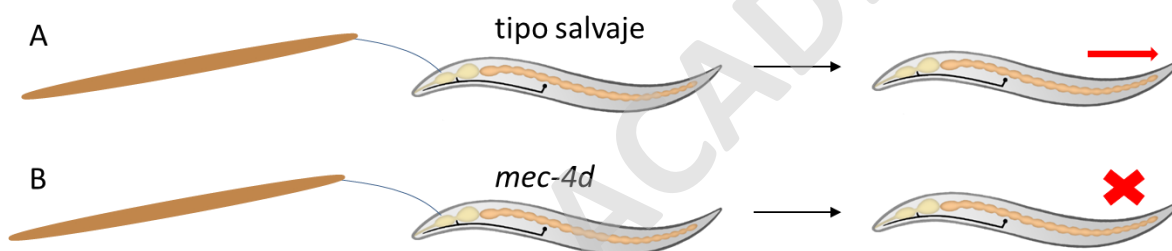


Figura 12: Esquema experimental para el análisis de la morfología neuronal de gusanos que se alimentan de bacterias individuales y mezcladas. En la parte izquierda se observa la sincronización de gusanos *mec-4d*

a 0-2 horas después de la eclosión. Las placas se lavan con M9 para eliminar todas las larvas y adultos. Después de 2 horas, los gusanos recién nacidos se colocan en diferentes placas con aislados bacterianos como se muestra. La tabla muestra las bacterias individuales y la descripción de las mezclas del esquema principal.

### 3.19 Ensayo de respuesta al tacto

Para evaluar la funcionalidad de la neurona AVM, se realizó el ensayo de respuesta al tacto que consiste en tocar suavemente la zona anterior del gusano con el fin de generar la respuesta aversiva del gusano, el cual retrocede. Se utilizó una pestaña que está pegada a un mondadientes para tocar al gusano. Se debe tocar suavemente sobre el segundo bulbo faríngeo del gusano para evitar la activación de otras neuronas que generarían una respuesta de tacto fuerte. Se tocó cinco veces en la parte anterior y cinco veces en la parte posterior (10 toques en total) en gusanos *mec-4d* con tres réplicas biológicas por triplicado en los aislados individuales, aislados mezclados (diadas y triada) y como control se utilizó *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 luego de 72 horas.



**Figura 13: Esquema experimental de respuesta al tacto.** A. representación del toque suave sobre el segundo bulbo faríngeo en un gusano tipo salvaje N2 (tipo silvestre) y la respuesta aversiva que se genera. B. Representación del toque suave sobre el segundo bulbo faríngeo de un gusano *mec-4d* y que no genera una respuesta frente al tacto.

### 3.20 Análisis estadístico

Para realizar el análisis de los datos y la construcción de gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism 7.04. Se utilizó un test de ANOVA de una vía y de dos vías con múltiples comparaciones con las distintas muestras de aislados bacterianos para comparar las dietas del laboratorio con los aislados bacterianos. También se utilizó un coeficiente de correlación de Pearson y prueba de Tukey para las comparaciones múltiples.

### 3.21 Análisis de microscopía de fluorescencia

Se observó todas las muestras de morfología neuronal y las faringes de los gusanos alimentados con bacteria en el microscopio Nikon Eclipse Ni, Fuente de Nikon, Lámpara de Nikon. Para esto se preparó un pad de agarosa 2% para montar a los gusanos y poder visualizarlos. Se utilizó el filtro

número 3 del microscopio el cual permite ver la fluorescencia verde y el filtro número 1 para fotografía en Nomarski (1/4 ISO 500).

SOLO USO ACADÉMICO



## 4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 Caracterización de los aislados bacterianos

#### 4.1.1 Secuenciación del ADN genómico, ensamble de genomas y análisis filogenético

La exploración de los organismos en sus ambientes naturales y las bacterias que interactúan con ellos es un paso importante en la determinación de las relaciones interespecie. Previamente en nuestro laboratorio se identificó tres aislados bacterianos provenientes de la microbiota de *C. elegans* silvestre (unpublished).

El análisis por 16S no fue capaz de discriminar una especie única (Tabla S1). Se decidió secuenciarlos debido a que no se conocía con exactitud su identidad. Para ello, se extrajo el ADN genómico y se secuenció con la tecnología Illumina en Genoma Mayor SpA, Universidad Mayor, Chile. Una vez terminada la secuenciación, se nos envió la data cruda (raw data) para realizar el ensamble del genoma de cada muestra. Para hacer el ensamble de los genomas se utilizó un algoritmo conocido como SPAdes para genomas de gran tamaño. Finalmente se evaluó la calidad de los ensamblajes utilizando Quast (Tabla 4).

**Tabla 4:** Informe de control de calidad de los ensamblajes de genomas de las muestras de cada aislado entregado por Quast.

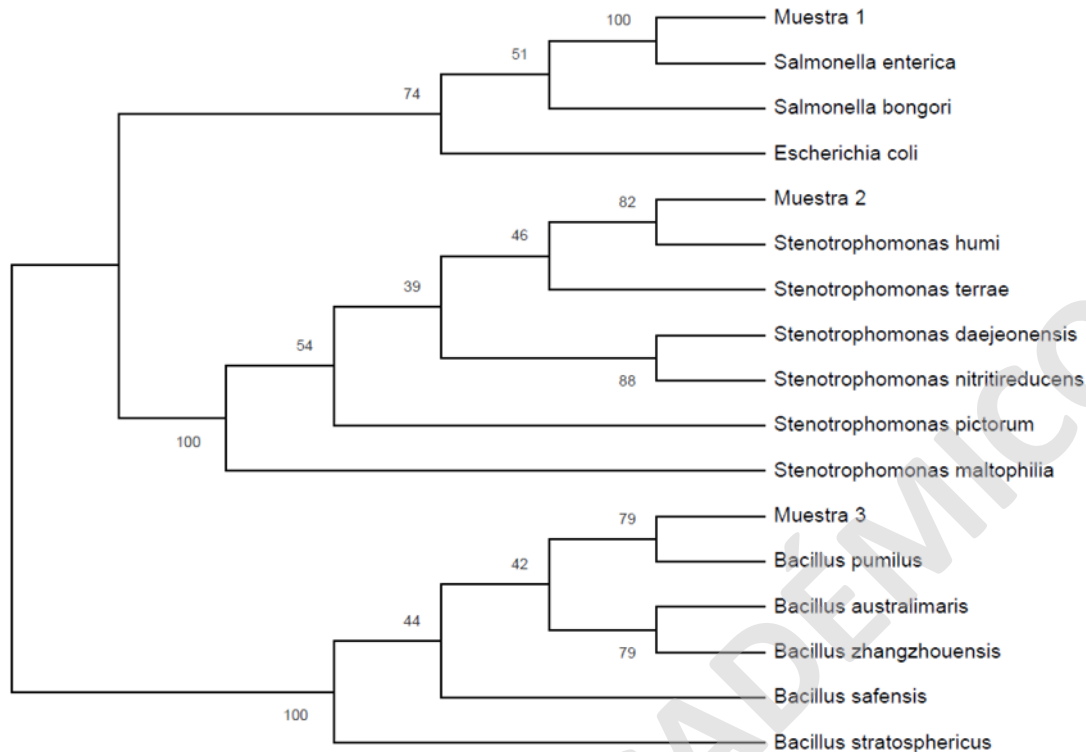
	001_contigs	002_contigs	003_contigs
Total length (>= 0 bp)	4916691	4137442	3787870
Total length (>= 1000 bp)	4885706	4132561	3648031
Total length (>= 5000 bp)	4854398	4131391	3633881
Total length (>= 10000 bp)	4828158	4120279	3628368
Total length (>= 25000 bp)	4709899	4120279	3584946
Total length (>= 50000 bp)	4407232	4120279	3584946
# contigs	70	9	27
Largest contig	778285	2082918	916475
Total length	4896884	4132561	3652646
GC (%)	52.21	62.52	41.33
N50	238975	2082918	617994
N75	102416	499912	352348
L50	6	1	3
L75	14	3	5
# N's per 100 kbp	2.04	0.00	5.23

Dentro de los valores entregados por Quast que se consideran para evaluar la calidad del ensamble son: el tamaño del genoma completo (Total length), contenido de GC (GC %) y el número de contigs generados (# contigs). Estos valores se comparan con genomas de referencias en las bases de datos como NCBI. ISO1 presentó un tamaño de 4,89 Mb, 52.21% de contenido GC y 70 contigs (94). Para ISO2 presentó un tamaño de 4,1 Mb, 62.52% de contenido GC y 9 contigs (95). Finalmente, ISO3

presentó un tamaño de 3,6 Mb, 41.33% de contenido GC y 27 contigs (96). Al comparar los resultados obtenidos con los genomas de referencias se evidenció que el ensamblaje tuvo éxito en cada genoma de los aislados ya que presentó tamaños de genomas similares al igual que el contenido de GC. ISO2 e ISO3 presentaron un bajo número de contigs y a su vez de gran tamaño, lo que sugiere una mejor continuidad dentro de las secuencias nucleotídicas. A diferencia de ISO1 que presentó mayor número de contigs, lo cual podría indicar poca continuidad dentro de las secuencias. Los contenidos de GC de las bacterias son similares a los entregados por las bases de datos.

Una vez analizada la calidad de los ensamblajes de las muestras, se determinó a qué especies de bacterias pertenecen. Para ello, se realizó un blastn en la plataforma BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se mapeó las secuencias usando genomas de referencias (RefSeq Genome Database). Finalmente, se utilizó 100.000 pb en tres regiones del genoma completo de cada grupo de datos y se determinó que el aislado 1 corresponde a *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2*, el aislado 2 a *Stenotrophomonas humi* y el aislado 3 a *Bacillus pumilus*.

Dentro de la clasificación actual, ISO1 no se identificó con ninguna bacteria del análisis de 16S y se dejó como *S. enterica* cuya cepa se conoce como MST1. Para simplificar la nomenclatura nos referiremos a cada aislado como ISO1, ISO2 e ISO3, respectivamente. Una vez determinada la identidad de cada uno, se realizó análisis de filogenia para determinar su relación con otras especies y evolución. Para esto se identificó el gen *prfA* que codifica para la proteína reguladora de listerolisina que estaba contenida en las tres bacterias y se construyó el árbol filogenético utilizando Maximum Likelihood (Figura 14).



**Figura 14: Árbol filogenético de las muestras de los aislados bacterianos.** Para el alineamiento de secuencias de las tres muestras y construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA-CC (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Compute Core). Se utilizó Maximum Likelihood como método estadístico con el modelo evolutivo GRT +G (Generalised Time-reversible Model Gamma distributed). Para el ensayo de filogenia se utilizó el método Bootstrap.

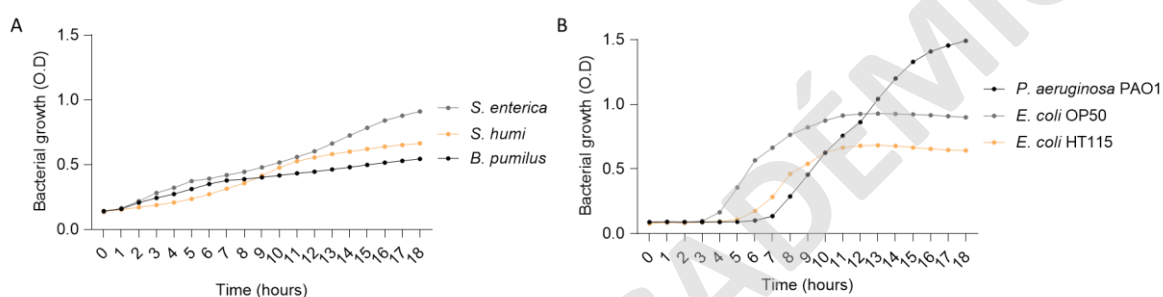
Se utilizó el método estadístico de remuestreo (*Bootstrap*) para evaluar el árbol filogenético ya que crea pseudoréplicas para compararlas con árboles ya generados para mapearlos con el original. Para esto, se determinó que ISO1 se considera un agrupamiento bien posicionado ya que presenta un 100% con *Salmonella entérica*. Para ISO2 presenta un 82% dentro del agrupamiento con *Stenotrophomonas humi* asimilando que tienen cierta cercanía y para ISO3 presenta un 79% dentro del agrupamiento con *Bacillus pumilus*.

Dentro del análisis del árbol filogenético, para ISO2 se encontró estrechamente relacionado con bacterias del género *Stenotrophomonas* que se pueden encontrar en el medio ambiente. Lo mismo ocurre para ISO3 que indicó ser un *Bacillus pumilus*, una bacteria que se encuentra en el medio ambiente en contacto con *C. elegans* silvestres (2). Con eso tenemos dos candidatos para estudiar el comportamiento y conducta del gusano con bacterias no domesticadas. Por el contrario, ISO1 puede ser moderadamente patogénica para *C. elegans* (74) y se ha usado ampliamente en nuestro laboratorio para estudiar herencia transgeneracional (93).

Con los resultados anteriores, se logró identificar los aislados bacterianos gracias al ensamble *de novo* de sus genomas, mapeo sus secuencias con genomas de referencia y utilizando un análisis filogenético que complementa la información de cuáles son las bacterias más cercanas evolutivamente.

#### 4.1.2 Determinación de la cinética de crecimiento y Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Una vez identificadas las bacterias utilizadas en esta investigación se continuó su caracterización. Se realizó una curva de crecimiento para determinar cómo crecen a lo largo del tiempo a 30°C en comparación a las bacterias del laboratorio que se cultivan a 37°C (Figura 15).

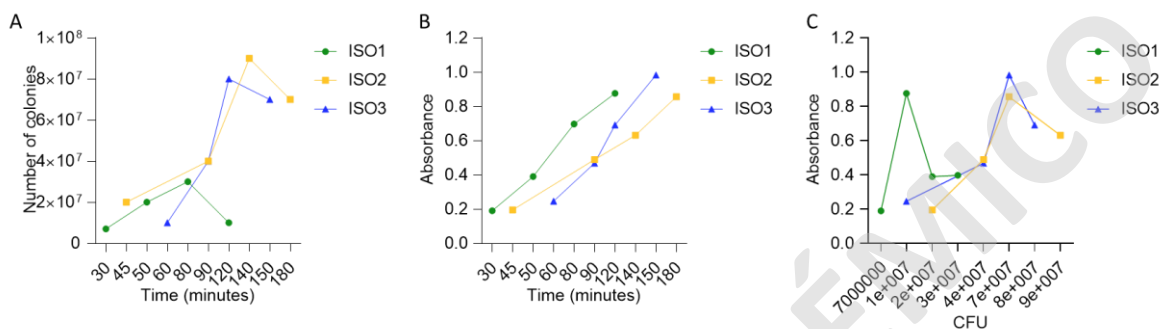


**Figura 15: Cinética de crecimiento bacteriano de aislados del ambiente y microbios domesticados. A.** Curva de crecimiento de los aislados bacterianos, ISO1, ISO2 e ISO3. **B.** Curva de crecimiento de las bacterias control *E. coli* OP50, *E. coli* HT115 y *P. aeruginosa* 1 (PAO1). Las curvas se realizaron durante 18 horas a 30°C (A) y 37°C (B).

Con los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento, se determinó que las bacterias presentan un crecimiento acelerado (Figura 15A) con respecto a las bacterias del laboratorio (Figura 15B). Se decidió crecer a 30°C debido a que en un principio se crecieron a esa temperatura cuando se aislaron del gusano. También crecen sin problemas a 20°C cuando se les da de alimento al gusano. No se observó el crecimiento clásico descrito para cierto tipo de bacterias como *E. coli* (crecimiento exponencial). Se estima que pasadas las 24 horas de crecimiento debería aparecer una disminución en la curva que representaría el término de la fase estacionaria. En comparación, las bacterias utilizadas en el laboratorio como *E. coli* OP50, *E. coli* HT115 y *P. aeruginosa* PAO1 presentaron una curva de crecimiento estándar en donde se aprecian las diferentes fases de crecimiento de una bacteria (Figura 15B). En esta figura, no se evidencia la fase de muerte celular de las bacterias, solamente la fase estacionaria debido a que se dejó creciendo las bacterias hasta 18 horas y en un tiempo mayor se hubiese observado la fase de muerte (mayor a 24 horas).

Una vez establecida la cinética de crecimiento de los aislados bacterianos y las bacterias control del laboratorio, se prosiguió a determinar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada uno de

los aislados (Figura 16). El valor UFC permite conocer cuántas bacterias se inoculan en la placa y así evitar que se genere un césped muy grueso que afecte la movilidad del gusano. Otro punto importante en la generación de las mezclas de los aislados es la relación entre las UFC con la absorbancia y el tiempo de crecimiento conjunto. De esa manera se evita la saturación de la placa donde va a crecer el gusano.



**Figura 16: Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada aislado bacteriano. A.** Número de colonias de cada aislado en el cultivo a lo largo del tiempo. **B.** Absorbancia de cada aislado en el cultivo a lo largo del tiempo. **C.** Relación entre la absorbancia y UFC de cada muestra.

Para el análisis de las UFC de los aislados bacterianos se determinó que el número de colonias de ISO1 que se forman en el tiempo es mucho menor en comparación a las formadas por ISO2 e ISO3 (Figura 16A) que presentan un patrón de crecimiento similar entre sí. Esto se podría relacionar con la absorbancia en el tiempo del crecimiento del cultivo de cada muestra (Figura 16B y Figura 16C). ISO1 presentó un crecimiento más rápido que ISO2 e ISO3, pero estos dos últimos tienen una relación de absorbancia y UFC similar en comparación a ISO1. Esto sugiere que la velocidad de crecimiento de ISO1 es mucho mayor que la de los otros aislados debido a que las condiciones de crecimiento de ISO1 son óptimas en comparación a la de ISO2 e ISO3. Cabe mencionar que ISO1 es una bacteria que está domesticada en el laboratorio en comparación a ISO2 e ISO3 que no lo están.

Estos datos sugieren que se podría obtener mayor cantidad de colonias bajo un mismo tiempo debido a que la absorbancia no se relaciona directamente con la cantidad de células vivas dentro del cultivo para el caso de ISO1 y su valor de UFC. Otro punto importante es la relación de la cinética de crecimiento entre ISO2 e ISO3 que está ligada a que se encontraron juntos al momento de aislarse por lo que podría existir una relación de crecimiento dentro del cultivo a la hora de interactuar.

#### 4.1.3 Análisis de la batería bioquímica de los aislados bacterianos

En nuestro modelo de estudio, la detección del perfil metabólico de las bacterias es clave para correlacionar moléculas específicas con la conducta animal. Como primera aproximación, utilizamos una batería bioquímica que identifica la presencia de enzimas específicas con el uso de medios especiales de crecimiento. En este experimento se puede dilucidar la presencia o ausencia de enzimas por un ensayo colorimétrico. El experimento se dividió en dos grupos para comprender cómo interactúan estas bacterias de forma individual y en consorcio. La interpretación de los resultados de cada batería se indica en la Tabla S2 del material suplementario.

Para la batería bioquímica individual (Tabla 5) y se evidenció que para el medio Triple-Sugar-Iron (TSI) *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 utilizan lactosa del medio (A/A), ISO1, ISO3, *P. aeruginosa* PAO1 utilizan glucosa e ISO2 dio una reacción negativa. Esto nos indica que ISO1 e ISO3 utilizan azúcares de fácil acceso como la glucosa, pero ISO2 no estaría utilizando el azúcar del medio. Esto sugiere que podría estar ocupando otro metabolito para generar energía. En el medio Movilidad-Indol-Ornitina (MIO) todas las bacterias excepto *E. coli* OP50 presentaron una reacción positiva indicando que son motiles. También que presentan la enzima ornitina descarboxilasa, enzima que participa en el ciclo de la urea y el metabolismo de grupos aminos.

Para el medio Citrato (CIT), las bacterias con una reacción positiva fueron ISO1 y *P. aeruginosa* PAO1 que poseen la enzima citrato permeasa, a diferencia de las demás que no la tienen. Por este motivo, ISO1 estaría utilizando citrato del medio como fuente de carbono. Para el medio Lysine Iron Agar (LIA), todas las bacterias presentaron una reacción positiva a la presencia de lisina descarboxilasa (K/K). Esto sugiere que los aislados no fermentan glucosa para el caso de ISO1 e ISO3, y que ISO2 no utiliza glucosa. También se observó una reacción negativa a la presencia de lisina desaminasa (A/A) para todas las bacterias.

Para el Agar Corriente (COR) que es similar al medio LB, solamente la bacteria *P. aeruginosa* PAO1 presentó una pigmentación clara con un tono verdoso. Finalmente, el medio UREA indicó una reacción positiva en las bacterias *E. coli* OP50, *E. coli* HT115 e ISO3 con presencia de ureasa a diferencia de las otras bacterias que presentaron una reacción negativa que indica que no hay ureasa. La enzima degrada la urea generando una disminución del pH, lo cual favorece el crecimiento de la bacteria que posee la enzima y evita el crecimiento de las otras bacterias por la baja de pH.

**Tabla 5:** Resultados de batería bioquímica de los aislados bacterianos individuales y las bacterias control.

	TSI	MIO	CIT	LIA	COR	UREA
ISO1	K/A	+	+	K/K-A/A	S.P.	-
ISO2	-	+	-	K/K-A/A	S.P.	-
ISO3	K/A	+	-	K/K-A/A	S.P.	+
OP50	A/A	-	-	K/K-A/A	S.P.	+
HT115	A/A	+	-	K/K-A/A	S.P.	+
PAO1	K/A	+	+	K/K-A/A	C.P.	-
CONTROL	-	-	-	-	-	-

La batería bioquímica de las mezclas se registró en la Tabla 6. Para el medio Triple-Sugar-Iron (TSI) la mezcla de las bacterias *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 mostró que ambas utilizan lactosa (A/A) y la reacción se visualizó en toda la placa de forma homogénea. ISO13 presentó una reacción mixta entre utilización de lactosa (A/A) en el sector de ISO3 y glucosa (K/A) en ISO1. ISO23 presentó una reacción negativa (K/K) en ISO2 y utilización de lactosa (A/A) en el sector de ISO3. ISO12 tuvo una reacción negativa doble (K/K) para toda la placa y en ISO123 presentó una reacción triple que indica utilización de lactosa (A/A) en la porción de ISO3 y reacciones negativas (K/K) en las porciones donde se inoculó ISO1 e ISO2. La placa de *E. coli* OP50 - *E. coli* HT115 presentó una doble reacción de utilización de lactosa (A/A). Para el medio Movilidad-Indol-Ornitina (MIO), todas las mezclas con excepción del sector de *E. coli* OP50, presentaron positivo para la presencia de ornitina descarboxilasa. En *E. coli* OP50 - *E. coli* HT115 presentó motilidad en el sector de *E. coli* OP50.

En el medio Citrato (CIT), *E. coli* OP50- *E. coli* HT115 presentó una reacción negativa, lo que indica que no existe presencia de citrato permeasa. En las demás placas sólo presentó una reacción positiva donde se inoculó ISO1, las otras porciones de la placa presentaron una reacción negativa a la presencia de citrato permeasa. Para el medio Lysine Iron Agar (LIA) todas las placas presentaron una reacción mixta, positiva para la lisina descarboxilasa (K/K) y negativo para la lisina desaminasa (A/A). El medio Corriente (COR), ninguna placa presentó pigmentación característica, tampoco en las interacciones de los cultivos. Finalmente, en el medio UREA la mezcla *E. coli* OP50 - *E. coli* HT115 presentó una doble reacción positiva en ambos sectores de la placa. ISO12 presentó una reacción negativa en toda la placa, ISO13 e ISO23 presentaron una reacción positiva en el sector de la placa de ISO3 y una reacción negativa donde se inoculó ISO1 e ISO2. Lo mismo ocurrió para ISO123 donde la reacción positiva se ubicó en la porción de ISO3.

**Tabla 6:** Resultados de batería bioquímica de los aislados bacterianos mezclados y las bacterias control.

	TSI	MIO	CIT	LIA	COR	UREA
ISO12	K/K-K/K	+/+	+/-	K/K-A/A	S.P.	-/-
ISO13	K/A-A/A	+/+	+/-	K/K-A/A	S.P.	-/+
ISO23	K/K-A/A	+/+	-/-	K/K-A/A	S.P.	-/+
ISO123	K/K-K/K-A/A	+/+/+	+/-/-	K/K-A/A	S.P.	-/-/+
OP50-HT115	A/A-A/A	-/+	-/-	K/K-A/A	S.P.	+/+
CONTROL	-	-	-	-	-	-

Los resultados de las baterías bioquímicas son una primera aproximación para comenzar a discriminar las bacterias entre sí y comenzar a evidenciar sus principales diferencias metabólicas. Estos resultados son complementarios para próximos ensayos metabólicos que otorgan más información como la capacidad que tiene una enzima en degradar un sustrato específico y seguir caracterizando los aislados bacterianos.

#### 4.1.4 Determinación de sensibilidad y resistencia a antibióticos

Debido a que ISO2 e ISO3 provienen del medio ambiente, pueden tener variantes que los faculte a ser resistentes o sensibles a ciertos antibióticos por la plasticidad evolutiva y ecológica durante el tiempo. ISO1 es un patógeno para el gusano y una cepa de carácter clínico para el humano. Por ende, es importante realizar ensayos de resistencia y sensibilidad para complementar su caracterización.

En la batería de antibióticos (Tabla 8) las bacterias presentaron sensibilidad ante ampicilina, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico, cloranfenicol y carbemecilina. Para los casos de resistencia, ISO3, *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 presentaron resistencia a azitromicina. Finalmente, *E. coli* OP50 fue la única resistente a estreptomomicina dentro de la lista.

**Tabla 7:** Batería de antibióticos de los aislados bacterianos individuales y las bacterias control del laboratorio. (+): sensible, (-): resistente, (\*): contaminado, (.): sin contaminación.

	ISO1	ISO2	ISO3	OP50	HT115	CONTROL
Ampicilina	+	+	+	+	+	.
Gentamicina	+	+	+	+	+	.
Kanamicina	+	+	+	+	+	.
Azitromicina	-	+	-	-	-	.
Ácido Nalidíxico	+	+	+	+	+	.
Cloranfenicol	+	+	+	+	+	.
Streptomomicina	+	+	+	-	+	.
Carbemecilina	+	+	+	+	+	.



Con los resultados anteriores, se complementa la caracterización de los aislados bacterianos y esclarece a qué antibióticos presentan resistencia o sensibilidad. Con ello, resulta más fácil a la hora de selección un vector un con marcador de selección que posea una resistencia a un antibiótico de la lista y poder hacer una futura transformación de los aislados.

#### 4.1.5 Determinación de características macroscópicas y tinción de Gram

Para continuar con la caracterización de los aislados bacterianos, se determinó las características macroscópicas de sus colonias con ayuda de una lupa estereoscópica. Además, se realizó una tinción de Gram para determinar si son Gram negativas o positivas, y contrastar con la evidencia que ya existe sobre ellas.

Los resultados fueron ordenados en una tabla (Tabla 8) según los criterios macroscópicos preestablecidos (85). Dentro de las características macroscópicas de las colonias la única que difiere del resto es ISO3 en su forma circular y su consistencia membranosa. Dentro de la tinción de Gram, ISO3 fue la única bacteria Gram positiva de la lista.

**Tabla 8:** Descripción de las características macroscópicas de las colonias de los aislados bacterianos individuales y las bacterias del laboratorio, y su respectiva tinción de Gram.

	Tamaño	Forma	Apariencia de la superficie	Elevación	Densidad	Consistencia	Margen	Color	Gram
ISO1	Grande	Irregular	Rugosa	Convexa	Opaca	Creмоса	Dentada	Café Claro	Negativa
ISO2	Grande	Irregular	Rugosa	Centro elevado	Opaca	Creмоса	Dentada	Naranja Oscuro	Negativa
ISO3	Grande	Circular	Rugosa	Centro elevado	Opaca	Membranosa	Entera	Blanco	Positiva
OP50	Medio	Irregular	Rugosa	Convexa	Opaca	Creмоса	Dentada	Café Claro	Negativa
HT115	Grande	Irregular	Rugosa	Elevada	Opaca	Creмоса	Dentada	Café Claro	Negativa

Al ser ISO3 una bacteria Gram positiva dificulta la generación de quimio o electrocompetencia de esta bacteria para una posterior transformación dado a que presentan un peptidoglicano más grueso. Esto sugiere utilizar otras estrategias para realizar una futura transformación con vectores específicos y tener una alta eficiencia en la transformación de los aislados bacterianos.

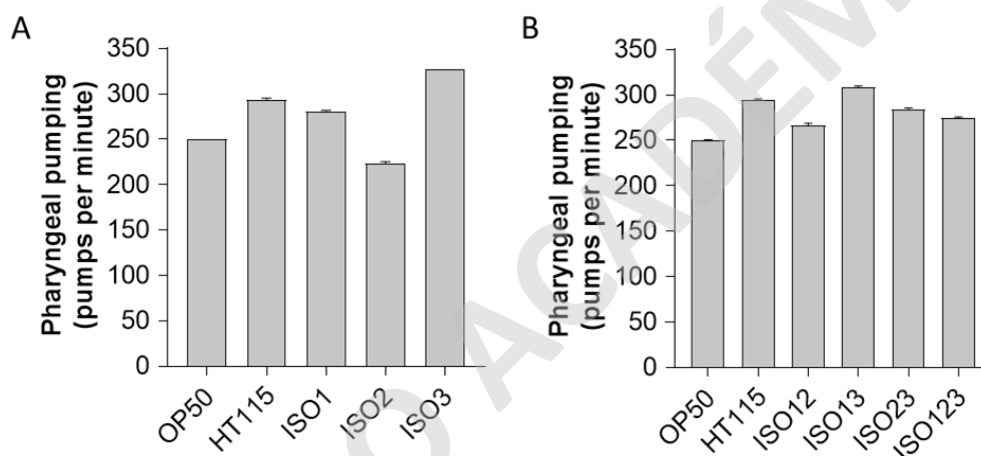
#### 4.2 Análisis de la conducta de *C. elegans* frente a los aislados bacterianos

Una vez caracterizados los aislados bacterianos, se decidió hacer ensayos conductuales para observar cómo se comporta *C. elegans* frente a estas bacterias de forma individual y si existe alguna diferencia en la conducta al mezclarlas entre sí. Por esta razón, la presentación de los resultados

será comparando las dietas bacterianas individuales con sus respectivas mezclas utilizando diferentes ensayos conductuales como bombeo faríngeo, defecación preferencia entre bacterias y desarrollo.

#### 4.2.1 Determinación del bombeo faríngeo

Uno de los parámetros importantes frente a la conducta del gusano es analizar su patrón de bombeo faríngeo para determinar cuánto está comiendo en un tiempo determinado y a qué velocidad lo hace. Para ello, se cuantificó el número de bombeos faríngeos en el tiempo de cada dieta individual para ser comparada con las dietas control del laboratorio (Figura 17A) y la mezcla de las dietas de los aislados bacterianos en comparación a la dieta común del laboratorio (Figura 17B).



**Figura 17: Bombeo faríngeo de *C. elegans* frente a diferentes dietas bacterianas individuales, sus mezclas y las bacterias del laboratorio.** **A.** En el gráfico se indica el número de bombeos faríngeos por minuto en las dietas de bacterias individuales. **B.** En el gráfico se indica el número de bombeo faríngeos por minuto en las mezclas de las dietas bacterianas (diadas y triada) con las dietas individuales de las bacterias del laboratorio. Análisis estadístico: resumen ANOVA: p-value <0,0001 y  $R^2= 0,9971$  (individuales) y  $R^2= 0,9945$  (mezclas). Se realizó un análisis post hoc (test de Tukey y de Sidak) al comparar *E. coli* OP50 con las dietas individuales y las mezclas. Valor de significancia entre las comparaciones múltiples (\*\*\*\*). ISO1 y *E. coli* HT115 (\*\*\*) No significativa (ns) para ISO1 contra ISO23 e ISO123.

Al analizar los resultados anteriores se observó que, para las dietas individuales, ISO3 generó el mayor número de bombeos por minuto (327 bombeos/minuto) una cantidad mayor que *E. coli* HT115 que se considera una dieta de buena calidad. ISO2 generó el menor número de bombeos por minuto (223 bombeos/minuto) una cantidad menor que el control *E. coli* OP50 que se considera una dieta de mala calidad. ISO1 presentó un mayor número de bombeos (281 bombeos/minuto) que *E. coli* OP50 (250 bombeos/minuto) pero menor a *E. coli* HT115 (293 bombeos/minuto). Estos datos

sugieren que ISO3 fomenta el bombeo faríngeo y podría estar relacionado a una buena dieta bacteriana si se relaciona con el número bombeos de *E. coli* HT115.

Para las mezclas, ISO13 generó mayor número de bombeos en el gusano (309 bombeos/minuto) e ISO12 resultó generar menor número de bombeos (266 bombeos/minuto). En comparación a las demás mezclas, ISO23 (284 bombeos/minuto) resultó estar por sobre la dieta ISO12 e ISO123 (274 bombeos/minuto), pero no logró alcanzar a ISO13 (Figura 17B).

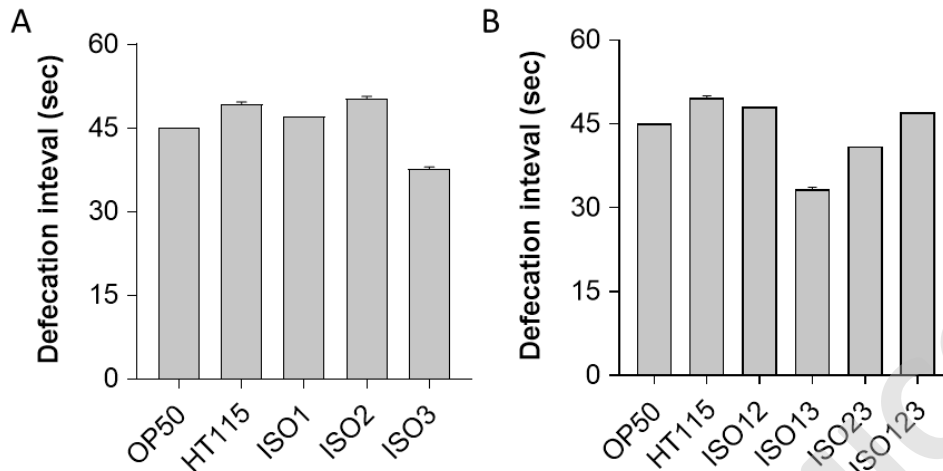
Dentro del análisis estadístico de las dietas individuales, se comparó el control *E. coli* OP50 con las demás dietas individuales. Existe una diferencia significativa (\*\*\*\*) entre *E. coli* OP50 con ISO2 que fue la bacteria que genera menos bombeos para el gusano e ISO3 que representó ser la bacteria con mayor número de bombeos. Luego, se realizó un análisis Post hoc de las dietas individuales (Figura 17A) con múltiples comparaciones entre todas las dietas. Se evidenció que existe una diferencia significativa entre todas las dietas (\*\*\*\*) lo que indica que todas son diferentes entre sí.

Para el análisis estadístico de las mezclas, se evidenció que existe una diferencia significativa (\*\*\*\*) al comparar la bacteria control *E. coli* OP50 con las mezclas de los aislados bacterianos. Luego, se decidió comparar las dietas de los aislados bacterianos con las mezclas de estos mismos. Existe diferencia significativa (\*\*\*\*) para la comparación entre las dietas, con excepción de ISO1 con ISO23 e ISO123 que no existe una diferencia significativa entre esas dietas (ns).

Estos resultados nos sugieren que existe una diferencia en el bombeo faríngeo al alimentar al gusano con más de una bacteria. Es importante destacar que estas aproximaciones nos ayudan a disectar las bacterias que podrían estar generando un efecto por sí solas en el gusano y lo que les sucede al estar mezcladas.

#### **4.2.2 Determinación del tiempo de defecación**

Otro factor importante dentro del comportamiento de *C. elegans* es estudiar su defecación para verificar si las bacterias generan algún cambio en los intervalos de tiempo entre defecaciones. Es por ello, que se determinó el intervalo de tiempo en segundos de la defecación del gusano frente a las dietas individuales con sus respectivos controles y en comparación a las mezclas de las bacterias. Una vez se determinó los intervalos de defecación se analizó los resultados (Figura 18).

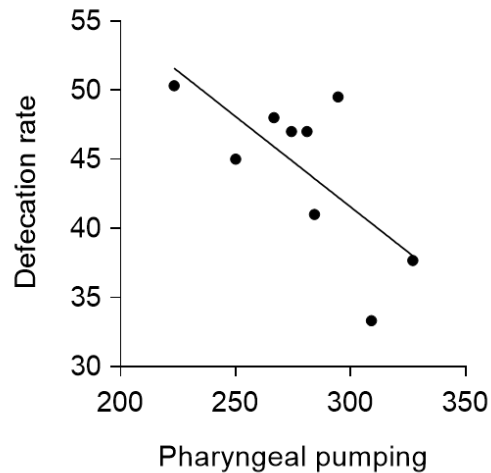


**Figura 18: Tiempo de defecación de *C. elegans* frente a diferentes dietas bacterianas individuales, sus mezclas y las bacterias del laboratorio. A.** Intervalos de defecación en segundos con las dietas bacterianas individuales. **B.** Intervalos de defecación en segundos con las mezclas de las dietas bacterianas. Para ambos casos se utilizó *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 como control. Análisis estadístico: resumen ANOVA: p-value <0,0001 y  $R^2= 0,9958$  (individuales) y  $R^2= 0,9945$  (mezclas). Significancia estadística (\*\*\*\*). Se realizó un análisis post hoc (test de Tukey y de Sidak) al comparar *E. coli* OP50 con las dietas individuales y las mezclas. Valor de significancia entre las comparaciones múltiples (\*\*\*\*) para ISO13. ISO1 y *E. coli* HT115 (\*\*\*) No significativa (ns) para *E. coli* HT115 contra ISO2, ISO12 y ISO123.

De los resultados obtenidos, ISO3 presentó el menor intervalo de tiempo de defecación (37 segundos), ISO2 presentó el mayor intervalo entre una defecación y otra (50 segundos), y 49 segundos para *E. coli* HT115. Otro caso de dietas con similar intervalo de defecación fue ISO1 con 47 segundos y *E. coli* OP50 con 45 segundos (Figura 18A). Para las mezclas se encontró que ISO13 presentó el menor intervalo de tiempo de defecación (33 segundos). ISO12 presentó un intervalo de 48 segundos e ISO123 de 47 segundos. Finalmente, ISO23 presentó un intervalo de 41 segundos, menor a *E. coli* OP50 (Figura 18B).

Dentro del análisis estadístico del tiempo de defecación entre las bacterias control contra las dietas individuales y mezcladas, se determinó que existe una diferencia significativa (\*\*\*\*) entre ISO3 e ISO13. En cambio, no existe diferencia significativa (ns) al comparar *E. coli* HT115 contra ISO2, ISO12 e ISO123, esto sugiere que ISO2 podría estar influyendo en el tiempo que el gusano defeca y cómo repercute al estar mezclado con otras bacterias.

Se decidió realizar un análisis de correlación con los valores del bombeo faríngeo y el tiempo de defecación utilizando un coeficiente de correlación de Pearson para poder determinar si existe alguna relación entre el bombeo faríngeo y el tiempo que se demora en defecar al alimentarlo con bacterias individuales y como consorcio (Figura 19).



**Figura 19: Correlación del tiempo de defecación y el bombeo faríngeo de *C. elegans* frente a las dietas de los aislados bacterianos.** Eje Y: tiempo de defecación en segundos. Eje X: bombeos faríngeos. Análisis estadístico: Pearson, p-value (two-tailed) = 0,0368,  $R^2 = 0.4863$  y  $r = -0.6973$ .

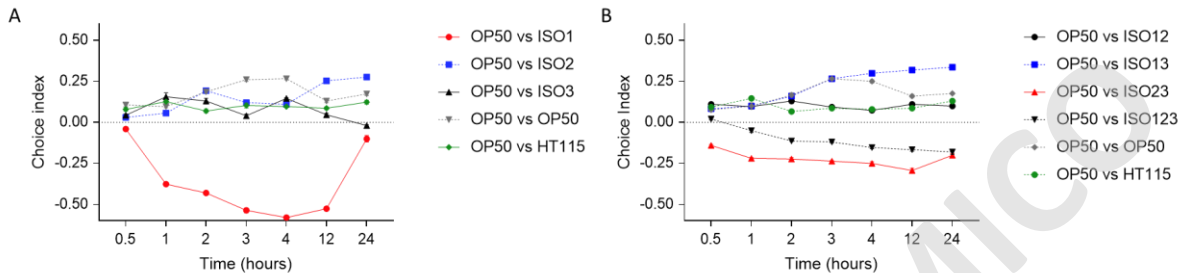
En el análisis de correlación, se observa que los puntos que están por sobre la línea recta son dietas que presentan un bajo bombeo faríngeo y un alto tiempo de defecación. Los puntos ubicados en el centro corresponden a ISO1, ISO12, ISO123 y *E. coli* HT115, y considerando que el factor común en los anteriores es ISO1 dentro de las dietas. Mientras que los puntos debajo la recta son aquellos que tienen un alto bombeo faríngeo y un menor tiempo de defecación como ISO3 e ISO13. En contraste con los que poseen un bajo bombeo faríngeo y un mayor tiempo de defecación como ISO2 y *E. coli* OP50, presentando un valor intermedio con la dieta ISO23 que sería un factor especial ISO2. Esto indica que existe una correlación negativa dentro de la comparación entre el bombeo faríngeo y el tiempo de defecación.

En los resultados anteriores, se evidenció que existe un cambio en el bombeo faríngeo y en el tiempo de defecación del gusano al ser alimentado con dietas bacterianas individuales y sus mezclas. Pero no existe una correlación de estos valores, por lo que aún queda dilucidar una posible relación dentro de la conducta del gusano frente a las diferentes dietas y sus mezclas.

#### 4.2.3 Análisis del ensayo preferencia de bacterias en *C. elegans*

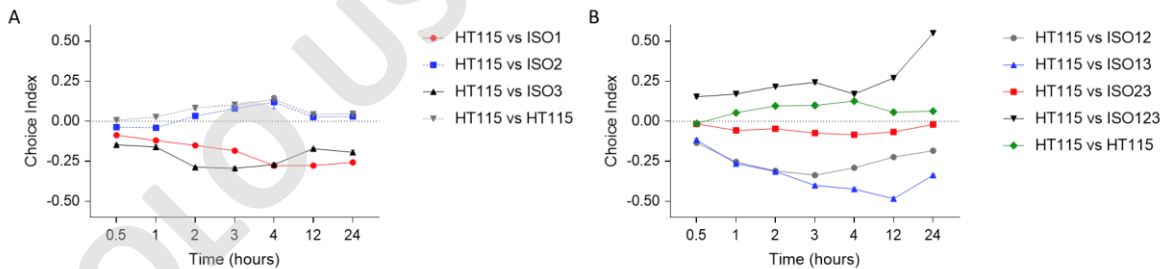
Dentro de la conducta del gusano es importante determinar la preferencia que tiene frente a diferentes bacterias y simular el medio natural al ser mezcladas entre sí. Se realizó dos ensayos de preferencia para analizar la conducta del gusano. El primero se utilizó una metodología similar a la descrita por Avery *et al.*, 2006 pero con ciertas modificaciones que se describen en el apartado de la metodología.

Luego de realizar un seguimiento de la preferencia de los gusanos frente a las dietas bacterianas, se calculó el índice de preferencia de *E. coli* OP50 contra las bacterias individuales y sus mezclas (Figura 20). También se calculó el índice de preferencia de *E. coli* HT115 contra las bacterias individuales y sus mezclas (Figura 21) utilizando *E. coli* HT115 como bacteria de referencia.



**Figura 20: Índice de preferencia (Choice Index) de las dietas bacterianas individuales y mezclas a lo largo del tiempo en *E. coli* OP50.** A. Distribución del índice de preferencia en el tiempo de *E. coli* OP50 contra las bacterias individuales. B. Distribución del índice de preferencia en el tiempo de *E. coli* OP50 contra las mezclas de las bacterias.

Para el análisis del índice de preferencia de *E. coli* OP50 se observó que, para las bacterias individuales, ISO1 presenta el valor más bajo y por ende una mayor preferencia hacia *E. coli* OP50. El gusano presenta una mayor preferencia hacia las otras bacterias que a *E. coli* OP50 (Figura 20A). En las mezclas, ISO23 e ISO123 tienen los valores más bajos, lo que indica una mayor preferencia hacia *E. coli* OP50. Por otro lado, ISO12 e ISO13 presentaron valores positivos de preferencia en comparación a *E. coli* OP50 (Figura 20B).

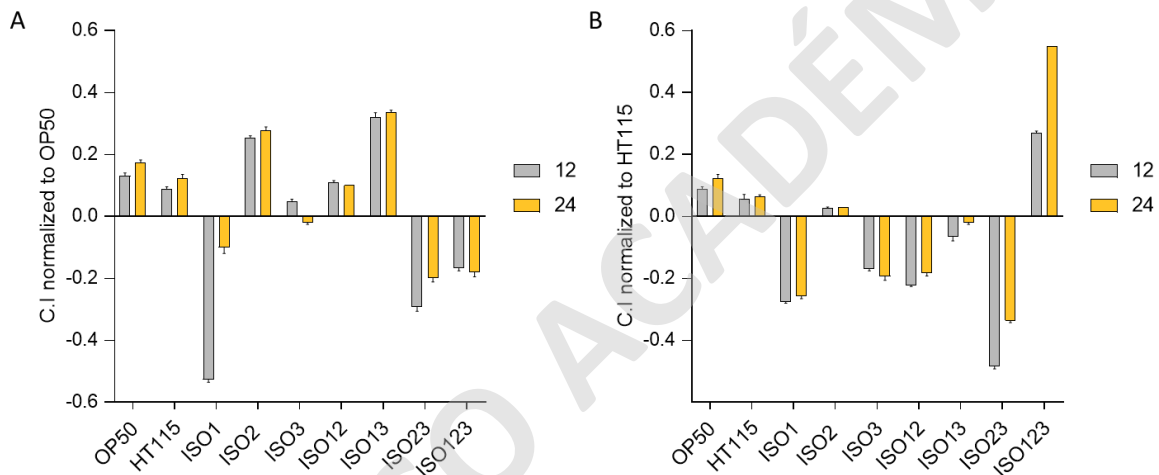


**Figura 21: Índice de preferencia (Choice Index) de las dietas bacterianas individuales y mezclas a lo largo del tiempo en *E. coli* HT115.** A. Distribución del índice de preferencia en el tiempo de *E. coli* HT115 contra las bacterias individuales. B. Distribución del índice de preferencia en el tiempo de *E. coli* HT115 contra las mezclas de las bacterias.

Para el análisis de los resultados del índice de preferencia de *E. coli* HT115, se determinó que ISO1 e ISO3 presentan valores negativos de preferencia y por ende una mayor preferencia hacia *E. coli* HT115. En cambio, el gusano presentó una mayor preferencia a ISO2 que a *E. coli* HT115 (Figura 21A). Para las mezclas, ISO12, ISO13 e ISO23 presentaron valores negativos de preferencia hacia *E.*

*coli* HT115 (Figura 21B). No obstante, ISO123 presentó un valor positivo de preferencia, siendo una de las dietas con mayor preferencia por el gusano dentro del estudio de dietas individuales y mezclas en *E. coli* HT115.

Debido a que se realizó un seguimiento por 24 horas de la preferencia, se decidió analizar los índices de preferencias de las 12 y 24 horas. Esto se debe a que dentro de las primeras cuatro horas de seguimiento el gusano comienza a censar las bacterias en la placa y comienza su migración hacia la bacteria que le resulte más atrayente. En cambio, al analizar la transición de 12 a 24 horas, existe una decisión definitiva por la bacteria debido a la cantidad de tiempo en que se encuentra el gusano en ella y el intervalo de tiempo es mucho mayor para evidenciar una preferencia definitiva.



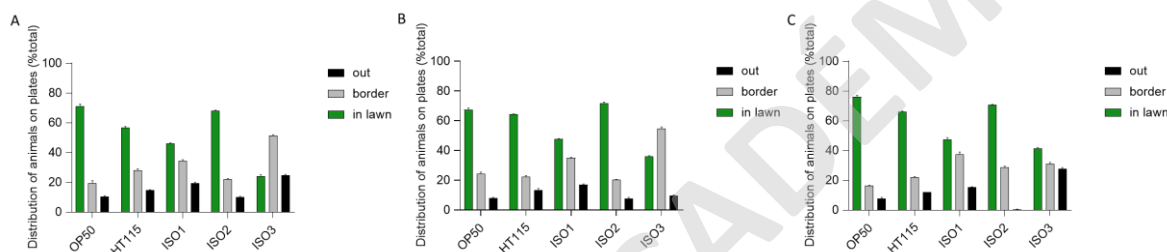
**Figura 22: Índice de preferencia (Choice Index) de 12 y 24 horas de las dietas bacterianas individuales y sus mezclas de *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115. A.** Índice de preferencia de *E. coli* OP50 frente a las dietas individuales y sus mezclas comparando las 12 y 24 horas del experimento. **B.** Índice de preferencia de *E. coli* HT115 frente a las dietas individuales y sus mezclas comparando las 12 y 24 horas del experimento.

Para *E. coli* OP50 existe una disminución en la distribución de gusanos en ISO1 durante la transición entre las 12 y 24 horas, pero sigue la preferencia hacia *E. coli* OP50 (Figura 22A). También se mantiene constante la preferencia frente a las otras bacterias dentro de las 12 horas de las mezclas de bacterias. En cambio, para la dieta de *E. coli* HT115 e ISO123 existe un aumento en la distribución de gusanos en la transición de 12 a 24 horas (Figura 22B) y se mantiene constante la preferencia por *E. coli* HT115 frente a las demás dietas.

Con lo descrito anteriormente, se infiere que al mezclar las bacterias entre sí existe un cambio en la preferencia del gusano al compararlo con una única bacteria. Esto datos sugieren que podría existir

cierta atracción química mediante el olfato del gusano al preferir ciertas dietas bacterianas y que su interacción genera otra respuesta de atracción a diferencia de estar individuales.

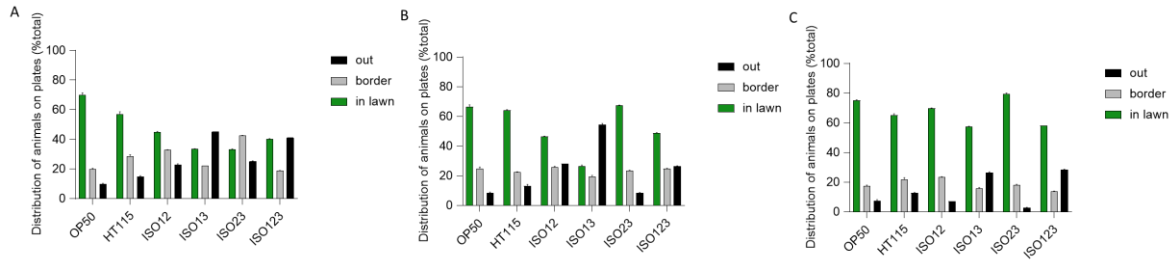
Para el segundo ensayo de preferencia se identificó en qué parte de la placa el gusano prefiere estar, ya sea afuera del césped (*out*), en el borde del césped (*border*) o dentro del césped (*in lawn*). Para poder distinguir las últimas dos categorías, se consideró que cualquier gusano dentro del césped sin tocar el borde del césped, se considera *in lawn*. Si el gusano se encontraba en el borde o parte de su cuerpo en el borde, se considera *border*. Con ello, podemos identificar cuánto prefiere el gusano a la bacteria dependiendo su ubicación en el tiempo. Se analizó la distribución de los gusanos en el césped individual en el tiempo (Figura 23) y las dietas mezcladas (Figura 24).



**Figura 23: Ensayo de preferencia de los aislados bacterianos individuales en diferentes lugares de la placa.** **A.** Primera hora de distribución de gusanos en diferentes partes de la placa. **B.** Segunda hora de distribución de gusanos en diferentes partes de la placa. **C.** Tercera hora de distribución de gusanos en diferentes partes de la placa.

En la primera hora de las dietas individuales, se observa un mayor número de gusanos dentro del césped con excepción de ISO3 que presenta un mayor número de gusanos en el borde del césped y un número equitativo de gusanos afuera y dentro del césped (Figura 23A). En la segunda hora existe un aumento de gusanos en el césped de ISO3 y se sigue manteniendo la distribución de los gusanos en las otras bacterias con una alta preferencia dentro del césped (Figura 23B). Finalmente, en la tercera hora se observa que casi un 80% de distribución dentro del césped de *E. coli* OP50, *E. coli* HT115 e ISO1 se mantienen constantes, en ISO2 no hay gusanos fuera del césped indicando que todos los gusanos se encuentran dentro del césped y en el borde. Por último, existe un cambio en la distribución en ISO3 en el que los gusanos aumentaron en el césped y afuera del césped lo que llevó a una disminución de los gusanos al borde del césped (Figura 23C).

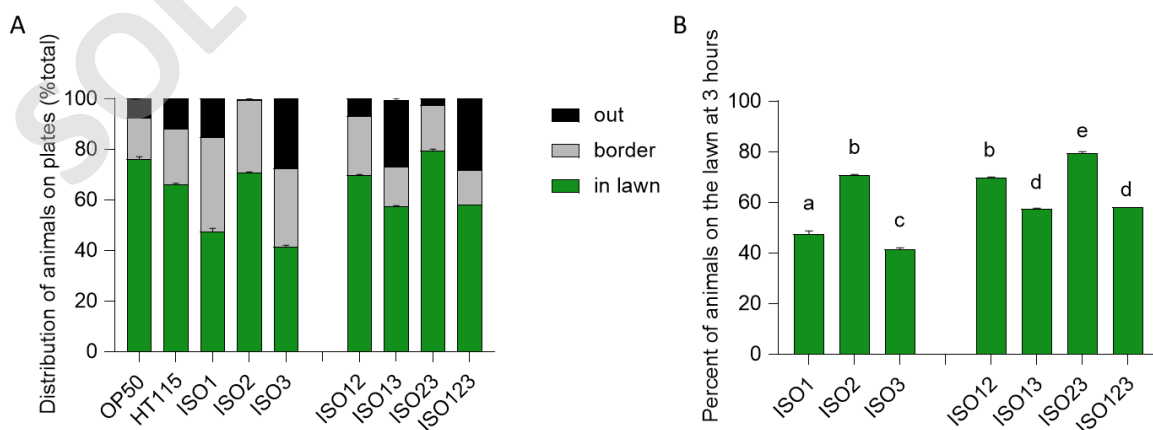




**Figura 24: Ensayo de preferencia de las mezclas de aislados bacterianos en diferentes lugares de la placa. A.** Primera hora de distribución de gusanos en diferentes partes de la placa. **B.** Segunda hora de distribución de gusanos en diferentes partes de la placa. **C.** Tercera hora de distribución de gusanos en diferentes partes de la placa.

Dentro de la primera hora de observación de las dietas de bacterias mezcladas se identificó que ISO12 había más gusanos adentro del césped, en ISO13 había gusanos fuera del césped, en ISO23 había más gusanos en el borde del césped y en ISO123 había la misma proporción de gusanos afuera y adentro del césped (Figura 24A). En la segunda hora se evidenció un aumento de gusanos fuera del césped en ISO13, un aumento de gusanos dentro del césped de ISO23 y hacia el césped en ISO23 (Figura 24B). Por último, en la tercera hora se observó una mayor proporción de gusanos dentro del césped en ISO12 e ISO23, se cambió la proporción de gusanos fuera de la placa en ISO13 e ingresaron en el césped y existió un aumento de gusanos dentro del césped de ISO123 (Figura 24C).

Con los resultados anteriores, se puede analizar que la distribución de gusanos dentro de la placa de cada césped está ligada a cuánto prefiere estar en el borde y dentro del césped. Se puede diferenciar en la transición de 1 a 2 horas para las dietas mezcladas que presentan un mayor número de gusanos fuera de la placa en comparación a las dietas individuales. Para detallar el resultado final a las tres horas, se comparó las dietas individuales y las mezclas (Figura 25A). Después se analizó la distribución de gusanos solamente dentro del césped de todas las dietas (Figura 25B).



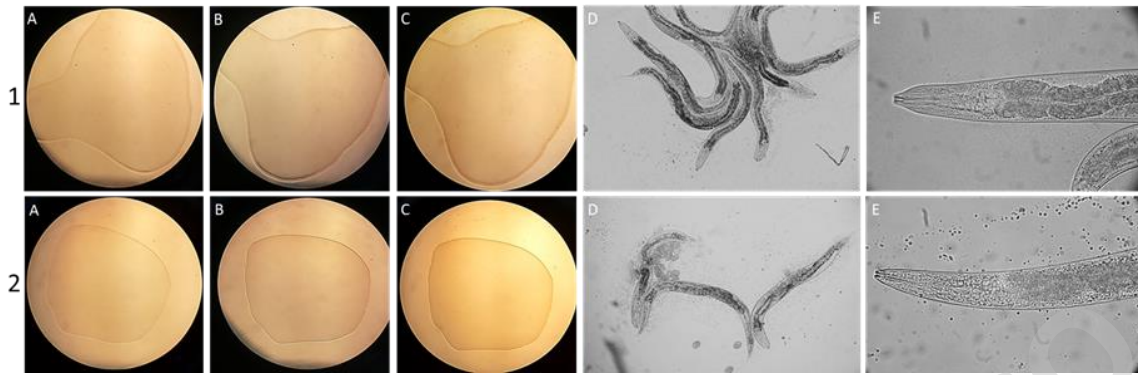
**Figura 25: Ensayo de preferencia de las dietas individuales y mezclas de aislados bacterianos en diferentes lugares de la placa a las tres horas. A.** Distribución de gusanos en diferentes partes de la placa a las tres horas de todas las dietas bacterianas. **B.** Distribución de gusanos dentro del césped a las tres horas de todas las dietas bacterianas. Análisis estadístico: resumen ANOVA (una vía): p-value <0.0001 y  $R^2= 0.9946$ . Análisis Post hoc (test de Tukey) con múltiples comparaciones entre las dietas bacterianas. Diferencia significativa (\*\*\*\*) para todas las dietas, con excepción de ISO2 con ISO12 e ISO13 con ISO123 que no son significativas (ns).

En el análisis estadístico en la tercera hora, se determinó que existe diferencia significativa (\*\*\*\*) al hacer una comparación múltiple con todas las dietas bacterianas, con excepción de ISO2 con ISO12 e ISO13 con ISO123 que la diferencia es no significativa (ns). Existe un aumento de los gusanos que prefieren estar dentro del césped en las dietas mezcladas en comparación a las dietas individuales (Figura 25A). Dentro del análisis se describe que existe una diferencia entre las dietas individuales y que ISO2 e ISO12 son similares (Figura 25B). Esto sugiere que ISO2 genera una atracción hacia el césped y que opaca la preferencia a ISO1.

Los resultados de preferencia anteriores ayudan a determinar e identificar los posibles cambios dentro de la preferencia del gusano frente a diferentes dietas bacterianas. Finalmente, otorga información relevante para entender los posibles componentes que pueden estar liberando las dietas bacterianas para atraer al gusano y qué bacteria podría estar opacando a otras.

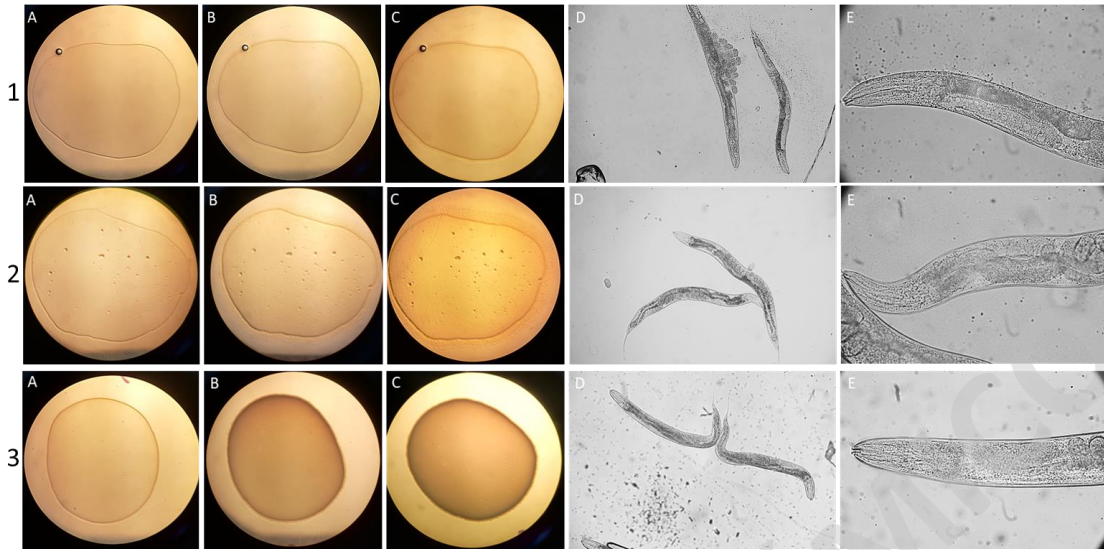
#### **4.2.4 Análisis de la curva de desarrollo de *C. elegans***

Uno de los puntos importantes de la investigación es determinar el desarrollo del gusano al ser alimentado con las diferentes dietas bacterianas para compararlas con la dieta y desarrollo normal descrito en el laboratorio. Está descrito que al ser alimentado con *E. coli* HT115 presenta un aumento en el desarrollo en comparación a *E. coli* OP50 a 20°C. Para esto, se realizó un seguimiento del crecimiento del césped de cada dieta bacteriana que se le dio de comer al gusano durante 24, 48 y 72 horas a 20°C. También se observó la anatomía de la faringe del gusano para identificar posibles diferencias en su morfología y la porción más próxima del intestino. Junto a esto, se utilizó las dietas control de *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 (Figura 26), las dietas de los aislados individuales (Figura 27) y las dietas de los aislados mezclados entre sí (Figura 28).



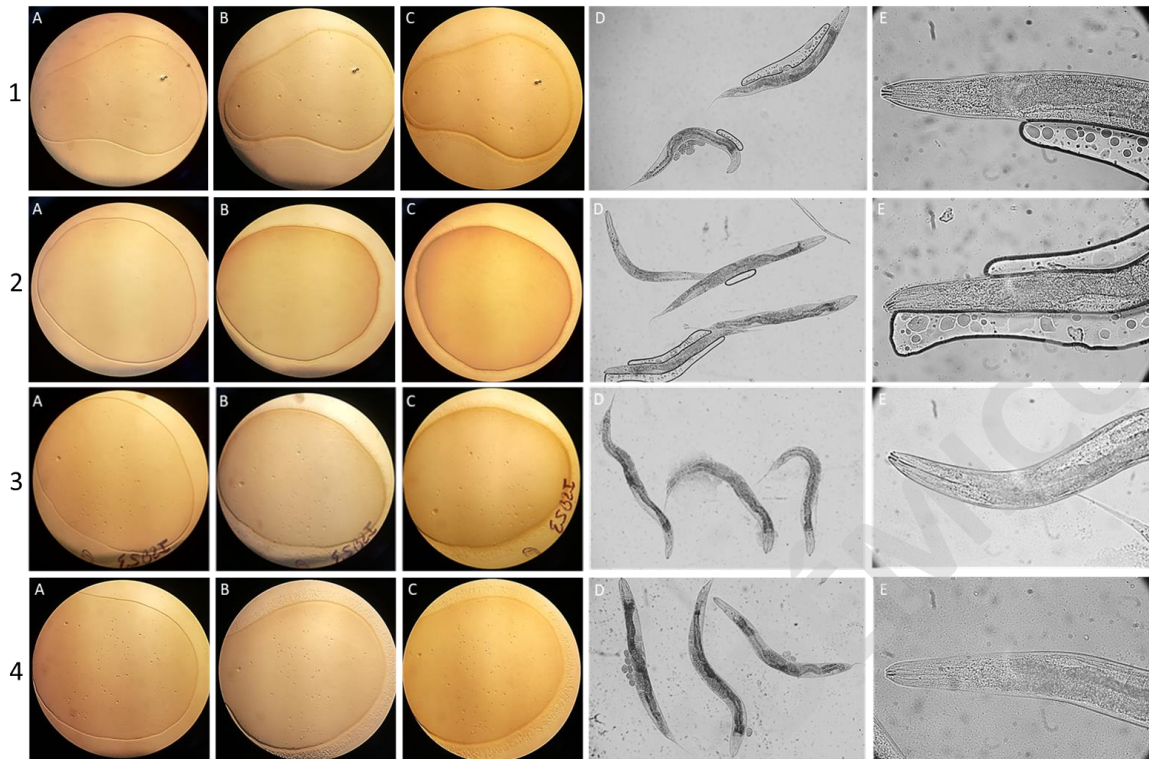
**Figura 27: Crecimiento del césped bacteriano y faringe de *C. elegans*.** Fotografías A, B y C representan el crecimiento del césped de bacteria en la placa de NGM durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Fotografías D representan gusanos adultos alimentados con cada bacteria. Fotografías E representan la porción anterior del gusano indicando la faringe y la primera porción del intestino. El grupo 1 es el césped de *E. coli* OP50 durante tres días, gusanos adultos que fueron alimentados con la bacteria y la porción anterior de la faringe. En grupo 2 es el césped de *E. coli* HT115 durante tres días, gusanos adultos que fueron alimentados con la bacteria y la porción anterior de la faringe. Se fotografió el césped en una lupa estereoscópica y a los gusanos en el microscopio Nikon Eclipse Ni con microscopía de contraste de interferencia diferencial de Nomarski.

Dentro de las dietas control se observó un crecimiento constante dentro del césped de bacteria. En *E. coli* OP50 (Figura 27-1C) se puede identificar un engrosamiento del borde del césped a diferencia de *E. coli* HT115 (Figura 27-2C). Dentro de las diferencias morfológicas de los gusanos se observó que los gusanos alimentados con *E. coli* HT115 (Figura 27-2E) presentan la porción anterior más delgada que los gusanos alimentados con *E. coli* OP50 (Figura 27-1E). La integridad del intestino es mucho más clara en *E. coli* OP50 que en *E. coli* HT115, lo que podría estar relacionado a la cantidad de veces que bombea con cada bacteria en los resultados anteriores. Aun así, falta evidencia para discriminar sobre la integridad completa del intestino frente a la integridad morfológica de la faringe y su relación con el bombeo faríngeo.



**Figura 28: Crecimiento del césped bacteriano en placas y anatomía de la faringe de *C. elegans*.** Fotografías A, B y C representan el crecimiento del césped de bacteria en la placa de NGM durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Fotografías D representan gusanos adultos alimentados con cada bacteria. E representan la porción anterior del gusano indicando la faringe y la primera porción del intestino. El grupo 1 es el césped de ISO1 durante tres días, gusanos adultos que fueron alimentados con la bacteria y la porción anterior de la faringe. El grupo 2 es el césped de ISO2 durante tres días, gusanos adultos que fueron alimentados con la bacteria y la porción anterior de la faringe. El grupo 3 se observa el césped de ISO3 durante tres días, gusanos adultos que fueron alimentados con la bacteria y la porción anterior de la faringe. Se fotografió el césped en una lupa estereoscópica y a los gusanos en el microscopio Nikon Eclipse Ni con microscopía de contraste de interferencia diferencial de Nomarski.

Para las dietas individuales de los aislados, se observó un crecimiento constante dentro del césped de ISO1 hasta las 72 horas (Figura 28-1C). En ISO2 aparece un halo alrededor del borde del césped a las 72 horas junto al engrosamiento del borde (Figura 28-2C). En cambio, ISO3 presenta un engrosamiento del césped completo durante los tres días (Figura 28-3C). Dentro de las diferencias morfológicas de los gusanos sólo se observó que existe una acumulación de ISO2 e ISO3 en la faringe (Figura 28-2E y 3E), esto podría deberse a la densidad del césped por acumulación de bacterias y que el gusano se alimente de más bacteria. Con ello, se relaciona el valor de UFC que se forma en un determinado periodo de tiempo. Para las faringes de los gusanos, no se observó una diferencia clara en la distribución o morfología de los bulbos faríngeos, pero sí en ISO3 se evidenció una poca integridad de la conexión entre el último bulbo faríngeo y el inicio del intestino (Figura 28-3E). Esto último podría relacionarse a una acumulación de bacterias en la faringe y un aumento del esfuerzo de bombeo, lo que se condice con el número de bombeos por minuto que presenta este aislado.



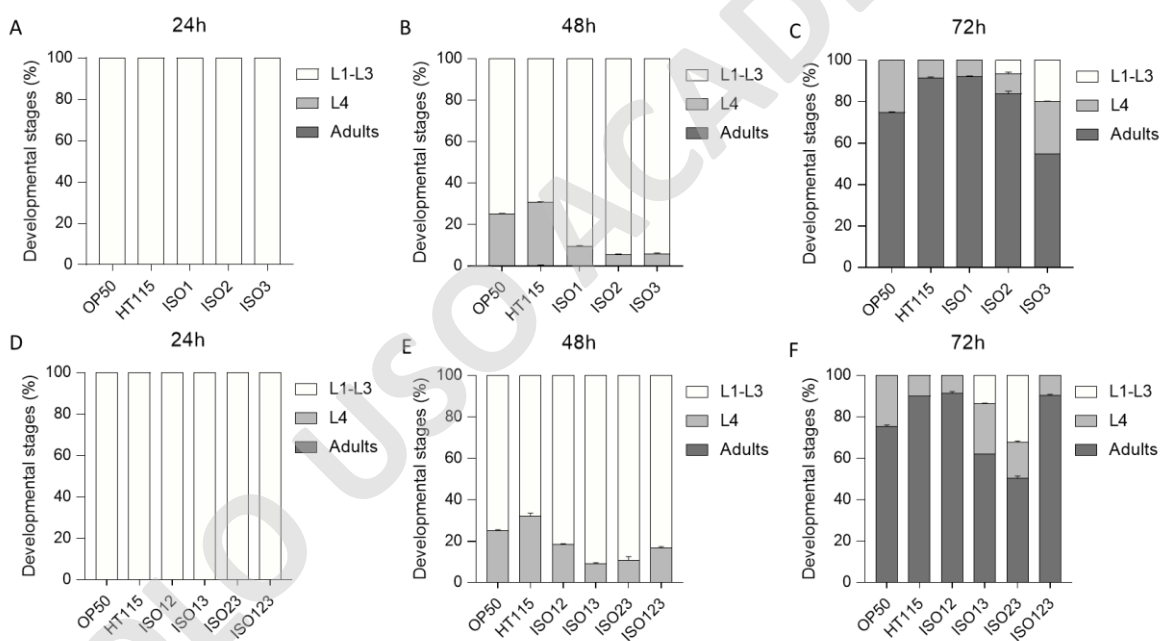
**Figura 29: Crecimiento del césped bacteriano de la mezcla de los aislados en placas y anatomía de la faringe de *C. elegans*.** Fotografías A, B y C representan el crecimiento del césped de bacteria en la placa de NGM durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Fotografías D representan gusanos adultos alimentados con cada bacteria. Fotografías E representan la porción anterior del gusano indicando la faringe y la primera porción del intestino. El grupo 1 es el césped de ISO12 durante tres días, gusanos adultos que fueron alimentados con la bacteria y la porción anterior de la faringe. El grupo 2 es el césped de ISO13 durante tres días, gusanos adultos que fueron alimentados con la bacteria y la porción anterior de la faringe. El grupo 3 es el césped de ISO23 durante tres días, gusanos adultos que fueron alimentados con la bacteria y la porción anterior de la faringe. El grupo 4 es el césped de ISO123 durante tres días, gusanos adultos que fueron alimentados con la bacteria y la porción anterior de la faringe. Se fotografió el césped en una lupa estereoscópica y a los gusanos en el microscopio Nikon Eclipse Ni con microscopía de contraste de interferencia diferencial de Nomarski.

Para las mezclas, se observó un engrosamiento del borde del césped de ISO12 (Figura 29-1C), ISO13 (Figura 29-2C) e ISO23 (Figura 29-3C), con excepción de ISO123 (Figura 29-4C) que presentó un crecimiento constante dentro de las 72 horas. En ISO12 e ISO23 se observó el halo característico que se evidenció en el césped de ISO2 en la figura anterior. En este caso estaría predominando el crecimiento de ISO2 dentro de esas dos mezclas en el césped. Se evidenció un césped mucho más grueso en ISO13 e ISO23, esto sugiere que ISO3 estaría generando un césped más denso. En las imágenes de los grupos de gusanos, ISO13 e ISO23 presentan los bulbos faríngeos más detallados debido a que hay presencia de bacteria dentro de los bulbos (poco más oscuro). No se observó diferencias morfológicas en las faringes de los gusanos en las diferentes dietas, pero si se evidenció

que en ISO13 e ISO23 los gusanos presentaron una porción anterior más delgada que los demás casos (Figura 29-2E y 3E).

Es importante observar el crecimiento de las bacterias en las placas de cultivo para determinar las características del césped que se forma ya que el gusano se alimentará y desarrollará dentro de esas condiciones, lo cual puede repercutir en su conducta. Además, es importante determinar la morfología de la faringe del gusano al ser alimentado con las dietas bacterianas de esta investigación para dilucidar si existen diferencias entre gusanos.

Luego de observar el crecimiento del césped y la morfología de la faringe, se analizó el desarrollo del gusano al ser alimentado con las diferentes dietas bacterianas. Una vez sincronizados los gusanos y terminado el seguimiento del desarrollo se analizó la distribución de los estadios larvarios (Figura 30).

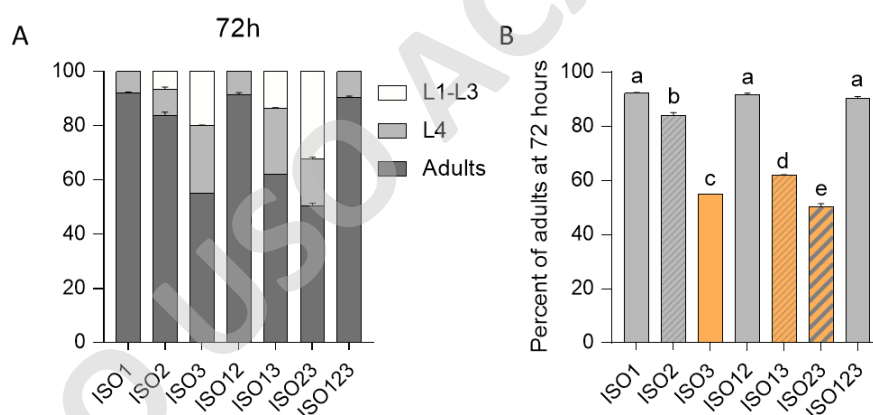


**Figura 30: Curva de desarrollo de *C. elegans* con las dietas bacterianas individuales y mezcladas.** A. Dieta de bacterias individuales a las 24 horas de sincronización. B. Dieta de bacterias individuales a las 48 horas. C. Dieta de bacterias individuales a las 72 horas. D. Dieta de bacterias mezcladas a las 24 horas de sincronización. E. Dieta de bacterias mezcladas a las 48 horas. F. Dieta de bacterias mezcladas a las 72 horas. Análisis estadístico: resumen ANOVA (2 vías): Interacción p-value <0.001. Análisis Post hoc (test Tukey) con múltiples comparaciones entre todas las dietas bacterianas. Significancia estadística (\*\*\*\*) entre *E. coli* OP50 con los aislados individuales y sus mezclas.

En el análisis de la curva de desarrollo, para la dieta individual como la mezcla, todos los gusanos se encuentran en los estadios L1-L3 a las 24 horas (Figura 30A-D). En las 48 horas existe un aumento

de gusanos L4 para las bacterias *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 a diferencia de los aislados bacterianos (Figura 30B). En cambio, en las mezclas a 48 horas se observa un mayor número de gusanos L4, sobre todo en la mezcla ISO123 (Figura 30E). A las 72 horas en las dietas individuales se puede observar un aumento considerable de los gusanos en estadio adulto y muy pocos L4, se observó que *E. coli* HT115 e ISO1 son las bacterias que promueven el desarrollo más rápido dentro de las dietas individuales. Por otro lado, ISO3 presentó ser la bacteria que disminuye el desarrollo generando gusanos de diferentes estadios a las 72 horas en comparación a las demás dietas individuales (Figura 30C).

En las 72 horas de las mezclas, se observó un desarrollo similar en ISO12 e ISO1, pero para ISO13 e ISO23 se generó una disminución en el desarrollo. Esto indica que el factor clave para entender el desarrollo es cuando existe la presencia de ISO3 en las mezclas y que ISO123 promueve el desarrollo de los gusanos (Figura 30F). Debido a que los ensayos de conducta y los neuronales se realizan a 72 horas, se analizó los diferentes estadios a los tres días y la comparación del estadio adulto dentro de las dietas bacterianas (Figura 31).



**Figura 31: Curva de desarrollo de *C. elegans* con las dietas bacterianas individuales y mezclas a las 72 horas.** A. En el gráfico aparecen los estadios larvarios de todas las dietas bacterianas a las 72 horas. B. En el gráfico aparece el porcentaje de gusanos adultos a las 72 horas de todas las dietas bacterianas. Dentro de la comparación, ISO1, ISO12 e ISO123 son similares a diferencia de ISO2, ISO3, ISO13 e ISO23 que presentaron ser diferentes entre todas. Análisis estadístico: resumen ANOVA (una vía): p-value <0.0001.  $R^2 = 0.997$ . Análisis Post hoc (test de Tukey) con comparaciones múltiples entre todas las bacterias. Significancia estadística (\*\*\*\*) para todas las dietas con excepción de ISO1 con ISO12 e ISO123, y entre ISO12 con ISO123 que fue no significativa (ns).

Dentro del análisis estadístico, se realizó múltiples comparaciones entre todas las dietas bacterianas. Para ISO1, ISO12 e ISO123 presentaron ser dietas similares (ns) por ser las que tenían mayor porcentaje de gusanos adultos a las 72 horas (Figura 31B). También se observó que ISO3,

ISO13 e ISO23 resultaron ser totalmente diferentes entre sí (\*\*\*\*) y las demás dietas. Esto podría determinar que el factor de ISO3 es el que estaría retrasando el desarrollo de los gusanos al alimentarse de ISO3 individual y en sus mezclas con las demás bacterias.

Los datos anteriores ayudan a comprender el desarrollo del gusano frente a diferentes dietas bacterianas y otorgan información relevante para poder realizar experimentos sincrónicos.

#### 4.2.5 Análisis del movimiento de *C. elegans* dentro del césped

Uno de los comportamientos importantes para dilucidar si al gusano prefiere una bacteria o no, son las huellas (tracks) que deja en el césped. Generalmente las bacterias de buena calidad generan un movimiento tipo *dwelling* y las bacterias de con un bajo aporte nutricional generan un movimiento tipo *roaming*. Para esto, se analizó el movimiento de los gusanos dentro del césped de diferentes bacterias y sus mezclas. Una vez analizadas las placas, los resultados se registraron en la Tabla 9.

**Tabla 9:** Movimiento dentro del césped de bacteria de *C. elegans*.

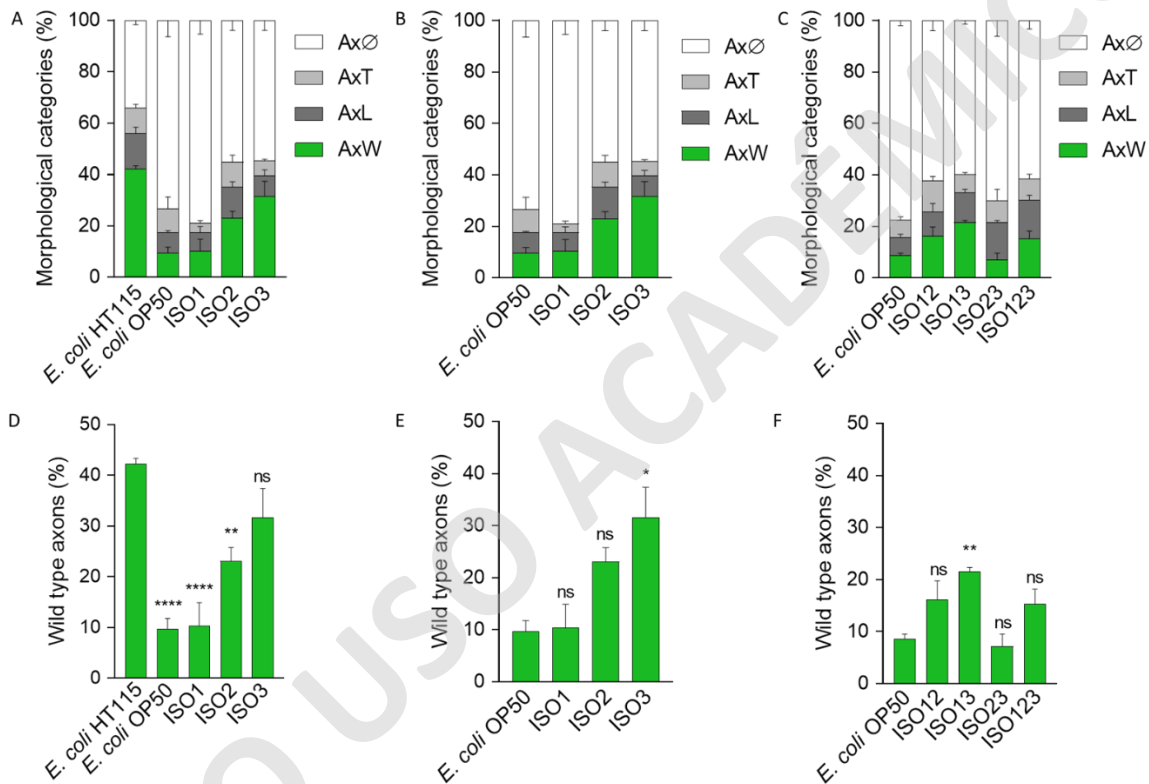
Cepa de Bacteria	<i>Dwelling</i>	<i>Roaming</i>
OP50		X
HT115	X	
ISO1		X
ISO2		X
ISO3	X	
ISO12		X
ISO13		X
ISO23	X	
ISO123		X

En el análisis del movimiento del gusano se identificó que *E. coli* HT115, ISO3 e ISO23 presentaron un movimiento tipo *dwelling*, indicando que son bacterias que el gusano prefiere y que generan un aporte nutricional. En cambio, las bacterias *E. coli* OP50, ISO1, ISO2, ISO12, ISO3 e ISO123 presentaron un movimiento de tipo *roaming* que demuestra que son bacterias que el gusano considera de mala calidad y con un aporte nutricional bajo. Es importante destacar que ISO1 es un patógeno, por lo que esto sugiere que, al estar mezclado con otras bacterias en la placa, podría estropear la preferencia durante el crecimiento del consorcio o disminuyendo la atractividad de la otra bacteria en la placa de cultivo.

#### 4.3 Análisis de la morfología neuronal del gusano *mec-4d* frente a las dietas bacterianas



Una vez determinados los efectos de las diferentes dietas bacterianas en la conducta del gusano, se decidió analizar los efectos que podría generar en la fisiología del gusano al alimentarse con cada dieta. Se realizó un análisis de neuroprotección para observar la morfología de la neurona AVM durante 72 horas para ver si existe algún efecto neuroprotector o neurodegenerativo por parte de las bacterias individuales o como consorcio. Por tanto, se sincronizó gusanos en cada dieta bacteriana para ser observados durante 72 horas con microscopía de fluorescencia para determinar las categorías morfológicas de la AVM (Figura 32).



**Figura 32: Integridad morfológica de la neurona AVM en dietas bacterianas individuales y sus mezclas. A.** Categorías morfológicas de la AVM y el axón tipo salvaje de las dietas bacterianas individuales comparadas contra *E. coli* HT115. **B.** Categorías morfológicas de la AVM y el axón tipo salvaje de las dietas bacterianas individuales comparadas contra *E. coli* OP50. **C.** Categorías morfológicas de la AVM y el axón tipo salvaje de las mezclas de las bacterianas comparadas contra *E. coli* OP50. **D.** Comparación del efecto neuroprotector de *E. coli* HT115 contra las demás dietas bacterianas individuales en el axón tipo salvaje. **E.** Comparación del efecto neuroprotector de *E. coli* OP50 contra las demás dietas bacterianas individuales en el axón tipo salvaje. **F.** Comparación del efecto neuroprotector de *E. coli* OP50 contra las demás dietas bacterianas mezcladas en el axón tipo salvaje. Análisis estadístico: ANOVA de una vía.  $p\text{-value} < 0.0001$ .  $R^2 = 0.8811$  (para A, B y C). Análisis estadístico: resumen ANOVA (2 vías):  $p\text{-value} < 0.0001$  y  $R^2 = 0.8811$  (Para D, E y F). Análisis Post hoc (test de Dunnett) de comparaciones múltiples entre las dietas bacterianas. Significancia estadística (\*\*\*\*) comparando *E. coli* HT115 con *E. coli* OP50 e ISO1. *E. coli* HT115 con ISO3 no hay diferencia significativa (ns).

Luego de analizar cada grupo de gusanos en las diferentes bacterias, se comparó con *E. coli* HT115 que es la bacteria con la mayor neuroprotección descrita en el laboratorio (97) (Figura 32A). ISO3 presenta un efecto neuroprotector, pero ISO1 que no presenta un efecto neuroprotector. ISO1 tiene un menor efecto neuroprotector que *E. coli* OP50 que está descrita ser una bacteria de mala calidad para el gusano. Al comparar los aislados bacterianos con la bacteria control *E. coli* OP50, se identificó que ISO3 es la bacteria que neuroprotege (Figura 32B). Luego, se comparó *E. coli* OP50 contra las dietas mezcladas y se identificó que ISO13 presenta un efecto neuroprotector mayor, a diferencia de ISO23 que presenta el menor efecto neuroprotector de todas las mezclas.

Se puede observar que ISO123 neuroprotege un poco más que *E. coli* OP50 (Figura 32C). Se decidió analizar la diferencia de los axones tipo silvestres para después determinar si ese efecto neuroprotector también podría ser funcional, por lo que se comparó sólo la categoría de axón tipo silvestre dentro de las dietas bacterianas (Figura 32A).

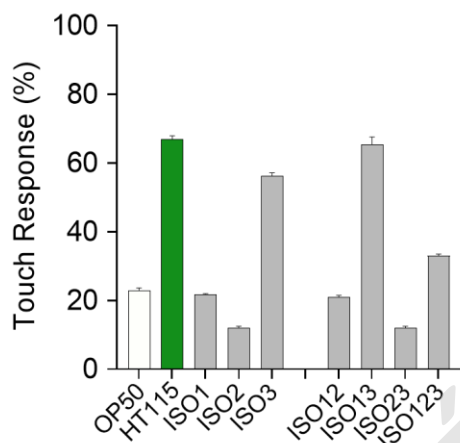
En el análisis estadístico de los axones silvestres, no existe una diferencia significativa (ns) entre la comparación de *E. coli* HT115 con ISO3 en el efecto neuroprotector, pero si existe una diferencia significativa con *E. coli* OP50 e ISO1 (\*\*\*\*) (Figura 32A). El análisis estadístico y comparativo con *E. coli* OP50 para las dietas individuales y mezcladas, se identificó que existe diferencias significativas en el efecto neuroprotector de ISO3 contra *E. coli* OP50. Sin embargo, no existe una diferencia significativa (ns) frente a ISO1 e ISO2 para la comparación contra *E. coli* OP50 (Figura 32B). Finalmente, se comparó *E. coli* OP50 con las dietas mezcladas, se determinó que existe una diferencia significativa (\*\*) en ISO13 en comparación con *E. coli* OP50 y no significativa (ns) para ISO12, ISO23 e ISO123 (Figura 32C).

Al analizar las diferentes dietas existe un factor común de ISO3 en la neuroprotección, pero que se ve perjudicada al ser mezclada con ISO2 y refuerza su efecto al ser mezclada con ISO1. Estos datos sugieren que al mezclar cierto tipo de bacterias entre si puede generar un mismo efecto neuroprotector al complementar a la otra bacteria. Sin embargo, existe el caso contrario de que pueda estropear el efecto neuroprotector de la que neuroprotege.

#### **4.4 Determinación de funcionalidad neuronal de *C. elegans***

En el experimento anterior se determinó la morfología de la neurona AVM en las diferentes dietas bacterianas. Es importante contrastar los resultados obtenidos de neuroprotección debido a que se puede observar la integridad de la neurona, pero no se sabe si es funcional al tacto suave. Por esa

razón, se evaluó la respuesta al tacto de los gusanos alimentados con diferentes dietas luego de 72 horas. Para esto se graficó los resultados según responde o no responde al tacto suave (Figura 34).



**Figura 34: Ensayo de respuesta al tacto suave del gusano *mec-4d* frente a diferentes dietas bacterianas y sus mezclas.** En blanco se indica la bacteria *E. coli* OP50 una bacteria de mala calidad y en verde se presenta *E. coli* HT115 una bacteria de buena calidad. La respuesta se graficó en porcentaje de respuesta y no respuesta. Análisis estadístico: resumen ANOVA (una vía): p-value <0.0001 y  $R^2 = 0.9946$ . Análisis Post hoc (test de Tukey) con comparaciones múltiples entre todas las dietas bacterianas. Comparación entre *E. coli* HT115 con significancia estadística (\*\*\*) con ISO1, ISO2, ISO12, ISO23 e ISO123. Sin significancia estadística (ns) entre *E. coli* HT115 e ISO13.

Se observó que existe una respuesta significativa para ISO3 y una respuesta muy baja en ISO2, incluso menor que *E. coli* OP50. Para las mezclas, se evidenció que ISO13 presentó un alto porcentaje de respuesta al tacto en comparación a ISO23 que presentó una respuesta muy similar a ISO2. En el análisis estadístico, se realizó una comparación múltiple con todas las dietas y se evidenció que existe una diferencia significativa (\*\*\*\*) al comparar *E. coli* HT115 con ISO1, ISO2, ISO12, ISO23 e ISO123 que presentaron no tener una funcionalidad neuronal para el gusano. Sin embargo, se encontró que no existe una diferencia significativa (ns) al comparar las dietas *E. coli* HT115 e ISO13, por lo que ambas dietas presentan una verdadera mejora para la funcionalidad y estabilidad del axón.

Estos resultados sugieren que existe una relación con los resultados obtenidos en el análisis de la morfología neuronal y se puede describir que existe una ganancia de función frente a las dietas ISO3 e ISO13. No obstante, ISO123 presentó ser mucho mejor que *E. coli* OP50 lo que estaría ligado a la interacción de varios factores como ISO3 (neuroprotector) e ISO2 (neurodegenerativo) para gatillar un consorcio que podría simular un hábitat natural donde se comunican con otras especies.

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1 *Salmonella enterica* (ISO1), *Stenotrophomonas humi* (ISO2), *Bacillus pumilus* (ISO3) y su caracterización como posibles dietas bacterianas para *C. elegans*

En el presente trabajo de investigación se utilizaron tres aislados bacterianos para analizar la conducta y fisiología de *C. elegans*. Se encontró que dos eran propios del medio ambiente donde normalmente habita el gusano. Antes de alimentar al gusano con estas bacterias y observar los efectos que podrían generar, se decidió identificar qué bacterias eran y caracterizarlas mediante técnicas microbiológicas.

Para identificarlas, se secuenció su material genético, se ensambló sus genomas y se mapearon sus secuencias contra genomas de referencia. El análisis del control de calidad de Quast entregó información sobre los ensamblajes de los genomas, como el tamaño del genoma, número de contigs, contenido GC, N50, entre otros. Al comparar con genomas de referencia se encontró que hay similitudes en los valores del tamaño del genoma en Mb y el contenido GC de los tres aislados bacterianos (94, 95, 96).

Otro parámetro relevante fue el número de contigs que se formó por cada ensamblaje, mientras menos número de contigs se formen, mayor continuidad tiene el ensamblaje. Aunque ISO1 presentó mayor número de contigs que las otras bacterias, no quiere decir que fuese exitoso el ensamblaje. Esto se debe a que presentó contigs de gran tamaño generando que la información de las secuencias sea continua para su posterior análisis. En general, los contigs pequeños no otorgan mucha información para hacer un análisis de los genes que contiene el genoma. Lo ideal es ensamblar y terminar con un solo contig, donde se interpreta que se tiene el genoma circular cerrado completo de cada bacteria. Este último caso se puede realizar cuando se hacen ensamblajes con genomas de referencias o se utilizan lecturas largas (*long reads*). Al tener ensamblajes de buena calidad nos permite hacer análisis más específicos contra secuencias de genes existentes y de interés, para así complementar futuros análisis con estas bacterias.

El análisis filogenético de las bacterias ayudó a poder identificar con mayor claridad cuáles eran los aislados bacterianos y qué bacterias estaban más cercanas dentro del análisis. Se logró identificar que ISO2) pertenece al género *Stenotrophomonas*, que están clasificadas como Gamma-proteobacterias potencialmente patógenas para el gusano y otros animales (69). Para corroborar

que ISO2 es una bacteria del suelo se observó una relación próxima con *Stenotrophomonas terrae*. Ambas están descritas como reductoras de nitrógeno y que han sido aisladas desde el suelo (86).

ISO3 se encuentra dentro del género *Bacillus*, se decidió mapear contra otros *Bacillus* que se encuentran en el suelo como *Bacillus subtilis* y *Bacillus soli*. No se encontró una similitud en el mapeo contra los *Bacillus* descritos anteriormente. Este resultado se corrobora con el árbol filogenético en el cual sí existe un mayor porcentaje de identidad por los *Bacillus* que se encuentran cercanos a ISO3.

Para el crecimiento de los aislados se identificó que a 30°C crecen con mayor velocidad y no permite observar las etapas de crecimiento claras dentro de la curva, como la fase logarítmica, exponencial y estacionaria. En comparación a las curvas obtenidas por las bacterias del laboratorio, se pueden evidenciar claramente las fases de crecimiento. Esto último se debe a que son bacterias domesticadas en el laboratorio con patrones de crecimiento conocidos, a diferencia de bacterias de las cuales se desconocen sus parámetros de crecimiento.

Para ISO1, está descrito que su temperatura óptima de crecimiento es 37°C, por lo que resulta extraño que presente un crecimiento acelerado similar a los otros aislados. En los valores de UFC, se observó que ISO2 e ISO3 presentan un número de colonias similares al igual que su relación de absorbancia en el tiempo. Esto se relaciona a que crecen de forma similar bajo las mismas condiciones. En cambio, ISO1, que presentó un crecimiento acelerado, tiene un bajo número de colonias una vez que alcanza el mismo tiempo que ISO2 e ISO3.

Lo anterior indica que cada aislado debería tener su propia temperatura y tiempo de crecimiento. Esto podría evidenciarse al realizar curvas de crecimiento por separado bajo diferentes parámetros como la temperatura y las revoluciones por minuto (r.p.m.). Otro punto que considerar es poder estandarizar parámetros de crecimiento para que ningún aislado se vea perjudicado mientras se crezcan juntos. Esto nos lleva a entender que la estandarización de protocolos de crecimiento para bacterias que provienen del medio ambiente es de suma importancia para realizar estudios más detallados sobre la condición en que se desarrollan y conviven las bacterias.

En la batería bioquímica se decidió analizar la interacción de los aislados bacterianos dentro de cada medio de cultivo. Esta información nos indicará cómo están interactuando las bacterias entre sí a la hora de disponer de ciertos nutrientes en el medio, y si existe diferencia al estar de forma individual. En los resultados de las baterías bioquímicas de las mezclas bacterianas se evidenció que en la

intersección del lugar donde se inoculó cada bacteria existe predominancia en la utilización de ciertos sustratos gracias a los ensayos colorimétricos.

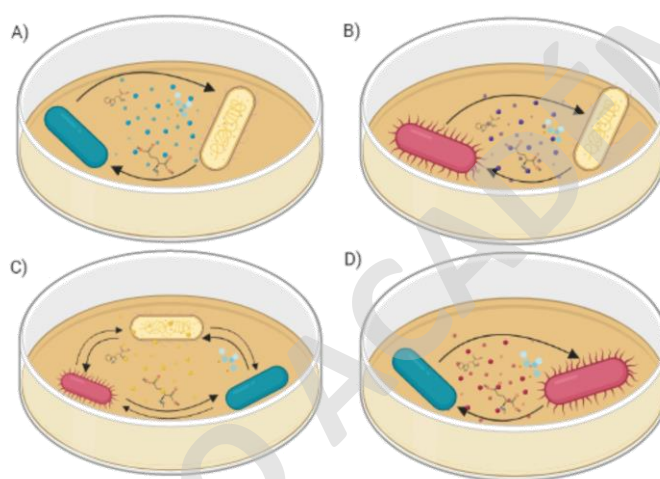
Para el medio TSI existe un predominio de ISO1 sobre ISO3 en la interacción de ISO13, lo que estaría indicando que ISO1 es capaz de utilizar la glucosa más rápido que ISO3, opacando su reacción final. En ISO23 la reacción de ISO3 es débil en la interacción con ISO2, esto indica que ISO2 evita que ISO3 pueda crecer con normalidad en la placa. En ISO12, ISO2 evita que ISO1 consuma la glucosa del medio, por lo que no se considera una reacción positiva por completo, perjudicando la captura de glucosa de ISO1 y, por ende, su metabolismo. Finalmente, ISO123 presentó en las tres interacciones que la reacción de ISO3 fue opacada por ISO1 e ISO2, lo que estaría generando un efecto en conjunto contra ISO3 de parte de ISO1 e ISO2 en la interacción dentro de la placa.

Para el medio CIT, en ISO12 predominó la reacción de ISO1 por sobre la de ISO2 en utilizar el citrato del medio, permitiendo observar cómo se extendía por el sector de ISO2. En la intersección de ISO123 se observa que ISO1 logra predominar entre los otros aislados, pero no se extiende hacia los sectores donde no hay mezcla de bacterias. Esto podría decir que la interacción ISO23 estaría retrasando o inhibiendo la captura de citrato por la porción en donde no se encontraría ISO1.

El medio LIA, debido a que todos los aislados presentan la misma reacción, un ensayo cuantitativo sería más útil en lugar de uno cualitativo para poder diferenciar dos bacterias. El resultado de la reacción de la lisina desaminada no cambió al mezclar las bacterias. Esto se relaciona a que bacterias de las cepas *Proteus*, *Providencia*, y en algunos casos *Morganella*, desaminan la lisina, lo que no sería el caso de los aislados bacterianos que no pertenecen a ninguno de estos géneros.

En COR, ninguna interacción de bacterias presentó pigmentación, lo que indicaría que la interacción entre los aislados no genera un cambio de color. Finalmente, en el medio UREA, *E. coli* OP50 - *E. coli*, HT115 indicó que ambas bacterias pueden proliferar en conjunto sin que una perjudique el crecimiento de otra por la disminución de pH. Esto se debe principalmente a que ambas bacterias pertenecen al mismo género. Como ISO3 tiene ureasa, puede estar interfiriendo en el crecimiento de los aislados en las mezclas ISO13 e ISO23, debido a que acidifica el medio e inhibe el crecimiento de las otras bacterias. Pero en ISO13, ISO1 puede crecer sin problemas, lo cual indicaría que una baja de pH no sería un factor limitante en su proliferación normal. En ISO123, la porción de ISO2 no se vio tan afectada como ISO23 de forma individual. La reacción de la placa completa es muy similar a la placa de ISO13, por lo que ISO1 e ISO3 no presentan dificultad alguna al crecer en conjunto e interactuar entre sí, debido a una diferencia de acidez en el medio.

Dentro de la interacción que resultó de la batería bioquímica se describe como un acercamiento inicial para poder caracterizar y discernir las bacterias mediante diferencias metabólicas. También se complementa el estudio sobre qué ocurre cuando se encuentran creciendo juntas dentro de una misma placa. Con ello, se generó una propuesta de la comunicación entre las bacterias que podrían dilucidar de qué manera interactúan entre sí (Figura 35). Por lo tanto, uno de los puntos importantes es evidenciar posibles efectos inhibitorios entre ellas al momento de crecer juntas. Con esto existe un factor adicional que no reside en la utilización de un sustrato o la presencia de una enzima, sino que en la generación de moléculas inhibitorias para proliferar en un ambiente competitivo en nutrientes y adverso en condiciones de crecimiento para las bacterias.



**Figura 35: Esquema de la propuesta de comunicación entre bacterias dentro de la placa de cultivo.** A), B) y D) describen una comunicación bacteriana por intercambio de metabolitos que pueden utilizar en conjunto. C) Describe la interacción entre las tres bacterias del consorcio y una posible comunicación entre ellas mediante señales químicas.

En la batería de antibióticos, desde el punto de vista de selección, resulta favorable que uno de los aislados presente una sensibilidad a un antibiótico. Con ello, se podrá analizar las UFC intestinales del gusano con las mezclas ISO12 e ISO23, debido a que se podrá cultivar en una placa con AZT para evitar que crezca ISO2. Otro punto importante es que como presentaron sensibilidad ante los otros antibióticos, como AMP, se podrá transformar con plásmidos que presenten un marcador de selección como resistencia a AMP, lo que facilitará el conteo de colonias. También se podrán ocupar otros vectores de expresión con diferentes marcadores de expresión de los antibióticos a los cuales son sensibles. Se analizaron otras bacterias del mismo género que ISO2, y se observó que *Stenotrophomonas maltophilia*, bacteria que se encontró lejana dentro del árbol filogenético, es un patógeno oportunista resistente a múltiples fármacos en entornos hospitalarios y comunitarios (87).

Esto se relaciona con la sensibilidad que presenta ISO2 contra los antibióticos, ya que es una bacteria del suelo con muy baja exposición a antibióticos de uso clínico y de laboratorio. A diferencia de *S. maltophilia*, que está descrita como una bacteria hospitalaria con mayor exposición a ciertos fármacos y que puede ir generando cierta resistencia.

Para ISO1, se han identificado diferentes aislados resistentes a antibióticos de la misma cepa y se estima que a futuro irá en aumento generando una verdadera amenaza para la salud pública (88). En ISO3 se ha descrito que no se considera una cepa patógena para los seres humanos (89) y que presenta sensibilidad a ciertos antibióticos, pero aún no se describe su mecanismo de acción contra ellos (90). Cabe destacar un punto importante es que ISO3 produce ciertas moléculas antimicrobianas como la pumilina (91), que es similar a la subtenolina secretada por *B. subtilis*.

Como se mencionó en la introducción de esta investigación, uno de los fenómenos que están intrínsecamente relacionados a cómo las bacterias interactúan entre sí y los efectos que generan al ser expuestas a diversas condiciones, como temperatura y antibióticos, es la plasticidad evolutiva. Es por esto que gran parte de los experimentos se enfocaron en caracterizar con diferentes técnicas de microbiología a estos aislados, debido a la diferencia que se puede encontrar con respecto a microorganismos ya domesticados, que presentan una plasticidad evolutiva y ecológica diferente, generando resultados distintos para futuros experimentos que se quieran realizar sin las condiciones de laboratorio.

## **5.2 Las bacterias como consorcio cambian la conducta de *C. elegans* a diferencia de las bacterias individuales**

Se decidió analizar las diferencias entre las dietas individuales y mezcladas para determinar si existe un cambio en la conducta del gusano. Tanto en las dietas individuales como en las mezclas, ISO3 fue un candidato en estimular el bombeo faríngeo. En ISO13 se reconoce que ISO3 estaría generando el aumento en el bombeo faríngeo, ya que ISO1 de manera individual no representa un cambio importante. No obstante, ISO1 presentó tener un valor mayor a *E. coli* OP50 en el bombeo faríngeo. El efecto de potenciar el bombeo faríngeo con ISO3 se puede evidenciar nuevamente en el aumento de bombeos en ISO23, puesto que ISO2 representa la bacteria con menor número de bombeos en las dietas individuales. Finalmente, en ISO123, el efecto de ISO3 se vería disminuido por la presencia de ISO1 e ISO2, pero aun así sigue siendo mayor que *E. coli* OP50.



Este ensayo indica que las mezclas bacterianas presentan un mayor bombeo que *E. coli* OP50, y la única que supera a *E. coli* HT115 es ISO13. Con ello, se obtiene que no todas las mezclas son beneficiosas para tener un mayor bombeo faríngeo y que tener una sola bacteria de alimento sería mejor.

Uno de los factores que podría intervenir en el bombeo faríngeo es el tamaño de las bacterias y la cantidad de bacterias que ingresan a la faringe. Mientras va transcurriendo el tiempo hay más colonias de ISO2 e ISO3 durante el crecimiento, lo que podría estar saturando la faringe del gusano, generando una mayor cantidad de bombeos. Pero no se podría explicar por qué ISO2 presenta un bajo número de bombeos. Lo anterior llevaría a estudiar la integridad de la faringe una vez que el gusano se alimenta con ISO2. Dentro del análisis se consideraron dos posibles factores para analizar en el futuro: El primero es que existe una preferencia de ciertos olores de bacterias por sobre otros que gatillan un estímulo de bombeo más rápido en el gusano. El otro es que exista una molécula específica que genere un aumento en el ritmo del bombeo faríngeo. Al no tener evidencia para corroborar lo anterior, nos limitaremos a la intervención de un factor físico que podría incidir en el deterioro o disminución del bombeo.

Se decidió comparar el tiempo de defecación en cada dieta para observar si existe alguna diferencia con *E. coli* OP50 donde su tiempo de defecación se conoce. Dentro de la comparación entre las dietas bacterianas, las mezclas presentaron tener un menor intervalo de tiempo de defecación que las individuales. Estos cambios en los tiempos de defecación podrían estar sujetos a una posible colonización de los aislados bacterianos en el intestino del gusano lo que podría regular el ritmo en que el gusano defeca. A futuro se analizará si estos aislados pueden colonizar el intestino y observar la integridad del intestino para identificar si existe algún deterioro que pueda llevar a un aumento en el tiempo de defecación.

También nos planteamos si existía algún tipo de correlación entre el bombeo faríngeo y el tiempo de defecación. No existe un fenómeno de correlación entre las dietas individuales y mezcladas, lo que podría indicar que los tres aislados son muy diferentes entre sí. Por ello, cada uno aporta su característica particular al fenómeno de este tipo de conducta.

Se comparó la preferencia entre las dietas bacterianas individuales y las mezclas. Se evidenció que el gusano tiene una mayor preferencia hacia *E. coli* HT115, ISO1, ISO2 e ISO3 al comparar con *E. coli* OP50, con excepción de ISO1 que el gusano prefiere más a *E. coli* OP50. Esto toma sentido debido a que ISO1 es un patógeno para el gusano y no presenta un comportamiento de preferencia, sino uno

de evasión. Para simular un ambiente natural de múltiples opciones para el gusano se analizó la preferencia de las dietas mezcladas. El gusano prefiere a *E. coli* OP50 por sobre ISO23, lo que indica que esta mezcla no es llamativa para el gusano. Esta interacción debiese generar algún compuesto que cause evasión como si fuese un patógeno. Sin embargo, el gusano presentó una preferencia a todas las demás mezclas en comparación con *E. coli* OP50.

Pese a que el gusano se enfrentó a ISO123, prefirió a *E. coli* OP50 y deducimos que puede deberse a que la mezcla opaca ciertos aromas atractivos para el gusano. Con esto, el gusano prefiere ir a un olor conocido, como *E. coli* OP50, debido a que proviene de esa bacteria. Para *E. coli* HT115, la mezcla ISO123 fue la que mostró el mayor índice de preferencia de todas las mezclas, e ISO13 presentó una preferencia similar con *E. coli* HT115. Esto se podría relacionar a que el gusano se ve enfrentado a bacterias desconocidas para este, que al tener más de un estímulo para ISO123 prefiere probar ese césped. Para ISO13 ocurre un efecto similar al de *E. coli* OP50, por lo que esta mezcla se convierte en la candidata para realizar un análisis de compuestos volátiles para el gusano. Al comparar los índices de preferencia de las dietas individuales contra las mezclas en la transición de las 12 a las 24 horas, se evidenció que el gusano muestra una mayor preferencia hacia *E. coli* HT115, tanto en las dietas de bacterias mezcladas como en las individuales. En cambio, existen tanto dietas individuales como mezclas que son más preferidas por el gusano al ser comparadas con *E. coli* OP50.

En los ensayos de preferencia de los sectores de la placa, los gusanos presentan una mayor preferencia por el borde en ISO3. Los gusanos buscan los bordes debido a que hay poco oxígeno en esos sectores y se dedican a alimentarse, a diferencia del centro, donde hay más oxígeno en la placa. En las mezclas, ISO23 presentó una distribución de los gusanos dentro del césped luego de que al principio se encontraran en el borde. Esto indica que la preferencia por ISO3 se ve opacada por ISO2 en el centro del césped. Al hacer la comparación de las bacterias individuales con las mezclas de bacterias, se logró concluir que, en las mezclas, los gusanos permanecen en el centro del césped, a diferencia de las bacterias individuales, donde los gusanos permanecen en el borde y el centro. Esto se puede relacionar a la cantidad de estímulos dentro de la placa que gatillan que el gusano prefiera un solo sector al tener más de una bacteria en la placa.

El movimiento que presentaron los gusanos en *E. coli* HT115, ISO3 e ISO23 fue tipo *dwelling* que evidencia una dieta de buena calidad para el gusano (14). Resulta extraño para la dieta ISO13 presente un movimiento tipo *roaming*, por lo que ISO1 estaría estropeando la calidad de la bacteria

para el gusano. A pesar de que ISO2 presente un movimiento tipo *roaming*, se ve mejorado por la adición de ISO3 en la mezcla. Lo que indicaría que las dietas con un aporte nutricional bajo podrían mejorarse al agregar bacterias que presenten un movimiento de tipo *dwelling*.

Probablemente, la interacción entre especies comprende grandes cambios en ambas entidades participantes. Estos cambios, especialmente en la expresión génica, también deberían reflejar la influencia de los demás de una manera dependiente del tiempo y la generación (51). *C. elegans* se siente atraído por los químicos volátiles liberados por las bacterias y puede distinguir entre las mezclas de volátiles liberadas por diferentes especies de bacterias, lo cual es importante para encontrar alimentos nutritivos y evitar microorganismos dañinos (43, 76). Por lo tanto, la capacidad de modificar las preferencias para bacterias específicas dentro de la vida de un organismo, así como en una escala de tiempo evolutiva, puede ser una característica importante de cómo *C. elegans* navega en el complejo entorno microbiano (79).

Finalmente, dentro de los factores importantes se analizó el desarrollo del gusano al ser alimentado con diferentes dietas bacterianas. Para las dietas individuales, ISO3 presentó ser una bacteria que retrasa el desarrollo normal del gusano. ISO1 y *E. coli* HT115 resultaron ser dietas que aceleran el desarrollo del gusano. Sin embargo, al analizar las dietas mezcladas se evidenció que ISO23 retrasa más el desarrollo del gusano. Asimismo, ISO13 también presentó un retraso del desarrollo, lo que nos lleva a deducir que ISO3 es el factor que retrasa el desarrollo. Pero, al estar ISO2 dentro de la mezcla, gatilla un desarrollo aún más lento, lo que genera un efecto fisiológico importante siendo la mezcla candidata para estudiar los mecanismos de envejecimiento.

Al hacer la comparación entre las dietas individuales y las mezclas, se evidenció que al mezclar las bacterias se genera un retraso en el desarrollo en comparación con bacterias individuales. Esto podría relacionarse al ambiente en el que vive naturalmente el gusano y que demuestra que la interacción de más de una bacteria en la placa podría ser beneficioso para la salud del gusano retrasando su envejecimiento. Con ello se podría inferir que al utilizar sólo dietas monoxénicas, el desarrollo del gusano podría verse afectado.

Es importante destacar que son bacterias del medio ambiente y que probablemente estamos en constante contacto con ellas, lo que genera un posible estudio para bacterias que ayudan a la salud humana. También es importante mencionar que ISO13 se ve afectada por ISO3, puesto que ISO1 ya presenta un desarrollo más rápido, por lo que se evidencia una clara influencia hacia ISO1 por parte de ISO3. Una correlación moderada entre la cepa bacteriana preferida y la cepa bacteriana que

aumentó la tasa de crecimiento de *C. elegans* de L1 a adulto, puede sugerir que *C. elegans* ha evolucionado para preferir bacterias beneficiosas. El hongo nematófago, *Arthrobotrys oligospora*, que se alimenta de *C. elegans*, también ha demostrado liberar varios olores atractivos, incluido el 3-metil-2-butenato de metilo (4).

### **5.3 *Bacillus pumilus* (ISO3) es una bacteria candidata con un potencial efecto neuroprotector en *C. elegans***

Dentro de los trabajos realizados en el laboratorio, ha sido importante identificar bacterias candidatas que puedan tener un efecto neuroprotector usando el modelo de degeneración de *mec-4d*. Para esto se compararon las dietas bacterianas individuales con *E. coli* HT115, que representa la bacteria con mejor efecto neuroprotector del laboratorio al mantener la integridad de la neurona (97). ISO3 presentó tener el mayor efecto neuroprotector a las 72 horas, en comparación a los otros aislados. ISO1 presentó el peor efecto neuroprotector, incluso más bajo que *E. coli* OP50, la cual se ha descrito como una bacteria de mala calidad y con un bajo efecto neuroprotector. Al comparar las dietas con *E. coli* OP50, se encontró una diferencia significativa del efecto neuroprotector de ISO3. Sin embargo, al comparar *E. coli* OP50 con las mezclas de dietas bacterianas se encontró que ISO13 presentó el mayor efecto neuroprotector de las mezclas. Por otro lado, ISO23 resultó ser la peor mezcla para generar un efecto neuroprotector. Lo que indica que, a nivel fisiológico, ISO2 perjudica a ISO3 para generar un efecto neuroprotector dentro de la mezcla, y que ISO3 potencia el efecto neuroprotector en ISO1. También se consideró que la mezcla de ISO13, ISO3 está entregando el efecto neuroprotector e ISO1 se ve inalterado dentro de la mezcla, lo que se relaciona fuertemente con todos los resultados anteriores de esta mezcla.

Al comparar el efecto neuroprotector de las dietas individuales contra las mezclas, se identificó que existe una mayor neuroprotección por parte de las bacterias individuales. Esto indica que si una bacteria tiene un efecto neuroprotector frente a otra que no lo tiene y se mezclan, puede perjudicar el efecto de la bacteria buena. De la misma forma, puede ocurrir que no se vea afectado el efecto neuroprotector de una bacteria, como el caso de ISO13, lo que indicaría que ciertas mezclas de bacterias pueden ser perjudiciales para la fisiología del gusano.

Con el fin de observar si el efecto neuroprotector de las dietas se correlaciona con la funcionalidad de la neurona al responder al tacto suave, ISO3 resultó entregar funcionalidad a la neurona AVM, debido a su efecto neuroprotector, que también se ve en la funcionalidad de los gusanos alimentados con ISO13. Los gusanos en ISO23 no respondieron de manera efectiva, lo que se

relaciona con su deficiente efecto neuroprotector. Para el análisis de la morfología y funcionalidad de la AVM, para la mezcla de ISO123, se evidenció que esta mezcla compleja se ve estable dentro de la cantidad de axones tipo salvaje que están con respecto a la funcionalidad de la neurona. Esto podría desarrollar la idea de que las tres bacterias están influenciando directamente en la fisiología del gusano en que cada una entrega su efecto, ya sea positivo o negativo. Esta sumatoria da como resultado que se genere un fenotipo estable en el tiempo y que, al potenciar alguna de las bacterias de la mezcla, podría verse alterado el resultado final, pudiendo ser beneficioso o perjudicial.

Como se discutió anteriormente, dentro de los aislados bacterianos se encontró que ISO2 es una Gamma-proteobacteria (*Xanthomonas* y *Stenotrophomonas*) que podría ser potencialmente patógena. Podríamos inferir que ISO2 individual, y en las mezclas, podría estar deteriorando la fisiología de *C. elegans* de varias maneras, como su integridad intestinal y neuronal. Con ello, podríamos señalar que es probable que haya determinantes genómicos y metabólicos variables dentro de un género (por ejemplo, toxinas, metabolitos, etc.) que afectan su impacto en la fisiología de *C. elegans* (2). Es por esto se consideró que estos consorcios bacterianos, que representan una microbiota simplificada de *C. elegans*, simulan con mayor precisión el entorno microbiano en la naturaleza. Gracias a esto permitirán una disección de cómo estos microorganismos comprometen la fisiología del gusano y las respuestas inmunes innatas (83).

Este modelo de neuroprotección ayuda a dilucidar cómo la alimentación influye en la neuroprotección o neurodegeneración, lo que deja un llamado a seguir investigando entorno al desarrollo de las terapias de bacterias como la microbiota intestinal y las enfermedades neurodegenerativas (58, 59). Se ha reconocido que los mamíferos, incluidos los humanos, tienen una microbiota altamente compleja en sus intestinos que contribuye a la maduración intestinal, la nutrición del huésped y resistencia a los patógenos, así como a regular el metabolismo de la energía del huésped y las respuestas inmunes inflamatorias (78). Los sistemas modelo de mamíferos están sujetos a una gran cantidad de factores complicados (microbiota diversa, antecedentes genéticos variables del huésped, efectos de la dieta). *C. elegans*, por el contrario, ofrece un sistema genéticamente uniforme en el que se pueden introducir cepas bacterianas seleccionadas (92).

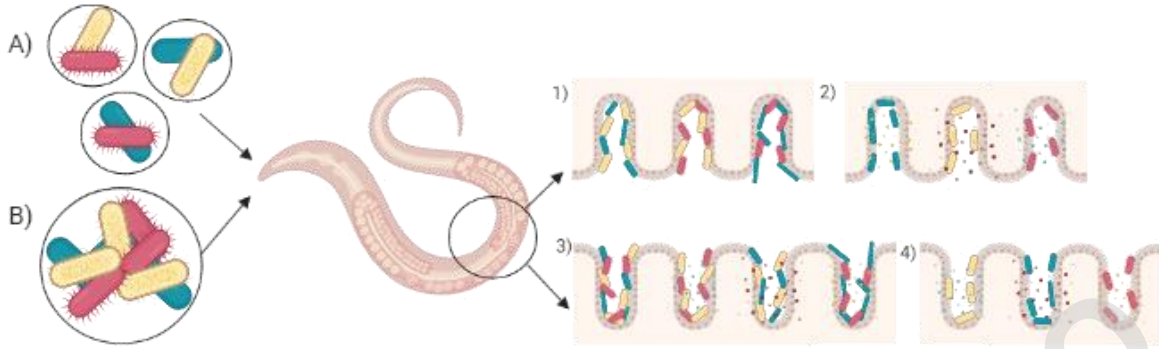
Al analizar los resultados de conducta y fisiología de las dietas bacterianas, se observa que existe una serie de factores que podrían estar interviniendo y modificando tanto el comportamiento como la fisiología completa del gusano. Dentro de los posibles mecanismos moleculares que podrían estar gatillando una respuesta al cambio de la conducta están las moléculas secretadas por las bacterias

que atraen al gusano por sobre otras. Al mezclar las bacterias puede que una de estas utilice la molécula secretada dentro de las mezclas para incorporarla y usarla dentro del metabolismo, lo cual difiere completamente lo que no se condice con tener solo una bacteria frente al gusano. Esto queda descrito para realizar o explicar una cooperatividad metabólica al momento de generar ciertos metabolitos específicos.

Por otro lado, existe un escenario completamente diferente al momento en que las bacterias ingresan al gusano. Como se describió anteriormente, las bacterias pasan por el *grinder* del gusano y solo su contenido intracelular llega a su sistema digestivo para que obtenga los nutrientes de cada bacteria. Sin embargo, a los dos días de alcanzar la etapa adulta, algunas bacterias pueden atravesar el *grinder* y podrían eventualmente colonizar el intestino para generar otro tipo de comunicación entre el gusano y la bacteria. Lo anterior podría incidir en la conducta del gusano al otorgarle ciertos nutrientes que no tenía, e incluso puede protegerlo frente a otras bacterias que quieran perjudicar la salud del gusano. La comunicación entre el gusano y la bacteria a nivel intestinal es de suma importancia porque puede ser una simbiosis, o el gusano puede ejercer una defensa contra ciertas bacterias, liberando péptidos microbianos (56).

Se desarrolló una propuesta en la que se indican las posibles interacciones que pueden estar ocurriendo dentro del intestino del gusano una vez que las bacterias entran (Figura 36). Con ello, se abre la posibilidad de estudiar la interacción dentro del instinto del organismo, gracias a que el gusano es transparente y las bacterias pueden ser transformadas con vectores de expresión fluorescentes.

Como se mencionó anteriormente, en los trabajos previos en el laboratorio se describió que *E. coli* HT115 secreta GABA y genera un efecto neuroprotector para la neurona AVM (97). Mediante estudios metabolómicos de las bacterias individuales y sus mezclas, se podría determinar cuáles son los metabolitos que se presentan en ciertas bacterias y que en otras no. También, hacer una búsqueda de metabolitos neuroprotectores y neurodegenerativos para entender los posibles mecanismos moleculares que podrían estar gatillando una neuroprotección o neurodegeneración en el gusano. Con ello, se pueden realizar estudios comparativos de los diferentes metabolitos encontrados y complementar con una investigación del potencial metabólico del genoma de cada aislado, generando una descripción global del metabolismo de cada bacteria.



**Figura 36: Esquema de propuesta de la relación de *C. elegans* con los aislados bacterianos.** A) Representa las diadas de los aislados bacterianos que ingresan al gusano. B) Representa el consorcio completo de los aislados bacterianos ingresando al gusano. 1), 2), 3) y 4) representan los posibles casos en los cuales las bacterias pueden colonizar el intestino del gusano, favoreciendo su conducta y fisiología.

SOLO USO ACADÉMICO

## 6. CONCLUSIONES

El objetivo de esta tesis fue analizar si existe diferencia en la conducta y fisiología de *C. elegans* frente a bacterias individuales y la mezcla de bacterias, al comparar las bacterias domesticadas en el laboratorio contra bacterias del medio ambiente. A partir de los resultados de este estudio se obtuvo las siguientes conclusiones:

- Se logró identificar y determinar los aislados bacterianos mediante su ensamble de genomas y posterior análisis filogenético con ayuda de herramientas bioinformáticas.
- Las bacterias individuales presentaron tener el mayor bombeo faríngeo que las mezclas de las bacterias, con ISO3 como la bacteria que más bombea comparado a las bacterias del laboratorio.
- Las mezclas de las dietas bacterianas presentaron tener un menor tiempo de defecación que las bacterias individuales.
- El gusano muestra una mayor preferencia a los aislados bacterianos individuales que a la mezcla de los aislados comparado con *E. coli* OP50.
- La mezcla ISO123 resultó ser la dieta más preferida por el gusano al comparar con la dieta de buena calidad *E. coli* HT115.
- Dentro de la distribución de los gusanos en la placa, los gusanos presentaron una preferencia por estar en el centro de la placa a diferencia de las dietas individuales que la distribución fue en el centro y en el borde del césped.
- *E. coli* HT115, ISO3 e ISO23 presentaron un movimiento tipo *dwelling* que las clasifica como dietas de buena calidad para el gusano.
- La mezcla de las dietas bacterianas retrasa el desarrollo del gusano en comparación a las dietas de bacterias individuales.
- ISO3 presentó ser la bacteria con el mejor efecto neuroprotector entre las dietas bacterianas, entregando una mayor funcionalidad a la neurona AVM.

Al analizar la hipótesis que dio origen y sustento a esta investigación, es posible afirmar que existe diferencia en la conducta y fisiología de *Caenorhabditis elegans* al ser alimentado con bacterias del medio ambiente y con las mezclas bacterias en comparación a la dieta estándar del laboratorio.



## 7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS

### 7.1 Implicancias

Este trabajo de grado derivó del aislamiento de un nemátodo *C. elegans* silvestre y su microbiota en los predios de la Universidad Mayor, en Huechuraba. Las bacterias del consorcio se aislaron para poder ser identificadas y estudiar cómo influyen en el comportamiento y la fisiología de *C. elegans*. Adicionalmente, para entender cómo podrían interactuar estas bacterias con el gusano en la naturaleza, se decidió reconstituir el consorcio en parejas y todas juntas. Investigaciones recientes han comenzado a examinar con mayor profundidad el nemátodo fuera del laboratorio, proporcionando una base sólida para una historia natural dentro del modelo.

En primer lugar, una historia natural moderna de *C. elegans* necesita evaluar la dependencia del contexto ambiental y genético de los fenotipos de los organismos. Mediante la exploración de las propiedades naturales que poseen los organismos como variación del genotipo, el medio ambiente, los fenotipos y las interrelaciones entre especies. En general, el progreso hasta la fecha de la integración de la investigación mecánica, evolutiva y ecológica en *C. elegans* ilustra que un organismo modelo más natural también es más poderoso. Esto se debe a que presenta un escenario más completo de los factores que realmente están interviniendo en la naturaleza a diferencia del ambiente controlado en el laboratorio.

*C. elegans* es un modelo importante desde la dimensión de patogénesis como desde el punto de vista del metabolismo, envejecimiento y la biología del desarrollo. Por lo tanto, una comunidad natural simplificada relacionada con la que se encuentra en la naturaleza ahora se puede estudiar en el laboratorio por su impacto en la fisiología de *C. elegans*. Además, no solo es pionero en un sistema simple con un animal de rápido crecimiento que se usa para ecología experimental de la comunidad en un entorno estandarizado, sino que también se une a otros sistemas modelo. Esto sirve para facilitar una mayor comprensión de las vías conservadas que median la influencia de los microorganismos naturales en la fisiología del huésped y viceversa.

Finalmente, luego de este estudio sobre las interacciones interespecie y consolidando el concepto de holobionte, se podrá generar una investigación de alto impacto. Esto es debido a que contiene un estudio sobre cómo las bacterias del medio ambiente son relevantes para el desarrollo de las especies que coexisten con ellas y pueden generar distintos efectos al mezclarlas. Otro punto relevante es la aplicación de la biología de sistemas dentro de este trabajo que permite entender

cómo una serie de factores pueden intervenir en un fenómeno en particular como la dieta y la neurodegeneración.

## **7.2 Recomendaciones**

Para el análisis de la conducta es importante considerar que la manipulación de los gusanos de una placa a otra puede ser un factor estresante para el gusano a la hora de escoger entre dos bacterias. Esto se entiende cuando un gusano proviene de una bacteria completamente distinta a la cual se está analizando su preferencia. Por lo que hay que tener cuidado en la manipulación de gusanos durante los ensayos de preferencia entre bacterias.

Otro punto relevante es seguir caracterizando a los aislados bacterianos, complementar el estudio genético con el análisis transcriptómico en las condiciones de crecimiento establecidas en esta investigación. Para ir más allá aún, poder realizar comparaciones transcriptómicas durante las mezclas de los aislados con el fin de identificar qué genes se expresan cuando crecen de forma individual y en mezclas. Un estudio metabolómico de las bacterias sería relevante para contrastar con el potencial metabólico que está en el genoma de cada aislado bacteriano. Dentro del análisis de los metabolitos de los aislados bacterianos sería identificar los posibles neuroprotectores, neurodegenerativos y los relacionados a la conducta del olfato. Con ello se podría analizar el comportamiento olfativo en cada dieta bacteriana probada en esta investigación. Sin embargo, para determinar el papel exacto de la quimiosensación, se requieren estudios adicionales utilizando el ensayo de quimiotaxis con extractos bacterianos o sobrenadante.

Este estudio proporciona una posible línea de investigación de comportamiento en relación con los metabolitos presentes en los microorganismos o el estudio de la biología de sistemas con análisis ómicos de aislados del medio ambiente y su efecto en el comportamiento y la fisiología.

## **7.3 Proyecciones Futuras**

La búsqueda de nuevos microorganismos en la naturaleza para estudiar su interacción entre ellos y los demás organismos con los cuales conviven, proporciona una poderosa herramienta para comprender los beneficios y daños para la salud animal y humana. Entender cómo interactúan las bacterias en los ecosistemas genera conocimiento relevante para el desafío actual del cambio climático. A medida que el clima cambia, también lo hacen las comunidades bacterianas tanto en su abundancia como en su fisiología. Esto repercute directamente en la conducta de los animales que

coexisten con los consorcios bacterianos en los diferentes ecosistemas que finalmente nos impactará en un futuro.

Una de las proyecciones biotecnológicas de este proyecto es el screening de bacterias del medio ambiente con posibles usos terapéuticos que podrían mejorar la salud tanto de animales como de seres humanos. Gracias al uso de modelos biológicos se pueden estudiar los efectos que pueden generar el uso de bacterias a nivel de comportamiento y fisiológico. Por ejemplo, en un trabajo de investigación reciente abordó las interacciones de *C. elegans* con las bacterias probióticas comensales como *B. subtilis*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, proporcionando nuevos conocimientos sobre los mecanismos por los cuales las bacterias o sus metabolitos influyen en la señalización, el metabolismo y la historia de vida en el *C. elegans* (60).

El rango y la complejidad de las interacciones huésped-microbio se hacen cada vez más evidentes a medida que los estudios a gran escala revelan el papel de la microbiota en la obesidad, el metabolismo de los medicamentos, la resistencia a los patógenos y una gran cantidad de otros rasgos de la historia de vida. Junto con la caracterización de la microbiota, se necesitan sistemas experimentales para validar, dilucidar y ampliar los resultados obtenidos que pueden ser procesados por bioinformática.

Otra proyección biotecnológica es la identificación de compuestos volátiles liberados por ciertas bacterias para el estudio del comportamiento de animales en la naturaleza y cómo el cambio climático estaría afectando tanto las comunidades microbianas como de animales. ¿El reconocimiento de una mezcla de olor bacteriano natural se basa en varios componentes, algunos componentes claves o en un componente único? Por consiguiente, identificar estas claves químicas etológicamente relevantes es esencial para comprender la base molecular de las interacciones entre organismos y bacterias. Es probable que el conocimiento sobre cómo *C. elegans* reconoce las mezclas de olores naturales sea útil para una mayor comprensión de cómo los nemátodos parásitos relacionados evolutivamente reconocen a sus huéspedes humanos, animales o vegetales, y para el desarrollo de reactivos que podrían ser útiles para el control de nemátodos parásitos.

## 8. REFERENCIAS

1. ABADA E, SUNG H, DWIVEDI M, PARK B, LEE S, AHNN J. *C. elegans* Behavior of Preference Choice on Bacterial Food. *Mol. Cells* [en línea]. 2009 [citado 2020, en. 14]; 28(3): 209-213. Disponible en: doi: 10.1007/s10059-009-0124-x
2. SAMUEL B, ROWEDDER H, BRAENDLE C, FÉLIX MA, RUVKUN G. *Caenorhabditis elegans* responses to bacteria from its natural habitats. *PNAS* [en línea]. 2016 [citado 2020, en. 14]; 113(27): 3941-3949. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.1607183113>
3. SCHOLZ M, LYNCH D, LEE H, LEVINE E, BIRON E. A scalable method for automatically measuring pharyngeal pumping in *C. elegans*. *J. Neurosci. Methods* [en línea]. 2016 [citado 2020, en. 14]; 274: 172-178. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.016>
4. WORTHY S, HAYNES L, CHAMBERS M, BETHUNE D, KAN E, CHUNG K, OTA R, TAYLOR C, GLATER E. Identification of attractive odorants released by preferred bacterial food found in the natural habitats of *C. elegans*. *PLoS One* [en línea]. 2018 [citado 2020, en. 14]; 13(7): 1-14. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201158>
5. BARGMANN C, HARTWIEG E, HORVITZ R. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* [en línea]. 1993 [citado 2020, en. 14]; 74(3): 515-527. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80053-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80053-H)
6. LEMIEUX G, ASHRAFI K. Neural Regulatory Pathways of Feeding and Fat in *Caenorhabditis elegans*. *Annu. Rev. Genet.* [en línea]. 2015 [citado 2020, en. 14]; 49(1): 413-438. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092244>
7. LI Z, LI Y, YI Y, HUANG W, YANG S, NIU W, ZHANG L, XU Z, QU A, WU Z. Dissecting a central flip-flop circuit that integrates contradictory sensory cues in *C. elegans* feeding regulation. *Nat. Commun.* [en línea]. 2012 [citado 2020, en. 14]; 776(3): 1741-1773. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ncomms1780>
8. FÉLIX MA, DUVEAU. Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. *BMC Biol.* [en línea]. 2012 [citado 2020, en. 14]; 10(59): 2-58. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-59>
9. FÉLIX MA, JOVELIN R, FERRARI C, HAN S, RAN Y, ANDERSEN E, CUTTER A, BRAENDLE C. Species richness, distribution and genetic diversity of *Caenorhabditis* nematodes in a remote tropical rainforest. *BMC Evol. Biol.* [en línea]. 2013 [citado 2020, en. 14]; 13(10): 1471-2148. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-10>

10. FRÉZAL L, FÉLIX MA. C. *elegans* outside the Petri dish. *eLife* [en línea]. 2015 [citado 2020, en. 14]; 4(4): 1-14. Disponible en: <https://doi.org/10.7554/eLife.05849.001>
11. ZHANG Y, Lu H, BARGMANN C. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* [en línea]. 2005 [citado 2020, en. 14]; 438(7065): 179-184. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature04216>
12. HARRIS G, SHEN Y, HA H, DONATO A, WALLIS S, ZHANG X, ZHANG Y. Dissecting the signaling mechanisms underlying recognition and preference of food odors. *J. Neurosci.* [en línea]. 2014 [citado 2020, en. 14]; 34(28): 9389-9403. Disponible en: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0012-14.2014>
13. SHEPHERD G. Smell images and the flavour system in the human brain. *Nature* [en línea]. 2006 [citado 2020, en. 14]; 444(7117): 316-321. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature05405>
14. SHTONDA B, AVERY L. Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Biol.* [en línea]. 2006 [citado 2020, en. 14]; 209(1): 89-102. Disponible en: [doi: 10.1242/jeb.01955](https://doi.org/10.1242/jeb.01955)
15. BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* [en línea]. 1974 [citado 2020, en. 14]; 77(1): 71-94. Disponible en: <http://www.genetics.org/content/77/1/71.short>.
16. RIDDLE D, BLUMENTHAL T, MEYER B, PRIESS J. *C. elegans* II. In "*C. elegans* II" eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press [en línea]. 1997 [citado 2020, en. 14]; 33(1): 739-768. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19997/>
17. HODGKIN J, HORVITZ R, BRENNER S. Nondisjunction mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* [en línea]. 1979 [citado 2020, en. 14]; 91(1): 67-94. Disponible en: <https://www.genetics.org/content/91/1/67.long>
18. HODGKIN J. In "The nematode *C. elegans*". Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press [en línea]. 1988 [citado 2020, en. 14]; 33(1): 243-280. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19997/>
19. SULSTON J, HORVITZ H. Postembryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* [en línea]. 1977 [citado 2020, en. 14]; 56(1): 110–156. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90158-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90158-0)
20. SULSTON J, SCHIERENBERG E, WHITE J, THOMSON J. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* [en línea]. 1983 [citado 2020, en. 14]; 100(1): 64–119. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)

21. WHITE J, SOUTHGATE E, THOMSON J, BRENNER S. The structure of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B [en línea]. 1986 [citado 2020, en. 14]; 314(1165):1-340. Disponible en: <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
22. CHALFIE M, SULSTON J, WHITE J, SOUTHGATE E, THOMSON J, BRENNER S. The neural circuit for touch sensitivity in *C. elegans*. J. Neurosci. [en línea]. 1985 [citado 2020, en. 14]; 5(4): 956-964. Disponible en: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.05-04-00956.1985>
23. BYERLY L, CASSADA R, RUSSELL R. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. Dev. Biol. [en línea]. 1976 [citado 2020, en. 14]; 51(1): 23-33. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6)
24. WOOD W. Determination of pattern and fate in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. The Molecular Biology of Cell Determination and Cell. Dev. Biol. Springer [en línea]. 1988 [citado 2020, en. 14]; 5(1): 57-78. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6817-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6817-9_2)
25. FIRE A, XU S, MONTGOMERY M, KOSTAS S, DRIVER S, MELLO C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature [en línea]. 1998 [citado 2020, en. 14]; 391: 806-811. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/35888>
26. FRASER A, KAMATH R, ZIPPERLEN P, MARTINEZ-CAMPOS M, SOHRMANN M, AHRINGER J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. Nature [en línea]. 2000 [citado 2020, en. 14]; 408(6810): 325-330. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/35042517>
27. KAMATH R, FRASER A, DONG Y, POULIN G, DURBIN R, GOTTA M, KANAPIN A, Le Bot N, MORENO S, SOHRMANN M, WELCHMAN D, ZIPPERLEN P, AHRINGER J. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. Nature [en línea]. 2003 [citado 2020, en. 14]; 421(6920): 231-237. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature01278>
28. SULSTON J, DU Z, THOMAS K, WILSON R, HILLIER L, STADEN R, HALLORAN N, GREEN P, THIERRY-MIEG J, QIU L, DEAR S, COULSON A, CRAXTON M, DURBIN R, BERKS M, METZSTEIN M, HAWKINS T, AINSCOUGH R, WATERSON R. The *C. elegans* genome sequencing project: a beginning. Nature [en línea]. 1992 [citado 2020, en. 14]; 356: 37-41. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/356037a0>

29. The *C. elegans* sequencing consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* [en línea]. 1998 [citado 2020, en. 14]; 282(5396): 2012-2018. Disponible en: [10.1126/science.282.5396.2012](https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012)
30. PETERSEN C, DIRKSEN P, SCHULENBURG H. Why we need more ecology for genetic models such as *C. elegans*. *Trends in Genetics* [en línea]. 2015 [citado 2020, en. 14]; 31(3): 120-127. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.12.001>
31. THOMPSON O, EDGLEY M, STRASBOURGER P, FLIBOTTE S, ERWING B, ADAIR R, AU V, CHAUDHRY I, FERNANDO L, HUTTER H, KIEFFER A, LAU J, LEE N, MILLER A, RAYMANT G, SHEN B, SHENDURE J, TAYLOR J, TURNER E, HILLIER L, MOERMAN D, WATERSON R. The Million Mutation Project: a new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research* [en línea]. 2013 [citado 2020, en. 14]; 23: 1749-1762. Disponible en: doi: [10.1101/gr.157651.113](https://doi.org/10.1101/gr.157651.113)
32. CASSADA R, RUSSELL R. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* [en línea]. 1975 [citado 2020, en. 14]; 46(2): 326-342. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90109-8)
33. HARRIS T, ARNABOLDI V, CAIN S, CHAN J, CHEN W, CHO J, DAVIS P, GAO S, GROVE C, KISHORE R, LEE R, MULLER H, NAKAMURA C, NUIN P, PAULINI M, RACITI D, RODGERS F, RUSSELL M, SCHINDELMAN G, AUKEN K, WANG Q, WILLIAMS G, WRIGHT A, YOOK K, HOWE K, SCHEDL T, STEIN L, STERNBERG P. WormBase: a modern Model Organism Information Resource. *Nucleic Acids Res.* [en línea]. 2019 [citado 2020, en. 14]; Disponible en: <https://wormbase.org/#012-34-5>
34. ALTUN Z, HERNDON L, WOLKOW C, CROCKER C, LINTS R, HALL D. (ed.s). *WormAtlas* [en línea]. 2002-2020 [citado 2020, en. 14]. Disponible en: <http://www.wormatlas.org>
35. PIRRI J, ALKEMA M. The neuroethology of *C. elegans* escape. *Curr Opin Neurobiol.* [en línea]. 2012 [citado 2020, en. 14]; 22(2): 187-193. Disponible en: [10.1016/j.conb.2011.12.007](https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.12.007)
36. CHALFIE M, THOMSON N. Organization of neuronal microtubules in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* [en línea]. 1979 [citado 2020, en. 14]; 82(1): 278-289. Disponible en: <https://doi.org/10.1083/jcb.82.1.278>
37. CHALFIE M, SULSTON J. Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* [en línea]. 1981 [citado 2020, en. 14]; 82(2): 358-370. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90459-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90459-0)

38. CHALFIE M, AU M. Genetics control of differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Science* [en línea]. 1989 [citado 2020, en. 14]; 243(4894): 1027-1033. Disponible en: [10.1126/science.2646709](https://doi.org/10.1126/science.2646709)
39. DRISCOLL M, CHALFIE M. The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* [en línea]. 1991 [citado 2020, en. 14]: 179(1): 14-16. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/349588a0>
40. LAI C, HONG K, KINNELL M, CHALFIE M, DRISCOLL M. Sequence and transmembrane topology of MEC-4, an ion channel subunit required for mechanotransduction in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* [en línea]. 1996 [citado 2020, en. 14]; 133(5): 1071-1081. Disponible en: <https://doi.org/10.1083/jcb.133.5.1071>
41. HUANG M, CHALFIE M. Gene interactions affecting mechanosensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* [en línea]. 1994 [citado 2020, en. 14]; 367: 467-470. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/367467a0>
42. MITANI S, DU H, HALL D, DRISCOLL M, CHALFIE M. Combinatorial control of touch receptor neurons expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* [en línea]. 1993 [citado 2020, en. 14]; 119(3): 773-783. Disponible en: <https://dev.biologists.org/content/119/3/773.long>
43. GOODMAN M, ERNSTROM G, CHELUR D, O' HAGAN R, YAO C, CHALFIE M. MEC-2 regulates *C. elegans* DEG/ENAC channels needed for mechanosensation. *Nature* [en línea]. 2002 [citado 2020, en. 14]; 415: 1039-1042. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/4151039a>
44. CHELUR D, ERNSTROM G, GOODMAN M, YAO A, CHEN L, O' HAGAN R, CHALFIE M. The mechanosensory protein MEC-6 is a subunit of the *C. elegans* touch-cell degenerin channel. *Nature* [en línea]. 2002 [citado 2020, en. 14]; 420(6916): 669-673. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature01205>
45. BIANCHI L, DRISCOLL M. Culture of embryonic *C. elegans* cells for electrophysiological and pharmacological analyses. *WormBook* [en línea]. 2006 [citado 2020, en. 14]. Disponible en: [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_culture/culture.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_culture/culture.html)
46. BIANCHI L, GERSTBREIN B, FRØKJAER-JENSEN C, ROYAL D, MUKHERJEE G, ROYAL M, XUE J, SCHAFER W, DRISCOLL M. The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation. *Nat. Neurosci.* [en línea]. 2004 [citado 2020, en. 14]; 7: 1337-1344. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nn1347>



47. SYNTICHAKI P, XU K, DRISCOLL M, TAVERNARAKIS N. Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* [en línea]. 2002 [citado 2020, en. 14]; 419: 939-944. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature01108>
48. CALIXTO A, JARA J.S., COURT F. Diapause formation and downregulation of insulin-like signaling via DAF-16/FOXO delays axonal degeneration and neuronal loss. *PLoS Genetics* [en línea]. 2012 [citado 2020, en. 14]; 8(12): 1-15. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003141>
49. Alegado R, KING N. Bacterial influences on animal origins. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* [en línea]. 2014 [citado 2020, en. 14]; 6(11): 161-162. Disponible en: [doi: 10.1101/cshperspect.a016162](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016162)
50. AYALA F, RZHETSKY A, AYALA FJ. Origin of the metazoan phyla: molecular clocks confirm paleontological estimates. *PNAS* [en línea]. 1998 [citado 2020, en. 14]; 95(2): 606-611. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.606>
51. LEGUE M, CALIXTO A. RNA language in *Caenorhabditis elegans* and bacteria interspecies communication and memory. *Current Opin. Syst. Bio.* [en línea]. 2019 [citado 2020, en. 14]; 13: 16-22. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2018.08.005>
52. SIMON J, MARCHESI J, MOUGEL C, SELOSSE M. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *BMC Microbiome* [en línea]. 2019 [citado 2020, en. 14]; 7(5): 1-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>
53. BERG M, STENUIT B, HO J, WANG A, PARKE C, KNIGHT M, ALVAREZ-COHEN L, SHAPIRA M. Assembly of the *Caenorhabditis elegans* gut microbiota from diverse soil microbial environments. *ISME J.* [en línea]. 2016 [citado 2020, en. 14]; 10: 1998-2009. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.253>
54. MACNEIL L, WATSON E, ARDA H, ZHU L, WALHOUT A. Diet induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans*. *Cell* [en línea]. 2013 [citado 2020, en. 14]; 153(1): 240-252. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.049>
55. WATSON E, MACNEIL L, RITTER A, YILMAZ L, ROSEBROCK A, CAUDY A, WALHOUT A. Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits. *Cell* [en línea]. 2014 [citado 2020, en. 14]; 156(6): 1336-1337. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.036>
56. DIERKING K, YANG W, SCHULENBURG H. Antimicrobial effectors in the nematode *Caenorhabditis elegans*: an outgroup to the Arthropoda. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol.*

- Sci. [en línea]. 2016 [citado 2020, en. 14]; 371(1695): 1471-1485. Disponible en: <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0299>.
57. FÉLIZ MA, BRAENDLE C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. Cell Press [en línea]. 2010 [citado 2020, en. 14]; 20(22): 965-969. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.050>
58. ABT M, ARTIS D. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. Curr. Opi. Gastroenterol. [en línea]. 2009 [citado 2020, en. 14]; 25(6): 496-502. Disponible en: doi: 10.1097/MOG.0b013e328331b6b4
59. SHREINER A, KAO J, YOUNG V. The gut microbiome in health and in disease. Curr. Opi. Gastroenterol. [en línea]. 2015 [citado 2020, en. 14]; 31(1): 69-75. Disponible en: doi:10.1097/MOG.0000000000000139
60. ZHANG F, BERG M, DIERKING K, FÉLIZ MA, SHAPIRA M, SAMUEL B, SCHULENBURG H. *Caenorhabditis elegans* as a Model for Microbiome Research. Front. Microbiol. [en línea]. 2017 [citado 2020, en. 14]; 8: 485. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00485>
61. STIERNAGLE T. Maintenance of *C. elegans*. WormBook [en línea]. 2006 [citado 2020, en. 14]. Disponible en: doi: 10.1895/wormbook.1.101.1
62. BENTLEY R, MEGANATHAN R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. Microbiological Reviews [en línea]. 1982 [citado 2020, en. 14]; 46(3): 241-280. Disponible en: <https://mbr.asm.org/content/46/3/241.long>
63. HUDAULT S, GUIGNOT J, SERVIN A. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. BMJ Gut [en línea]. 2001 [citado 2020, en. 14]; 49(1): 47-55. Disponible en: doi: 10.1136/gut.49.1.47
64. REID G, HOWARD J, GAN B. Can bacterial interference prevent infection? Trends in Microbiology [en línea]. 2001 [citado 2020, en.14]; 9(9): 424-428. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02132-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02132-1)
65. KASHIMA N, FUJIKURA Y, KOMURA T, FUJIWARA S, SAKAMOTO M, TERAOKA K, NISHIKAWA Y. Development of a method for oral administration of hydrophobic substances to *Caenorhabditis elegans*: pro-longevity effects of oral supplementation with lipid soluble antioxidants, Biogerontology [en línea]. 2012 [citado 2020, en. 14]; 13: 337-344. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10522-012-9378-3>

66. GROMPONE G, MARTORELL P, LLOPIS S, GONZÁLEZ N, GENOVÉS S, MULET AN, FERNÁNDEZ-CALERO T, TISCORNIA I, BOLLATI-FOGOLÍN M, CHAMBAUD I, FOLIGNÉ B, MONTSERRAT A, RAMÓN D. The anti-inflammatory strain *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 protects against oxidative stress and increases the shelf life in *Caenorhabditis elegans*. PLoS One [en línea]. 2012 [citado 2020, en. 14]; 7(12): 171-184. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052493>
67. ALBERTSON D, THOMSON J. The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. [en línea]. 1976 [citado 2020, en. 14]; 275(938): 299-325. Disponible en: <https://doi.org/10.1098/rstb.1976.0085>
68. AVERY L. The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. Genetics [en línea]. 1993 [citado 2020, en. 14]; 133(4): 897-917. Disponible en: <https://www.genetics.org/content/133/4/897.long>
69. AVERY L, THOMAS J. Feeding and defecation. In *C. elegans* II, RIDDLE D, BLUMENTHAL T, MEYER B, PRIESS J, eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press [en línea]. 1996 [citado 2020, en. 14]; 24: 679-716. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20138/>
70. AVERY L, HORVITZ B. Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*. CellPress Neuron [en línea]. 1989 [citado 2020, en. 14]; 3(4): 473-485. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90206-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90206-7)
71. AVERY L, SHTONDA B. Food transport in the *C. elegans* pharynx. J. Exp. Biol. [en línea]. 2003 [citado 2020, en. 14]; 206(14): 2441-2457. Disponible en: doi: 10.1242/jeb.00433
72. PORTAL-CELHAY C, BLASER M. Competition and resilience between founder and introduced bacteria in the *Caenorhabditis elegans* gut. Infect. Immun. [en línea]. 2012 [citado 2020, en. 14]; 80(3): 1288-1299. Disponible en: doi: 10.1128/IAI.05522-11
73. HERNDON L, SCHMEISSNER P, DUDARONEK J, BROWN P, LISTNER K, SAKANO Y, PAUPARD M, HALL D, DRISCOLL M. Stochastic and genetic factors influence the specific decrease of tissue in the aging of *C. elegans*. Nature [en línea]. 2002 [citado 2020, en. 14]; 419: 808-814. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature01135>
74. LABROUSSE A, Chauvet CHAUVET S, COUILLAUT C, KURZ C, EWBANK J. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. Curr. Biol. [en línea]. 2000 [citado 2020, en. 14]; 10(23): 1543-1545. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00833-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00833-2)

75. HOBSON R, HAPIAK V, XIAO H, BUEHRER K, KOMUNIECKI P, KOMUNIECKI R. SER-7, a *Caenorhabditis elegans* 5-HT7-like receptor, is essential for the 5-HT stimulation of pharyngeal pumping and egg laying. *Genetics* [en línea]. 2006 [citado 2020, en. 14]; 172 (1): 159-169. Disponible en: <https://doi.org/10.1534/genetics.105.044495>
76. SONG B, AVERY L. The pharynx of the nematode *C. elegans*: a model system for the study of motor control. *J. Worm* [en línea]. 2013 [citado 2020, en. 14]; 2(1): 1920-1931. Disponible en: <https://doi.org/10.4161/worm.21833>
77. KIYAMA Y, MIYAHARA K, OHSHIMA Y. Active uptake of artificial particles in the *Caenorhabditis elegans* nematode, *J. Exp. Biol.* [en línea]. 2012 [citado 2020, en. 14]; 215(7): 1178-1183. Disponible en: <https://jeb.biologists.org/content/215/7/1178.long>
78. ZHANG R, HOU A. Host-Microbe Interactions in *Caenorhabditis elegans*. *ISRN Microbiol.* [en línea]. 2013 [citado 2020, en. 14]; 2013: 1-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2013/356451>
79. WORTHY S, ROJAS G, TAYLOR C, GLATER E. Identification of Odor Blend Used by *Caenorhabditis elegans* for Pathogen Recognition. *Chemical Senses* [en línea]. 2018 [citado 2020, en. 14]; 43(3): 169-180. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/chemse/bjy001>
80. BEALE E, LI G, TAN M-W, RUMBAUGH K. *Caenorhabditis elegans* Senses Bacterial Autoinducers. *Appl. Environ. Microbiol.* [en línea]. 2006 [citado 2020, en. 14]; 72(7): 5135-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AEM.00611-06>
81. CHOI J, YOON K, SUBBAMMAL S, YOON S-S, LEE J. A natural odor attraction between lactic acid bacteria and the nematode *Caenorhabditis elegans*. *ISME J.* [en línea]. 2016 [citado 2020, en. 14]; 10(3): 558-67. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.134>
82. BRODERICK N, LEMAITRE B. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. *J. Gut Microbes* [en línea]. 2012 [citado 2020, en. 14]; 3(4): 307-321. Disponible en: <https://doi.org/10.4161/gmic.19896>
83. BENSON A, KELLY S, LEGGE R, MA F, LOW S, KIM J, ZHANG M, OH P, NEHRENBURG D, HUA K, KACHMAN S, MORIYAMA E, WALTER J, PETERSON D, POMP D. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *PNAS USA* [en línea]. 2010 [citado 2020, en. 14]; 107(44): 18933-18938. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107>

84. ROESELERS G, MITTGE E, STEPHENS W, PARICHY D, CAVANAUGH C, GUILLEMIN K, RAWLS J. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J.* [en línea]. 2011 [citado 2020, en. 14] 5(10): 1595–1608. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38>
85. Trombert A. *Guía de Microbiología General*. Santiago: 2017. p. 53.
86. HEYLEN K, VANPARYS B, PEIRSEGAELE F, LEBBE L, DE VOS P. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* [en línea]. 2007 [citado 2020, en. 14]; 57(9): 2056-2061. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65044-0>
87. CHANG Y-T, LIN C-Y, CHEN Y-H, HSUEH P-R. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front. Microbiol.* [en línea]. 2015 [citado 2020, en. 14]; 6: 893-913. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00893>
88. DIMARZIO M, SHARIAT N, KARIYAWASAM S, BARRANGOU R, DUDLEY E. Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Associates with CRISPR Sequence Type. *Antimicrob. Agents Chemother.* [en línea]. 2013 [citado 2020, en. 14]; 57(9): 4282-4289. Disponible en: <https://aac.asm.org/content/57/9/4282>
89. HORN S, PIETERS R, BEZUIDENHOUT C. Pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria from drinking-water boreholes. *J. Water Health* [en línea]. 2016 [citado 2020, en. 14]; 14(6): 890-900. Disponible en: <https://doi.org/10.2166/wh.2016.009>
90. GONZÁLEZ R, MAYORGA L, MONROY A, REYES L, RIVERA Y, AZAOLA A. Antibiotic resistance and tolerance to simulated gastrointestinal conditions of eight hemolytic *Bacillus pumilus* isolated from pulque, a traditional Mexican beverage. *Food Sci. Biotechnol.* [en línea]. 2017 [citado 2020, en. 14]; 26(2): 447-452. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0061-y>
91. BHATE D. Pumilin, a New Antibiotic from *Bacillus pumilus*. *Nature* [en línea]. 1955 [citado 2020, en. 14]; 175: 816-817. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/175816a0>
92. CLARK L, HODGKIN J. Commensals, probiotics and pathogens in the *Caenorhabditis elegans* model. *Cellular Microbiology* [en línea]. 2014 [citado 2020, en. 14]; 16(1): 27-38. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/cmi.12234>
93. PALOMINOS M.F., VERDUGO L, GABALDON C, POLLAK B, ORTÍZ-SEVERÍN J, VARAS M, CHÁVEZ F, CALIXTO C. Transgenerational Diapause as an Avoidance Strategy against Bacterial Pathogens in *Caenorhabditis elegans*. *American Society of Microbiology. mBio* [en

- línea]. 2017 [citado 2020, en. 22]; 8(5): 20-37. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/mBio.01234-17>
94. *Salmonella enterica* (ID 152) - Genome - NCBI [en línea]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2001 [citado 2020, mar. 16]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=salmonella+typhimurium>
95. PATIL P, MIDHA S, KUMAR S, PATIL P. Genome Sequence of Type Strains of Genus *Stenotrophomonas*. Front. Microbiol [en línea]. 2016 [citado 2020, mar. 16]; 7(309): 25-32. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00309>
96. *Bacillus pumilus* (ID 440) - Genome - NCBI [en línea]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2016 [citado 2020, mar. 16]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Bacillus+pumilus>
97. URRUTIA A, GARCIA V, FUENTES A, CANEO M, LEGUE M, URQUIZA S, UGALDE J, BURDISSO P, CALIXTO C. Bacterially produced GABA protects neurons from degeneration. Cold Spring Harbor Laboratory. bioRxiv [en línea]. 2019 [citado 2020, mar. 15]; 8(13): 22-64. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/711887>

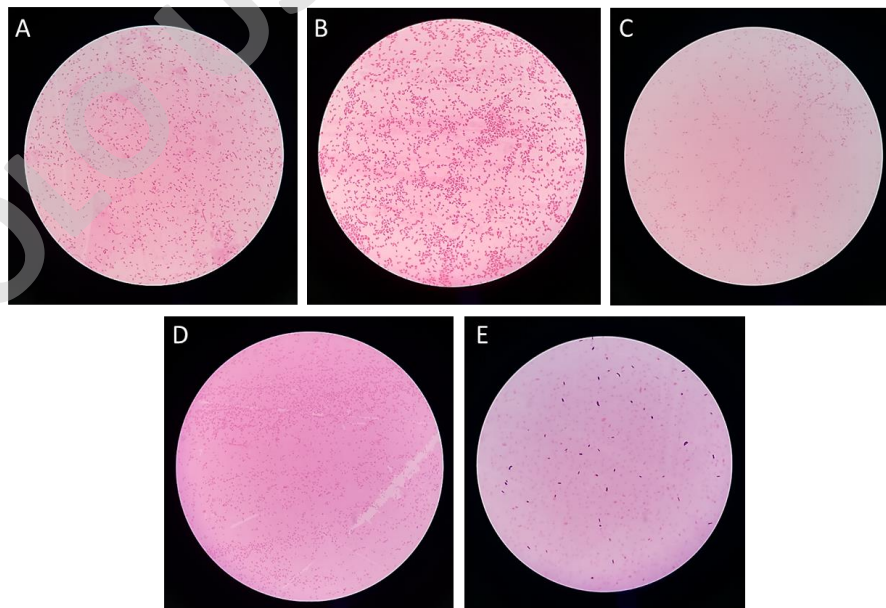
## 9. ANEXOS/MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1: Identificación de los aislados bacterianos por secuenciación del ARN ribosomal 16S.

Muestra	Identidad
Aislado 1 – 16S	100% de identidad (260/260) con 16S: 1. <i>Brucellaceae bacterium</i> bfzh12 2. <i>Pseudochrobactrum</i> sp. AR-333 3. <i>Pseudochrobactrum kiredjianaie</i>
Aislado 2 – 16S	100% de identidad (263/263) con 16S: 1. <i>Stenotrophomonas humi</i> 2. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
Aislado 3 – 16S	100% de identidad (265/265) con 16S: 1. <i>Bacillus pumilus</i> 100% de identidad (264/264) con: 1. <i>Bacillus altitudinis</i>

Tabla S2: Indicadores de reacción positiva o negativa de cada medio de la batería bioquímica.

Medio	Reacción Positiva	Reacción Negativa
Agar Corriente	Pigmentación (C.P.)	Sin Pigmentación (S.P.)
Agar Urea	Agar Fucsia (+)	No Fucsia (-)
Agar Citrato	Agar Azul (+)	Agar Verde (-)
Agar TSI	1) Superficie Roja (K) 2) Fondo Amarillo (A) 3) Superficie/Fondo Amarillo (A/A)	Sin cambio de color (K/K)
Agar LIA	1) Morado (K/K) 2) Superficie Morada /Fondo Amarillo (K/A) 3) Superficie Roja / Fondo Amarillo (R/A)	Sin cambio de color (A/A)
Medio MIO	Medio Morado	Medio Amarillo



**Figura S7: Tinción de Gram de las bacterias utilizadas en el estudio.** **A.** Fotografía de tinción de Gram de *E. coli* OP50 (Gram negativa). **B.** Fotografía de tinción de Gram de *E. coli* HT115 (Gram negativa). **C.** Fotografía de tinción de Gram de ISO1 (Gram negativa). **D.** Fotografía de tinción de Gram de ISO2 (Gram negativa). **E.** Fotografía de tinción de Gram de ISO3 (Gram positiva). Las fotografías fueron tomadas en un microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión.

## Material suplementario

### Mantenimiento de gusanos

El gusano que se utilizó para estos experimentos es el mutante MEC-4d (*mec-4d;uls31 (e1611)X*, (*Pmec-17mec-17::gfp*)) y se mantuvieron en una incubadora a 20°C (Incubador Thermo Scientific Precision). La dieta bacteriana estándar del gusano fue *E. coli* OP50.

### Preparación Bateria Bioquímica

Para la preparación de los medios de cultivo de la batería bioquímica se utilizó medios comerciales de BD, Merck y OXOID. Para el Agar Corriente se mezcló 7,75 gr de Agar LB (MILLER de Merck) con 250 mL de agua destilada. Para el Agar Urea se mezcló 4,25 gr de Agar Urea (BD) con 250 mL de agua destilada. Para el Agar Citrato se mezcló 6,05 gr de Agar Citrato (BD) con 250 mL de agua destilada. Para el Agar TSI se mezcló 15,625 gr de TSI (BD), 2 gr de Agar-Agar (BD) y 250 mL de agua destilada. Para el Agar LIA se mezcló 8,75 gr de Agar LIA (OXOID) y 250 mL de agua destilada. Finalmente, el medio MIO se mezcló 7,75 gr de medio (Merck) y 250 mL de agua destilada.

### Preparación medio NGM.

Para la preparación del medio NGM, se mezcló 3 g de NaCl, 17 g de Agar Agar, 2.5 g de peptona en 975 mL de agua destilada. La mezcla es tratada en autoclave por 20 minutos, la cual una vez que está a temperatura óptima se le adicionan 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 1M, 1 mL de colesterol (5 mg/mL etanol), 1 mL MgSO<sub>4</sub> 1M, 25 mL buffer KPO<sub>4</sub> 1M pH 6.0 (108.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 35.6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1 L de agua destilada), y 1 mL de estreptomina (25 mg/mL). Posteriormente el líquido se transfiere a placas Petri (60x15 mm o 100x15 mm) y se espera a que el NGM se endurezca y seque completamente para ser inoculadas.