

## PRÁCTICA: ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN UN MICROAMBIENTE.

### OBJETIVOS

Mediante el empleo de una columna de Winogradsky, el estudiante logrará:

- Aplicar e interpretar los conocimientos de las diferentes técnicas utilizadas para la caracterización de microorganismos.
- Diferenciar los grupos microbianos presentes en un microambiente.
- Comparar los microorganismos que crecen a lo largo de la columna en diferentes tiempos.
- Relacionar la diversidad microbiana presente en un microambiente con algunas de sus características fisiológicas.
- Explicar las causas que originan la sucesión de microorganismos observada.

### INTRODUCCIÓN.

A diferencia de los estudios realizados por Luis Pasteur y Roberto Koch sobre cultivos puros, dos famosos microbiólogos: Sergei N. Winogradsky (1856-1953) y Martinus Willem Beijerinck (1851-1931), fueron los primeros en estudiar las relaciones entre diferentes tipos de microorganismos en un mismo hábitat.

El estudio de las comunidades microbianas en condiciones de laboratorio puede realizarse fácilmente en una columna de Winogradsky, la cual simula un microecosistema o microambiente que ilustra cómo los microorganismos ocupan microespacios altamente específicos de acuerdo con sus necesidades vitales, tales como: requerimientos de carbono, energía y oxígeno, así como la interdependencia, de forma tal que la actividad metabólica de un microorganismo posibilita el crecimiento de otros y viceversa. Estas columnas, que llevan el nombre del microbiólogo ruso que las utilizó por primera vez, son sistemas completamente autoreciclables.

Las columnas de Winogradsky se preparan con muestras de suelo colectadas en ambientes húmedos, las cuales son enriquecidas con compuestos orgánicos e inorgánicos y finalmente son expuestas a una fuente de luz natural. En ellas se observa que después de 3 ó 4 semanas de incubación aumenta la cantidad de los distintos tipos de microorganismos, mismos que de acuerdo con sus características fisiológicas se establecen en las diferentes zonas a lo largo de la columna, lo que se conoce como sucesión. De esta forma, el resultado es una columna estratificada (zonas de diferente color) tanto en el suelo como en el agua, donde cada estrato se relaciona con un proceso químico-biológico.

En la zona inferior de lodos se desarrollan organismos fermentadores que producen alcohol y ácidos grasos como subproductos de su metabolismo. Estos productos de "desecho" constituyen el sustrato para el desarrollo de bacterias reductoras de sulfato, las cuales como resultado de su metabolismo liberan sulfuros que difunden a la zona superior oxigenada creando un gradiente en el que se desarrollan bacterias fotosintéticas que utilizan el azufre.

Por encima de esta zona pueden desarrollarse las bacterias púrpura que no utilizan el azufre y que obtienen su energía de reacciones luminosas, pero que emplean ácidos orgánicos como fuente de carbono para su síntesis celular.

Finalmente, en la zona aerobia crecen las Cianobacterias y algas las cuales como producto de su metabolismo liberan oxígeno. También pueden crecer bacterias que oxidan compuestos del azufre y

del nitrógeno hasta sulfatos y nitratos respectivamente. Todos estos grupos sintetizan su materia orgánica a partir del CO<sub>2</sub>.

### **ACTIVIDADES GENERALES.**

1. Preparar una columna de Winogradsky.
2. Tomar muestras a distintos niveles de la columna para describir las variaciones en la composición microbiana a diferentes tiempos.
3. Relacionar la sucesión microbiana que se establece en la columna con los requerimientos de carbono, energía, oxígeno y metabolismo a lo largo del tiempo, durante 5 semanas.
4. Integrar los resultados obtenidos en los diferentes tiempos del muestreo.

## **PREPARACIÓN DE LA COLUMNA.**

### **MATERIALES**

Por grupo:

- 4.0 g. de cada una de las siguientes sales minerales:  
CaCO<sub>3</sub> (o cáscara pulverizada de un huevo)  
CaSO<sub>4</sub>  
CaHPO<sub>4</sub>

Por mesa:

- 1 balanza granataria.
- 1 recipiente alto de boca ancha, de paredes transparentes, rectas y sin bordes.

Que deben tener los alumnos por mesa:

- 300 a 500g de muestra de suelo o barro de un arroyo, lago, pantano o costa de mar o río (sedimento superficial o subsuperficial).
- 1 500 mL de agua de estanque, río o asequía.
- 1 yema de huevo cocido.
- 3 tornillos o clavos de hierro.
- Papel periódico finamente cortado.
- 3 m de cordón de nylon o hilo cáñamo.
- 8 portaobjetos con muesca en uno de los extremos.
- 1 varilla de vidrio de aprox. 20 cm.
- 1 espátula.

### **MÉTODO**

1. Colectar una cantidad de suelo, lodo o barro ricos en materia orgánica. Remover las piedras, ramas o partículas grandes del material en estudio.
2. Adicionar al suelo 1 g de cada una de las sales, el papel finamente cortado y el huevo desmenuzado. Mezclar hasta homogenizar completamente.
3. Colocar la mezcla en un recipiente adecuado hasta ocupar 1/3 del volumen total. Compactar el suelo con la ayuda de una espátula a fin de eliminar las burbujas de aire (Fig. 1)

4. Añadir la muestra de agua al suelo hasta llegar a una altura de aproximadamente de 3 a 5 cm abajo del borde. Tener cuidado de no resuspender la muestra compactada, para ello inclinar la botella y resbalar el agua lentamente por las paredes.
5. Agitar la solución con una varilla de vidrio para eliminar burbujas de aire (Fig 1).
6. Registrar el aspecto final de la columna (color del sedimento y del líquido).
7. Tomar 8 portaobjetos y hacerles unas muescas (Fig. 2A). Sobre ellas amarrar un extremo del hilo cáñamo de tal forma que se pueda jalar el portaobjetos con el otro extremo (figura 2B).
8. Colocar los 8 portaobjetos en una posición vertical a diferentes niveles, cuatro sobre el sustrato inclinados contra la pared del recipiente dejando que el extremo de hilo suelto quede suspendido fuera de la botella y cuatro en los primeros 10 cm de la superficie. (Fig. 2C).
9. Colocar dos clavos (uno galvanizado y uno no galvanizado) al fondo, sobre el sustrato amarrados de un hilo.
10. Marcar el nivel de agua y cubrir la boca de la botella con el plástico auto adherible. Hacer algunas perforaciones para reducir la evaporación. Puede ser necesario reponer agua para mantener el nivel original.
11. Incubar a temperatura ambiente (25 a 30°C) cerca de una ventana para que reciba iluminación.

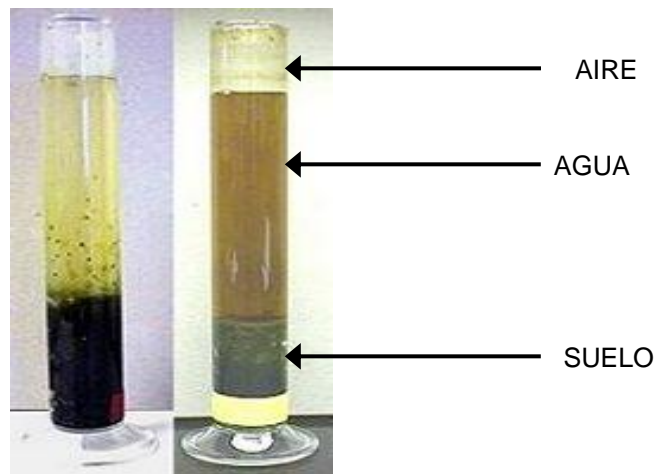


FIGURA 1. Forma de montar la columna de Winogradsky.

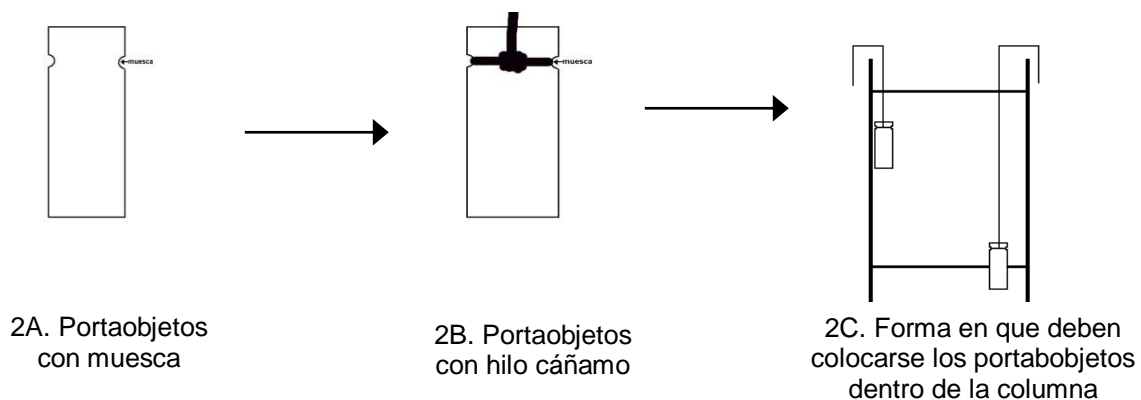


FIGURA 2. Secuencia de pasos para colocar los portaobjetos con muesca en la columna de Winogradsky

## **OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA COLUMNA**

### **PRIMERA SEMANA DE INCUBACIÓN**

#### **Material**

##### Por mesa:

1 juego de frascos goteros con los siguientes reactivos colorantes:

- Azul de metileno (1:10000)
- Verde de Janus (1:3000)
- Verde de metilo (1:10000)
- Rojo neutro (1:10000).
- Solución de Ringers y de Noland's

##### Por equipo:

- 2 pipetas graduadas de 5 ó 10 mL.
- 1 pinzas largas de punta roma.
- 1 microscopio.
- 1 frasco gotero con aceite de inmersión.
- 1 juego de colorantes de Gram.
- 1 juego de colorantes vitales y para tinción simple.

##### Por los alumnos por mesa:

- 1 marcador indeleble
- 8 portaobjetos con y sin muesca
- 8 cubreobjetos
- 2 mecheros
- 2 propipetas.
- 2 asas
- 1 piseta

#### **Método**

1. Observar la columna y registrar, en el cuadro 1, los cambios físicos producidos con respecto al aspecto inicial.
2. Remover dos portaobjetos (uno de la superficie y otro del fondo). Dado que los microorganismos pueden colonizar ambos lados de los portaobjetos, es necesario limpiar una de sus caras; observar los microorganismos sin teñir con los objetivos de 10X y 40X. Posteriormente fijar con alcohol-ácido acético (8:2) durante 5 minutos a temperatura ambiente y teñir con azul de metileno o safranina. Observar con el objetivo de inmersión, esquematizar o fotografiar los microorganismos observados y registrar en el cuadro 2. Puede ser necesario modificar las técnicas de fijación y coloración dependiendo del tiempo transcurrido. Recordar que las bacterias son los primeros organismos en colonizar los portaobjetos, seguidos por las algas, los protozoarios y algunos invertebrados.
3. Reemplazar los portaobjetos muestreados por unos nuevos.
4. Tomar muestras de los diferentes niveles de la columna, con una pipeta de vidrio, iniciando en la superficie y terminando en la zona más profunda. Limpiar la superficie de la pipeta con un

- algodón impregnado con una solución desinfectante y colocar la muestra en un tubo de ensaye no estéril.
5. Hacer al menos 2 preparaciones de cada una de las muestras. Tener cuidado de enjuagar la pipeta con agua corriente entre las distintas tomas de muestra. Al finalizar depositarla en el pipetero.
  6. Realizar de cada muestra una preparación húmeda y una fija y teñida.
    - a) Preparaciones húmedas: Colocar una gota de muestra en un portaobjetos y colocar un cubreobjetos. Observar el tipo y la abundancia de los diferentes microorganismos, así como su movilidad. Se recomienda este tipo de preparación sin teñir cuando las muestras proceden de la zona aeróbica o superior, donde se encuentran con mayor probabilidad algas, protozoarios y cianobacterias. En la segunda preparación colocar la muestra, agregar una gota de algún colorante vital y colocar el cubreobjetos.
    - b) Preparaciones fijas y teñidas: Tomar una gota de muestra y realizar un frotis, teñir con Gram o con tinción simple. Observar al microscopio.
  7. Registrar y esquematizar en el cuadro 2 los distintos tipos de microorganismos observados.

## **OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA COLUMNA**

### **SEGUNDA SEMANA DE INCUBACIÓN (y subsecuentes)**

#### **MATERIALES**

##### Por mesa:

- Se ocuparán los mismos materiales indicados en la segunda sesión.

##### Por los alumnos por mesa (esterilizar para la siguiente clase):






- 1 tubo de 16 X 150 con 9 mL de solución salina isotónica (SSI).

#### **MÉTODO**

1. A partir de la segunda semana de incubación, repetir el procedimiento indicado en los incisos 1 a 3 indicados en la primera semana.
2. Registrar y esquematizar los cambios físicos de la columna, así como los distintos tipos de microorganismos (emplear copias de los cuadros 1 y 2).
3. Comparar los esquemas e identificar los cambios físicos que tienen lugar en la columna a lo largo del tiempo y describir la sucesión de los microorganismos.

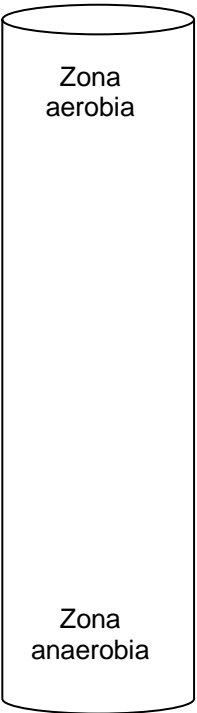
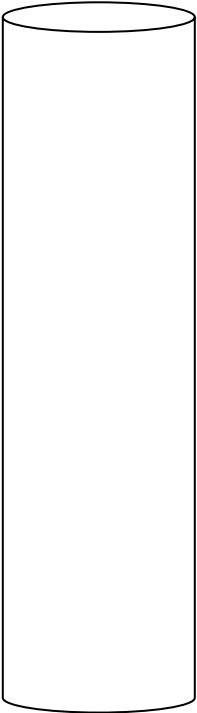
### **REGISTRO DE RESULTADOS**

**CUADRO 1.** Observaciones físicas de la columna de Winogradsky durante 5 semanas de incubación.

Semana	Zona de la columna	Observaciones (sedimentación, color uniforme o presencia de bandas, formación de burbujas, olor característico*, etc.)
1		
2		
3		
4		
5		

\*por ejemplo olor a huevo podrido, etc.

**CUADRO 2.** Observaciones microscópicas de las primeras tres semanas de incubación de la columna de Winogradsky.

Requerimientos de Oxígeno	Zona de la Columna	Tipo de organismos observados	Morfología	Tinción de Gram <sup>1</sup>	Esquemas <sup>2</sup>
					

<sup>1</sup>Sólo bacterias.

<sup>2</sup>Se pueden poner únicamente los números de las imágenes y por separado colocar los esquemas o fotos de los organismos observados.

## DISCUSIÓN E INTEGRACIÓN DE RESULTADOS.

Comparar los resultados de los microorganismos observados a diferentes tiempos y niveles de la columna. Discutir con respecto a:

- ¿Se observa el mismo tipo de microorganismos? ¿En qué zonas y a qué tiempo de incubación se observa la mayor cantidad y diversidad de protozoos, algas, bacterias grampositivas y gramnegativas?
- ¿Qué requerimientos de oxígeno presentaron los microorganismos desarrollados?

Con la información anterior, trazar una línea de tiempo en la que se relacionen los requerimientos de oxígeno determinados con la zona de la columna de la cual procede la muestra, el color desarrollado y el tiempo de incubación.

### ANEXO 1. GUÍA PARA LA INTERPRETACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y SUCESIÓN MICROBIANA EN UNA COLUMNA DE WINOGRADSKY

Después de cuatro a seis semanas de la preparación de la columna, se establecen tres tipos de ambientes: el anaerobio, el microaerófilico y el aerobio, en donde se desarrollan comunidades bacterianas específicas (Fig. 5), organizadas en tres diferentes zonas a lo largo de la columna:

### **Zona anaeróbica**

Se localiza en el fondo de la columna en donde crecen dos tipos de organismos: los que fermentan la materia orgánica y los que realizan la respiración anaerobia, ambos descomponen la materia orgánica y dan lugar a la formación de ácidos orgánicos, alcoholes y  $H_2$ .

La fermentación es un proceso en el que los compuestos orgánicos son degradados de forma incompleta (por ejemplo, las levaduras fermentan los azúcares a alcohol). La respiración anaeróbica es un proceso en el que los sustratos orgánicos son completamente degradados a  $CO_2$ , usando una sustancia distinta del oxígeno como aceptor terminal de electrones (por ejemplo, nitratos o iones sulfato).

El nivel más bajo de esta zona se caracteriza por formar un ambiente con alta concentración de  $H_2S$ , aparecen varios grupos diferentes de bacterias: por ejemplo, dependiendo del tipo de barro utilizado, encontramos bacterias del género *Amoebacter*, bacterias púrpura del azufre portadoras de vesículas de gas, las cuales aparecen formando una banda de color rosado.

En esta misma zona, en condiciones estrictamente anaerobias al cabo de unas semanas, y utilizando la carga de celulosa aportada por los restos de papel incorporados en el sedimento como fuente primaria para su metabolismo, aparecen las bacterias del género *Clostridium*. Todas las especies de este género son anaerobias estrictas porque, aunque sus esporas pueden sobrevivir en condiciones aerobias, las células vegetativas mueren si están expuestas al oxígeno. Por eso no empiezan a crecer hasta que éste desaparece del sedimento. Estas bacterias degradan la celulosa a glucosa y, a continuación, fermenta la glucosa para obtener la energía que necesitan, produciendo una serie de compuestos orgánicos simples (etanol, ácido acético, ácido succínico, etc.) como productos finales de esa fermentación.

Un poco por encima, las bacterias reductoras del azufre (representadas por *Desulfovibrio*) se visualizan como una profunda capa negra. Éstas pueden utilizar los subproductos de la fermentación para su respiración anaerobia, usando sulfato, u otras formas parcialmente oxidadas de azufre como el tiosulfato, generando grandes cantidades de  $H_2S$  en el proceso. Este  $H_2S$  reaccionará con cualquier hierro presente en el sedimento, produciendo sulfuro ferroso, que da color negro. Es por esto que los sedimentos acuáticos son frecuentemente negros.

### **Zona microaerófila**

No todo el  $H_2S$  es utilizado, ciertas cantidades se difunden hacia arriba a lo largo de la columna de agua y son utilizados por otros organismos que crecen en las zonas superiores.

Este crecimiento se visualiza bajo la forma de dos bandas estrechas, brillantemente coloreadas, inmediatamente por encima del sedimento: en una primera franja, las bacterias verdes del azufre (como *Chlorobium*) procesan los sulfatos a azufre y aparecen en una franja verdosa. En otras zonas cercanas, bacterias como *Gallionella* procesan el Hierro formando una capa negra que se forma justamente por debajo de la anterior. Un poco más arriba, algo más alejadas por tanto de las altas concentraciones de sulfhídrico se desarrolla una zona de bacterias púrpuras del azufre, como *Chromatium*, caracterizada por su color rojo-púrpura. Estas bacterias del azufre, verdes y púrpuras, obtienen energía de las reacciones luminosas y producen sus materiales celulares a partir de  $CO_2$ . En



gran medida, de manera muy similar a como lo hacen las plantas aunque, sin embargo, hay una diferencia esencial: no producen oxígeno durante la fotosíntesis porque no utilizan H<sub>2</sub>O como elemento reductor sino H<sub>2</sub>S.

Un poco por encima de esta zona nos encontramos una banda de bacterias púrpuras no del azufre, microorganismos anaerobios fotoorganótrofos que sólo pueden realizar la fotosíntesis en presencia de una fuente de carbono orgánico, por ejemplo *Rhodospirillum* y *Rhodopseudomonas*, que adquiere un color rojo-anaranjado. Su mayor o menor abundancia dependerá de la cantidad de sulfhídrico que se haya producido y de la cantidad que, no haya sido utilizada por otros organismos, difunda hacia arriba, ya que su presencia inhibe a estas bacterias.

### **Zona aerobia**

La parte superior de la columna de agua puede contener abundantes poblaciones de bacterias de diferentes tipos. Son organismos aerobios que se encuentran generalmente en los hábitats acuáticos ricos en materia orgánica (estanques poco profundos, arroyos contaminados, etc.). Suelen ser flagelados o ciliados (protozoarios), lo que les permite moverse y establecerse en nuevas áreas. Puede desarrollarse también microorganismos fototróficos diferentes procedentes directamente del agua o del barro utilizado originalmente en el montaje de la columna. La superficie del barro puede presentar en esta zona un ligero color castaño. Esta es la parte de la columna más rica en oxígeno y más pobre en azufre.

Sin embargo, también aquí llegarán por difusión, procedentes del barro de zonas inferiores, ciertas cantidades de H<sub>2</sub>S que será oxidado a sulfato por bacterias que oxidan azufre (como *Beggiatoa* y *Thiobacillus*). Estas bacterias obtienen energía oxidando el H<sub>2</sub>S a azufre elemental y sintetizan su propia materia orgánica a partir de CO<sub>2</sub>. Por esto se les llama quimioautótrofas.

En las zonas superiores pueden crecer también cianobacterias fotosintéticas, lo que se visualizaría cómo un tapete de césped de color verde. Estas bacterias se caracterizan por ser las únicas que realizan una fotosíntesis similar a la de las plantas. De hecho, hay poderosas evidencias de que los cloroplastos de las plantas proceden de cianobacterias ancestrales que se establecieron como simbioses dentro de células de algún eucariota primitivo. De forma paralela hay también evidencias igualmente fuertes de que las mitocondrias de los eucariotas actuales se derivaron de bacterias púrpuras ancestrales por un similar sistema de endosimbiosis.

### **BIBLIOGRAFÍA**

Brock, T. D. y Madigan, M. T. 1993. Microbiología. Sexta edición. Prentice Hall Hispanoamericana S.A.

Seeley, H. W. Jr., VanDemark, P. J., Lee, J. J. 1991. Microbes in action. A Laboratory Manual of Microbiology. W. H. Freeman and Company New York. Fourth Edition.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. 1993. Introducción a la Microbiología. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

Vullo, D., Wachsman, M., Alche, L. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. Primera edición Editorial Atlante S.R.L., Buenos Aires.

Sinauer Associates and Sumanas, Inc.2002. The Winogradsky Column: An Animated Tutorial. <http://serc.carleton.edu/resources/2577.html>

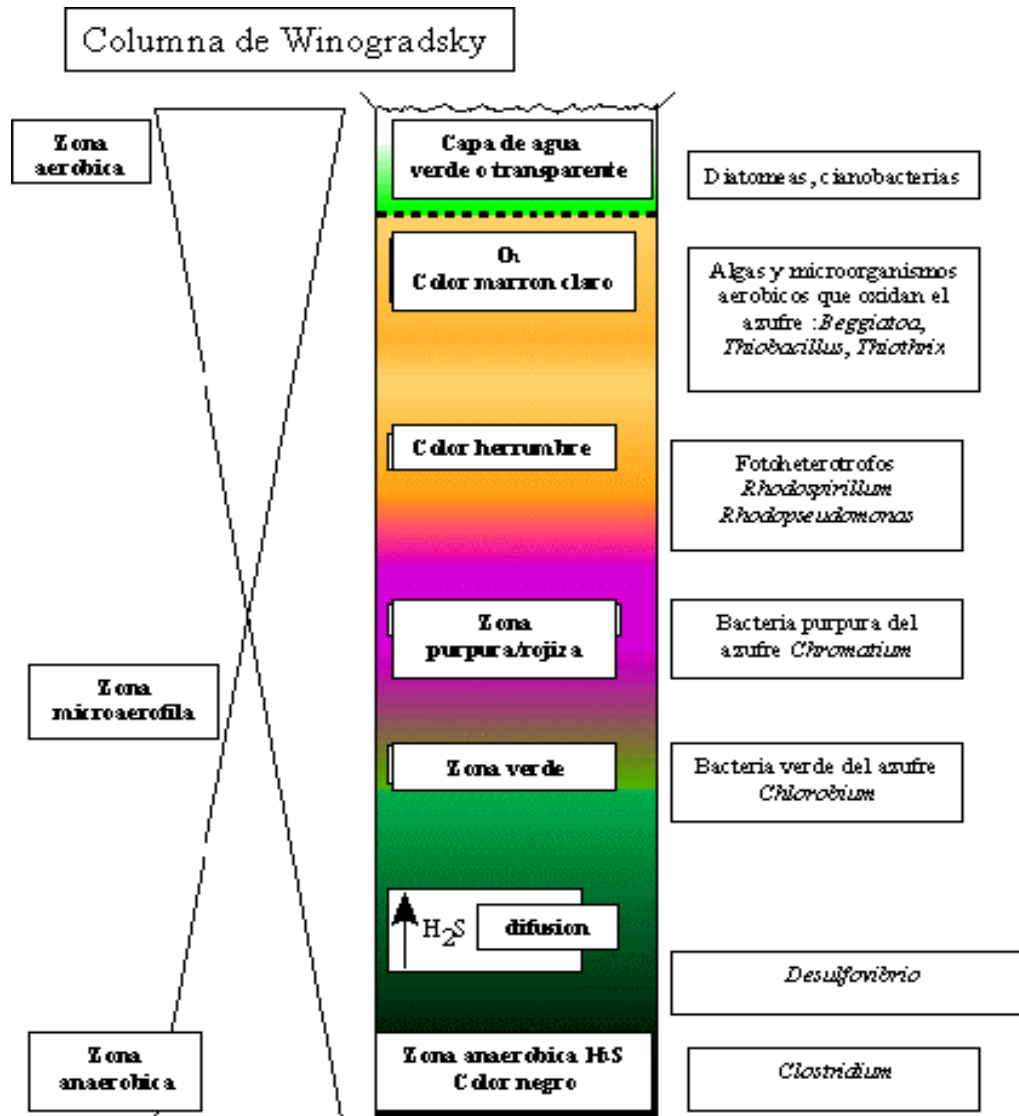


Figura 5. Guía para la observación e interpretación de la columna de Winogradsky.