



MUSEO DE HISTORIA
NATURAL DE VALPARAÍSO

ANALES

del Museo de Historia Natural
de Valparaíso (En línea)

Diseño Portada: Andrea Vivar M

ISSN 0717-537X / An. Mus. Hist. Nat. Valpso. (En línea) Vol. 32 (2019) / Valparaíso, Chile.

NEMÁTODOS EN LAS METRÓPOLIS: ANIMALES FANTÁSTICOS DE NUESTROS SUELOS Y CÓMO ENCONTRARLOS.

NEMATODES INSIDE THE METROPOLIS: FANTASTIC ANIMALS OF OUR SOILS AND HOW TO FIND THEM.

Scarlett E. Delgado*, Sebastián Urquiza**,
Arlés Urrutia***, Carolina Gabaldón****
y Andrea Calixto*****.

RESUMEN: La vida en la tierra ha mostrado variadas formas más hermosas y maravillosas, muchas de ellas invisibles para nuestros ojos pero que de todas maneras han influido en nuestra vida y supervivencia. Una de estas múltiples aristas son los nemátodos, organismos eucariontes multicelulares cuya longitud es de 1 o 2 milímetros, que se alimentan principalmente de las bacterias del suelo y que mantienen controlada su sobrepoblación en ambientes en descomposición, como la hojarasca o el compost. La presencia de ellos es tan ubicua y generalizada que en un sencillo estudio como el que se muestra a continuación pudimos encontrarlos junto con la microbiota que los acompañaba.

Se pudo concluir la presencia de estos gusanos en diferentes zonas de la región de Valparaíso y que, en sus ambientes originales, se alimentaron de bacterias Gram negativas. Estos resultados nos indican que un muestreo a mayor escala o temporalidad es posible en la región, con el fin de caracterizar no solo los suelos, sino también el efecto que tendrían los cambios en la humedad o temperatura de los suelos sobre estos animales y su entorno.

PALABRAS CLAVES: Nemátodos, microorganismos, bacterias, suelo, medioambiente.

*Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso. CINV, Millenium Institute, Universidad de Valparaíso. Pasaje Harrington 287, Playa Ancha, Valparaíso. Laboratorio de Microbioma y Comportamiento. Ingeniera en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile, Chile. scarlett.delgado@postgrado.uv.cl

**Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso. CINV, Millenium Institute, Universidad de Valparaíso. Pasaje Harrington 287, Playa Ancha, Valparaíso. Laboratorio de Microbioma y Comportamiento. Licenciado en Biotecnología, Universidad Mayor, Chile.

***Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso. CINV, Millenium Institute, Universidad de Valparaíso. Pasaje Harrington 287, Playa Ancha, Valparaíso. Laboratorio de Microbioma y Comportamiento. Licenciada en Biología, Universidad de Los Andes, Venezuela.

****Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso. CINV, Millenium Institute, Universidad de Valparaíso. Pasaje Harrington 287, Playa Ancha, Valparaíso. Laboratorio de Microbioma y Comportamiento. Licenciada en Biología, Universidad de Los Andes, Venezuela.

*****Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso. CINV, Millenium Institute, Universidad de Valparaíso. Pasaje Harrington 287, Playa Ancha, Valparaíso. Laboratorio de Microbioma y Comportamiento. Microbióloga, Universidad de la Habana, Cuba. Doctora en Filosofía (Ph.D), Columbia University, Estados Unidos.

ABSTRACT: Life on earth has shown diverse forms more beautiful and more wonderful, many of them invisible to our eyes, but they have indeed influenced our life and survival. One of these multiple cases are the nematodes, multicellular eukaryotic organisms whose length is 1 or 2 mm long, which feeds mainly on soil bacteria and that control bacterial overpopulation in decomposing environments, such as leaf litter or compost. Their presence is such as ubiquitous and widespread that in a simple study as the one shown below, we could find them along with the microbiota that accompanied them. We were able to conclude the presence of these worms in different areas of the Valparaíso region and that, in their original environments, they fed on Gram negative bacteria. These results indicate that sampling on a larger reach of zones and time is possible in the region in order to characterize not only the soils, but also the effect that changes in humidity or soil temperature would have on these animals and their environment.

KEYWORDS: Nematodes, bacteria, microorganism, soil, environment.

INTRODUCCIÓN

Las evidencias que tenemos hasta la fecha es que los primeros mamíferos que se pueden considerar humanos datan de hace 315.000 años (Callaway, 2017), época en la que ya existían un sin número de especies habitando el planeta, adaptados a los diferentes ambientes que hay en él. Estas especies han conformado la amplia diversidad de animales y microorganismos, en sus formas más hermosas y maravillosas, como dijo Charles Darwin (1859). Los microorganismos requieren de instrumentos especializados para su observación por su ínfimo tamaño. Solo hemos podido profundizar en conocerlos después de la invención del microscopio por Anton van Leeuwenhoek y los descubrimientos de Robert Hook (Gest, 2004). También existe un gran número de animales microscópicos, que viven en la tierra o en él y son en su mayoría nemátodos.

El Reino Animal es inmensamente diverso en tamaños y formas. Algunas características comunes a todos es que están formados por varias células (multicelulares) y tienen un núcleo celular (eucariotas). Además, se alimentan de otros seres vivos (heterótrofos) y se pueden desplazar autónomamente (Margulis, 1974). La primera división del Reino Animal fue realizada por Aristóteles en el año 335 antes de Cristo (Pellegrin, 1986). Aristóteles propuso una clasificación que dividía a los animales en aquellos con sangre (vertebrados), y sin sangre (invertebrados). Los vertebrados, que nos incluye a nosotros, tienen columna vertebral y huesos que sostienen el cuerpo. Los invertebrados usan variadas estrategias para sostenerse como el exoesqueleto de las hormigas y arañas. Los invertebrados son los animales más abundantes y diversos, por lo que sus tamaños y formas pueden variar inmensamente.

Dentro de la enormidad de organismos que surgieron millones de años antes que los primeros vertebrados, encontramos organismos microscópicos que se alimentan de bacterias y que coexisten con nosotros sin que nos demos cuenta. Estos animales son gusanos del filo nematoda. *Nematoda* proviene del griego νῆμα (nema) que significa "hilo" y οἶδος (oídos) "con aspecto de" y que puede interpretarse como "aquellos con forma de hilo". Nematoda es un grupo de gusanos blandos principalmente de vida libre, y con algunas especies parasíticas. Los nemátodos habitan todos los ambientes estudiados hasta ahora y cumplen un rol ecológico esencial en la renovación de los suelos. Se estima que 4 de cada 5 animales existentes en la tierra pertenece al grupo de los nemátodos (Bongers y Bongers, 1998). La asociación principal de este filo a la vida parasítica se debe a que exhibe el mayor número de familias de parásitos. Sin embargo, la mayoría de los nemátodos son de vida libre y beneficiosos para actividades humanas asociadas a los suelos y fuentes de agua (Cobb, 1914). No en vano, un molinero del siglo XVI pensó en Dios y los ángeles como gusanos que le dieron forma al mundo (Ginzburg, 1976).

Los nemátodos pueden ser abundantes en nuestros hogares. Los podemos encontrar en las mascotas sin desparasitar, nuestras jardineras, terrazas, huertas y principalmente en el compost, donde renuevan los suelos (Bongers y Bongers, 1998; Yeates y Bongers, 1999). Los nemátodos pueblan todos los espacios posibles demostrando su extensa adaptabilidad. Se han encontrado nemátodos en la Antártica y en el permahielo de la Siberia, donde han sobrevivido por más de 42.000 años, e incluso pueden sobrevivir a compuestos tan tóxicos para nosotros como el arsénico (Freckman y Virginia, 1997; Shatilovich et al., 2018; Shih et al., 2019). Los orígenes de este grupo se remontan al supereón Precámbrico, demostrado gracias al registro fósil. Históricamente se ha asociado el Cámbrico a la aparición de la mayor diversidad de formas de vida en la Tierra. Sin embargo, la diversificación del grupo Nematoda fue anterior, hecho que ilumina tanto su historia como grupo y la de todos los animales bilaterales, incluidos nosotros (Chen et al., 2019). Las razones anteriores incitan a repensar nuestra percepción sobre estos animales. Si nuestro mundo dejara de existir como lo conocemos, es muy probable que los nemátodos sobrevivan y le den forma y fondo a la siguiente fase de la tierra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de gusanos desde el ambiente y su mantención

Muestras de tierra fueron tomadas a fines del mes de marzo del 2019 desde diferentes puntos de la Región de Valparaíso (Recreo y Playa Ancha). En el laboratorio, porciones de tierra fueron puestas en placas de NGM (o *Nematode Growth Medium* o Medio de Crecimiento para Nemátodo) con un césped de la bacteria *Escherichia coli* OP50 (ver Figura 1), con el fin que los gusanos presentes en las muestras se alimentaran de la bacteria sobre el agar, de acuerdo con lo descrito por Barrière y Félix (2006). Los gusanos después fueron mantenidos a 20°C en condiciones estándar (Stiernagle, 2006).

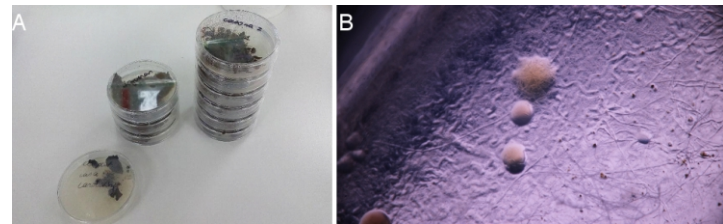


Figura 1. Imagen representativa del método usado para recolectar gusanos desde el medio ambiente. A) Sobre las placas de agar con un césped de bacterias se deposita una muestra de tierra (NGM, ver Materiales y métodos), al cabo de unos días los gusanos dejan la tierra para alimentarse de la bacteria provista y son así obtenidos. B) Rastros que dejan los gusanos sobre el césped de bacteria junto a las colonias de bacterias provenientes de sus intestinos creciendo sobre el agar.

Cultivo de bacterias aisladas con los nemátodos

Desde cada placa fueron aisladas bacterias que acompañaban a los gusanos de vida silvestre y que aparecen como colonias aisladas distinguibles del césped de *E. coli* OP50. Estas colonias fueron mantenidas en medio Luria-Bertani (LB) sólido y líquido sin antibióticos. La prueba de resistencia a antibióticos consistió en la preparación de placas de LB sólido y el posterior rallado de una colonia de bacterias sobre el medio, si la bacteria crecía indica que es resistente al antibiótico, en caso contrario, no es resistente.

Identificación microscópica de bacterias mediante tinción de Gram

Colonias aisladas de cada bacteria fueron teñidas con la tinción de Gram (Bartholomew y Mittwer, 1952). La colonia se toma con el asa previamente esterilizada en el mechero y se disuelve en una gota de agua estéril sobre un portaobjeto. Luego de secar la muestra con ayuda del mechero, se prosigue a teñir la muestra con cristal violeta durante 3 minutos. Se deja escurrir el cristal violeta para añadir una solución de Lugol por 2 minutos. Después se intercalan lavados con alcohol/acetona, en proporción 70/30, y agua de la llave. Por último, se añade safranina por 1 minuto para finalmente llevar las muestras al microscopio.

Pruebas conductuales de preferencia gustativa y olfatoria

En placas inoculadas con las diferentes bacterias aisladas con nemátodos se pusieron 30 individuos *Caenorhabditis elegans*. Este experimento tiene como objetivo probar la predilección del gusano por las nuevas bacterias. A los tiempos indicados se cuentan los individuos que están en el césped bacteriano, los que están en el borde del césped y los que están afuera. Los animales fueron observados inmediatamente después de puestos, a la media hora, después de 1, 2, 4 y 24 horas. El índice de evasión fue calculado en base a la siguiente fórmula:

$$I.E. = \frac{(\#gusanos fuera del césped - \#gusanos dentro del césped)}{\#inicial de gusanos}$$

Fotografías

Las fotomicrografías exhibidas fueron tomadas con una cámara Canon EOS Rebel T3i acoplada a un microscopio Nikon Eclipse Ni-U y a una lupa estereoscópica Nikon AZ100, en modo manual. Las imágenes de fluorescencia observadas fueron tomadas con un tiempo de exposición de 1/8 y una configuración de ISO 200. Las imágenes de microscopía DCI fueron tomadas con un tiempo de exposición de 1/10 e ISO 200. Otras fotografías fueron tomadas con un celular ASUS X018D. El procesamiento de estas imágenes fue realizado utilizando el programa FIJI (ImageJ) (Schneider et al., 2012) y el complemento FigureJ (Mutterer y Zinck, 2013).

RESULTADOS

El primer paso del estudio consistió en el hallazgo de nemátodos de las tierras de la Región de Valparaíso, utilizando la metodología encontrada en la literatura (ver Figura 1A). Se identificaron al menos 4 especies de

nemátodos diferentes. Una de ellas posee dimorfismo sexual no hermafrodita y comparte características con el género *Cruzema* (Rebodero y Camino, 1998) (Ver Figura 2A y 2B). Otras especies encontradas exhiben principalmente la morfología de un hermafrodita, pudiendo autofecundarse con la presencia ocasional y condicional de machos (Ver Figura 2C a la 2F). La morfología de estas especies es similar a las observadas en la especie modelo de este clado, *Caenorhabditis elegans*. Esta última característica es la que exhiben la mayoría de los nemátodos descritos hasta la fecha y la prueba principal consiste en observar si un individuo solo es capaz de repoblar una placa (Ver anexo, complemento Figura 2).

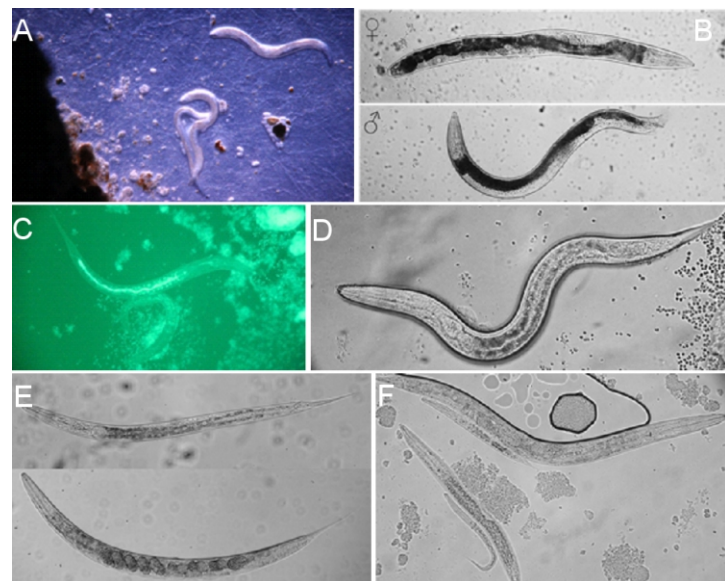


Figura 2. Fotomicrografías de los diferentes nemátodos encontrados en las tierras de Playa Ancha, Valparaíso. A) Gusanos aislados desde la tierra presente en el Campus Playa Ancha de la Universidad de Valparaíso, estos individuos exhiben morfología dioica, es decir, pueden observarse hembras y machos y ambos son absolutamente necesarios para la reproducción. B) Microscopía diferencial de contraste de interferencia (DCI) de los animales observados en A). C) Microscopía de Fluorescencia de animales y hongos de los que alimentaron, ambos fueron encontrados en el Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso. D) Microscopía DCI de los animales observados en C). E) y F) Microscopía DCI de otros animales encontrados en el CINV.

Durante el cultivo de estos gusanos, se procedió a aislar bacterias nuevas encontradas sobre el césped de *E. coli*. El reconocimiento de las nuevas colonias fue visual (Ver Figura 1B). Posterior a su aislamiento por cultivos consecutivos de colonias únicas estas fueron cultivadas en medio LB líquido para su congelación, usando glicerol como protector. Para comenzar con la caracterización de

las nuevas bacterias, se realizó una prueba de resistencia a antibióticos (Tabla 1). Sólo una de ellas, la aislada de agua de mar de la Playa Las Salinas no exhibió resistencia a ninguno de los antibióticos probados. Algo común para todas fue la temperatura óptima de cultivo de 20°C, y un periodo de incubación de 2 días.

Tabla 1. Pruebas de resistencia a antibiótico mediante la prueba de sobrevivencia y crecimiento de un césped luego de sembrar la bacteria en una placa con antibiótico.

		Ampicilina			Ampicilina + tetraciclina			Estreptomomicina			Gentamicina			Kanamicina			Sin antibiótico		
Compost 1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Compost 2	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Compost 3	3	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Océano 1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Ciencias UV	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casona 1.1	7	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Casona 1.2	8	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Casona 1.2.2	9	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Casona 1.3	10	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Casona 2	11	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+

De las bacterias aisladas es interesante observar que la bacteria aislada desde la Playa las Salinas no es resistente a los antibióticos probados; resultado muy diferente a la bacteria aislada desde la Facultad de Ciencias de la Universidad que crece sobre todos los antibióticos probados.

Las bacterias pueden clasificarse técnicamente en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo al resultado de la tinción de Gram (Wiegel, 1981). Las bacterias Gram positivas tienen una doble pared celular de glicoproteínas, o proteínas asociadas a cadenas de azúcares. Las Gram negativas en cambio solo exhiben una: a esto se debe que la tinción las afecte diferencialmente. Todas las bacterias encontradas en este estudio son Gram negativas (Ver Figura 3A a la 3J) al igual que la ya muy conocida *Escherichia coli*. La coloración de una bacteria Gram positivas como *Lactobacillus sp.* es morada intensa a diferencia del tono rosa de las Gram negativas (puede verse en la Figura 3K).

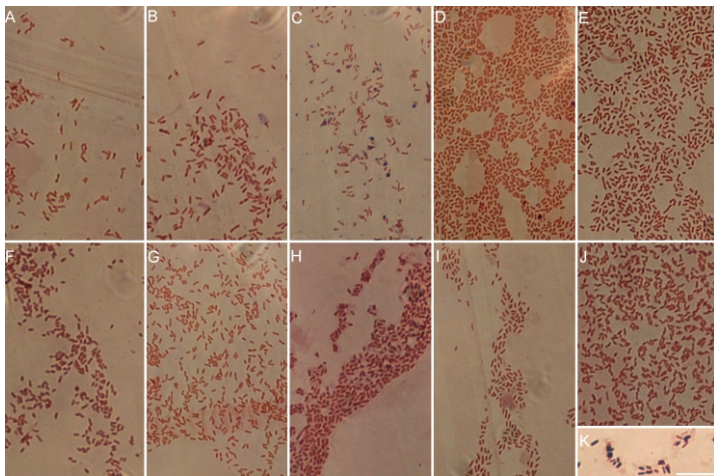


Figura 3. Fotomicrografía de la Tinción de Gram obtenida con las diferentes bacterias encontradas en la Región de Valparaíso. A) Bacteria 1, B) Bacteria 2 y C) Bacteria 3 corresponden a las encontradas en la zona de Recreo. D) Bacteria 4, encontrada en la muestra de la Playa de Las Salinas. E) Bacteria 6, encontrada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. F), G), H), I) y J), corresponden a bacterias encontradas en el Centro Interdisciplinario de Valparaíso. K) Corresponde a un *Lactobacillus sp.*, una bacteria Gram positiva cuya tinción se realizó en paralelo con las otras mostradas a modo de control. Barra de escala corresponde a 10 µm.

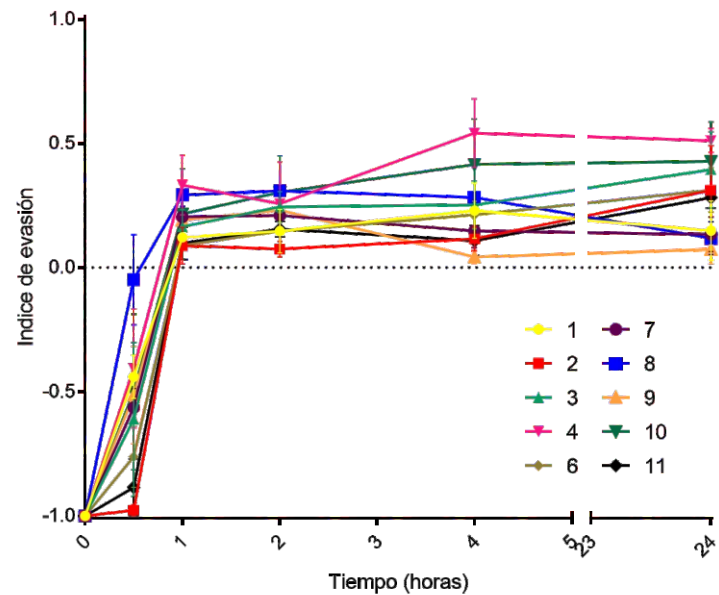


Figura 4. Índice de evasión medido para las 10 bacterias encontradas en este estudio. El gráfico muestra la permanencia de individuos de *Caenorhabditis elegans* en el césped de la bacteria hallada, entre más alto y más cercano a 1, mayor es la evasión y por lo tanto menor es la aceptación de esa bacteria por parte del gusano. Este fenómeno puede ser influenciado por diversos factores como la virulencia de la cepa hacia el nemátodo, que puede variar entre especies, la calidad nutritiva de la bacteria para el gusano, la textura del césped, entre otros factores. Es interesante observar que la bacteria menos aceptada es la 4, que corresponde a la aislada desde el mar.

Caenorhabditis elegans fue alimentado con los nuevos aislados bacterianos con el fin de probar si sirven como alimento para el nemátodo modelo por excelencia. Los gusanos no mostraron indicios de enfermedad o parálisis al alimentarse de estas bacterias. Las diferencias conductuales respecto a la dieta estándar descansaron en la preferencia por la bacteria 9 y 2, que exhiben el menor índice de evitación (Ver Figura 4). Estos resultados sugieren que todas pueden ser usadas como una posible dieta para nemátodos de vida libre.

DISCUSIÓN

Las especies de nemátodos encontradas en este muestreo no han sido identificadas aún. Para su asignación inequívoca a una especie se requiere la identificación molecular, lo que implica conocer su secuencia de ADN. En este momento estamos trabajando en la identificación molecular de estos gusanos. Para eso, se requiere la extracción del ADN y secuenciación de su genoma completo. Alternativamente se pueden secuenciar pedazos pequeños del genoma con baja tasa de mutaciones. Dentro de las secuencias más usadas están las subunidades ribosomales 16S para procariontes y 18S para eucariontes. Estas secuencias comparten una alta identidad entre animales del mismo género y la información de estas puede encontrarse en múltiples bases de datos (Chenuil, 2006).

La presencia de dos sexos no condicionales en nemátodos es poco frecuente entre las especies descritas. La generalidad es la existencia de individuos hermafroditas con la aparición condicional y bajo estrés, de machos. Estos pueden reproducirse sexualmente con individuos hermafroditas y así aumentar el número de la progenie y además introducir variabilidad genética. En la especie identificada como *Cruz nema* spp. se requerían hembras y machos para dar lugar a la progenie, confirmando que esos gusanos corresponden a una especie dioica. Otros descriptores que ayudaron a la clasificación son la forma de la boca, cutícula y la longitud del cuerpo de 1.5 mm.

Las otras tres especies son hermafroditas, pues fueron capaces de reproducirse a partir de un solo individuo. Tienen un tamaño cercano a 1 mm de longitud y pueden formar la larva dauer- del alemán resistencia, duración- (datos no mostrados). La larva dauer esta arrestada en el desarrollo y ha entrado en un estado de diapausa que es metabólicamente equivalente a la hibernación de los mamíferos. La diapausa les permite sobrevivir por meses sin alimento y resistir a las inclemencias del

ambiente (Cassada and Russell, 1975). Este estadio es vital para la sobrevivencia y dispersión hacia nuevos ambientes. La larva dauer realiza nictación, que es una conducta de búsqueda donde los animales se levantan sobre sus colas, pegándose unos con otros para formar torres de dauers (Lee et al., 2011). De esa manera es más probable que puedan adherirse a insectos que pasan volando y trasladarse a nuevos territorios (Hu, 2007).

Debido al pequeño tamaño de las bacterias, estas se estudian en pequeñas poblaciones llamadas colonias. Existen numerosas técnicas de clasificación de bacterias, entre ellas las tinciones (simple, negativa y especiales). En este trabajo se realizó la tinción de Gram, para diferenciar organismos con distinto grosor de la pared celular. El paso inicial es la adición de cristal violeta, un colorante catiónico que penetra todas las células bacterianas atravesando su pared celular. El lugol añadido como segundo paso, ayuda a que el cristal violeta se impregne con mayor eficacia en la pared celular. La posterior aplicación de una mezcla de alcohol/acetona ayuda a decolorar la muestra y retirar el tinte que no se haya fijado. Este paso es seguido por el más importante dentro de este protocolo de tinción: el uso de la safranina. Esta sirve para teñir los microorganismos que no fijaron el tinte violeta y que por tanto son Gram negativos. Los Gram negativos toman una coloración rojiza o rosa que tiene relación a que poseen una pared celular más delgada. Los Gram positivos retienen el color azul inicial por la presencia de la doble pared celular. Es interesante que todas las especies que crecieron a partir de las deposiciones de los nemátodos aislados sean Gram negativas y pequeñas. Esto podría estar asociado a la habilidad del gusano de engullirlas simplemente porque caben en su boca que es de un diámetro definido. Al igual que los gusanos, la identificación molecular de bacterias encontradas está en progreso. Este proceso tomará algo más de tiempo para obtener la identificación molecular de los organismos. Además, por ahora este proyecto tiene un carácter de exploratorio.

Si bien desconocemos el nombre de la bacteria que hemos encontrados, los nemátodos tienen mejores herramientas que las nuestras para identificar un buen alimento. Recurrimos a una herramienta conocida como la cuantificación del índice de evitación (Hart y Chao, 2010). Si una bacteria le es agradable como alimento al gusano, este se mantendrá más tiempo en el césped y por lo tanto será más frecuente encontrarlo allí. Lo opuesto ocurrirá con una bacteria poco palatable, patógena o que tenga un diámetro mayor al de la boca del animal, que lo guiarán a que salga del césped en busca de un mejor alimento. Ninguna de las bacterias les causó enfermedad a los gusanos, en muchos casos, se alimentaron y acabaron el césped a los pocos días, debido a que comieron ávidamente de la bacteria. Esto es esperable, los animales ansiamos comer alimentos ricos que nos sean nutritivos, y esto es lo que observamos en estos animales sencillos pero fabulosos. De este experimento podemos concluir que, si bien no conocemos en detalles las bacterias asociadas a los nemátodos encontrados en Valparaíso, estas son en mayor o menor grado del gusto de *C. elegans*. Es altamente posible que estas bacterias sean parte de la dieta original de diferentes especies nemátodas presentes en los suelos de la V región. Sería interesante analizar longitudinalmente cómo estas bacterias cambian con el paso de las estaciones y cómo un contexto de cambio climático y calentamiento global las afecta junto a la fauna dependiente de ellas, ya que si bien, es difícil verlos, sustentan nuestra y varias otras formas de vida.

Este puede ser el comienzo de diversos estudios que nos muestren la riqueza de nuestras tierras, cómo las estamos afectando y qué esperar del futuro. Si bien este es un estudio exploratorio e inicial, es posible desarrollar una línea de investigación completa que tenga menos sesgos de muestreo que la actual. En este muestreo no encontramos nemátodos que no se alimentaran de bacterias, observamos sólo una bacteria que no exhibía resistencia a estreptomina. En el futuro sería intere-

sante analizar otros grupos asociados a las muestras del suelo como el Reino Fungi. En otras palabras, si queremos observar ampliamente los secretos que las tierras de Valparaíso aguardan es necesario ampliar más la metodología usada, pero que ya sabemos, funciona.

CONCLUSIONES

Este es el primer muestreo de nemátodos de este tipo en la región de Valparaíso. En un nivel exploratorio este estudio se convierte en la prueba de concepto de la aplicabilidad de este tipo de muestreo. Usando un protocolo de recolección simple y análisis preliminar en el laboratorio hemos demostrado la factibilidad de encontrar especies microscópicas tanto bacterias como animales en los ecosistemas que nos rodean. Este es un avance en la búsqueda de nemátodos nativos de la región de Valparaíso y más aún en la reconstrucción de sus microbiomas, empezando por estas fantásticas criaturas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado gracias al apoyo del Programa de Doctorado en Ciencias mención Neurociencias de la Universidad de Valparaíso, al del Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso, al Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor y al Museo de Historia Natural de Valparaíso. Gracias a ellos es que fue posible que nuestro trabajo llegara a ustedes. Queremos agradecer también a Alejandra Díaz (CINV) quien nos apoyó con la toma de muestras de la Playa Las Salinas. Agradecemos también a la Comisión Nacional de Investigación en Ciencia y Tecnología (CONICYT) y al Instituto Milenio asociado al Centro Interdisciplinario de Valparaíso (P029-022-F) quienes financian nuestros estudios. Finalmente, gracias a todos quienes han apoyado nuestro interés en realizar divulgación de las actividades que realizamos en los laboratorios financiados principalmente con fondos públicos. A todos, simplemente muchas gracias.

BIBLIOGRAFÍA

Barrière, A., Félix, M.A. 2006. Isolation of *C. elegans* and related nematodes., WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.115.1, <http://www.wormbook.org>.

Bartholomew, J. W. y Mittwer, Tod. 1952. The gram stain. *Bacteriological Reviews* 16(1):1-29.

Bongers, T., Bongers, M. 1998. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology* 10(3): 239–251.

Callaway, E. 2017. Oldest *Homo sapiens* fossil claim rewrites our species' history. *Nature News*. Disponible en: <https://cutt.ly/Ge82MpC> [Consultado: Octubre, 2019].

Chen, Z., Zhou, C., Yuan, X., Xiao, S. 2019. Death march of a segmented and trilobate bilaterian elucidates early animal evolution. *Nature* 573: 412–415.

Chenuil, A. 2006. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127 (1-3): 101-120.

Cobb, N. A. 1914. Nematodes and their relationships (pp. 457-490). US Government Printing Office. Disponible en: <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43748196/PDF> [Consultado: Octubre, 2019].

Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection. Chapter XIV Recapitulation and Conclusion.

Erkut, C., Vasilj, A., Boland, S., et al. 2013. Molecular strategies of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva to survive extreme desiccation. *PLoS ONE* 8(12): 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0082473.

Freckman, D. W., Virginia, R. A. 1997. Low-diversity Antarctic soil nematode communities: distribution and response to disturbance. *Ecology* 78(2): 363-369.

Gest, H. 2004. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes and records of the Royal Society of London* 58(2): 187-201.

Guinzburg, C. 1976. El queso y los gusanos. El cosmos según un molinero del siglo XVI. Barcelona: Muchnik Editores.

Hart, A.C., Chao, M.Y. 2010. From odors to behaviors in *Caenorhabditis elegans*. En: *The neurobiology of olfaction* (Menini, A.) CRC Press/Taylor & Francis.

Hu, P.J. Dauer (August 08, 2007), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.144.1, <http://www.wormbook.org>.

Lee, H., Choi, M. K., Lee, D., et al. 2012. Nictation, a dispersal behavior of the nematode *Caenorhabditis elegans*, is regulated by IL2 neurons. *Nature neuroscience* 15(1): 107.

Margulis L. 1974. Five-Kingdom Classification and the Origin and Evolution of Cells. En: *Evolutionary Biology* (Dobzhansky T., Hecht M.K., Steere W.C.; eds). Springer, Boston, MA, 45-78 p.

Mutterer, J., Zinck, E. 2013. Quick-and-clean article figures with FigureJ. *Journal of microscopy*, 252(1): 89-91.

Pellegrin, P. 1986. The status and function of Aristotle's zoological classifications, in Aristotle's classification of animals: biology and the conceptual unity of the Aristotelian corpus. California: Univ of California Press. 113-158 pp.

Reboredo, G.R., Camino, N.B. 1998. Two new species of nematodes (Rhabditida: Diplogasteridae and Rhabditidae) parasites of *Gryllodes laplatae* (Orthoptera: Gryllidae) in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93(6): 763-766.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9(7): 671-675.

Shih, P.Y., Lee, J.S., Shinya, R., et al. 2019. Newly Identified Nematodes from Mono Lake Exhibit Extreme Arsenic Resistance. *Current Biology* 29 (19) 3339-3344. doi: 10.1016/j.cub.2019.08.024

Shatilovich, A. V., Tchesunov, A. V., Neretina, T. V., et al. 2018. Viable Nematodes from Late Pleistocene Permafrost of the Kolyma River Lowland. *Doklady Biological Sciences* 480 (1) 100-102.

Stiernagle, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.

Wiegel, J. 1981. Distinction between the Gram reaction and the Gram type of bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 31 (1): 88.

Yeates, G. W., Bongers, T. 1999. Nematode diversity in agroecosystems. En: *Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes* (Paoletti, M. G.) New York: Elsevier Scienceo, pp. 113-135.



MUSEO DE HISTORIA
NATURAL DE VALPARAÍSO