

## LABORATORIO COLUMNA DE WINOGRADSKY

Por: L. F. Velásquez V. (1)

### INTRODUCCION

Este experimento relativamente "simple" consiste en incubar agua de pantano o suelo, enriquecido con materia orgánica, azufre, etc. en una columna de vidrio y en presencia de luz, dando lugar al cabo de un tiempo, a una excelente demostración de un enriquecimiento selectivo de diferentes grupos de microorganismos. También ilustra la diversidad de rutas bioquímicas o funciones que existen y de las ventajas selectivas que éstas les confieren a ciertas especies bacterianas permitiéndoles así dominar en un hábitat.

La columna es predominantemente anaeróbica. Inicialmente las bacterias heterótrofas usan el oxígeno presente para la oxidación aeróbica de material orgánico (ej.: celulosa). Bajo las condiciones anaeróbicas que suceden, la utilización de celulosa da lugar a que se produzca  $\text{CO}_2$  y moléculas orgánicas simples (ácidos grasos, lactatos). Estos compuestos de carbón actúan como una fuente de energía (donadores de electrones), para una flora secundaria de bacterias reductoras de azufre (ejemplo *desulfovibrio spp.*). La flora secundaria reduce el  $\text{SO}_4$  (un aceptor final de electrones) a expensas del lactato produciendo dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno. Estos gases en presencia de luz, permiten el desarrollo de una flora terciaria fotosintética de bacterias del azufre. Esta incluye bacterias del azufre, tanto púrpuras (Thiorhodacea) como verdes (Chlorobacteriaceae) las cuales son capaces de utilizar  $\text{H}_2\text{S}$  como una fuente de poder reductor (donadores de electrones) en la fotosíntesis, aunque éste es tóxico para la mayoría de otros organismos. Las capas superficiales de la columna son aeróbicas o microaerófilas y en ellas pueden desarrollarse los protozoos y las algas verdes y verde azules.

### DEMARCACION DE ZONAS

Debe llevarse a cabo de una completa investigación de la columna. El grupo hará columnas y observará los cambios que ocurran en ellas por 6 a 8 semanas demarcando las zonas encontradas. Fig. 1.

En la Figura 1 sólo se ha presentado un posible esquema de lo que se puede encontrar. Las especies que se desarrollan, dependerán de varios factores, tal como la concentración de sulfuro de hidrógeno. Además hay que considerar otras variaciones incluyendo el pH (5.5-9.0), la temperatura, la luz (intensidad y longitud de onda), otros donadores de electrones ( $\text{H}_2$ , tiosulfato y otros ácidos orgánicos) y quizás el filtrado lento en la columna.

Se debe estar preparado para detectar cambios grandes o sutiles como por ejemplo pérdida de color en las bacterias del azufre (Beggiatoa, Thiothrix, Thiobacillus, etc.).

### MATERIALES

1. Fango, preferiblemente negro y tomado de la orilla de un medio acuático, aunque también puede servir suelo de jardín o de un bosque. Además una buena cantidad de agua de estanque, río o mar.
2. Una columna de vidrio con un tapón de caucho en la base o en su defecto una probeta (El diámetro mínimo es de 3.5 cms. y una altura de 15-20 cms.). Se deben preferir las columnas con posibilidades de remoción del fango para su estudio por ejemplo aquellas que tengan un tapón de caucho que pueda quitarse y por donde la columna de fango puede ser empujada con un émbolo.
3. Sulfato de calcio (yeso), carbonato de calcio, celulosa o materia orgánica muerta.
4. pH metro. 1N. NaOH y 1N. HEP
5. Papel de aluminio.
6. Papel de filtro.

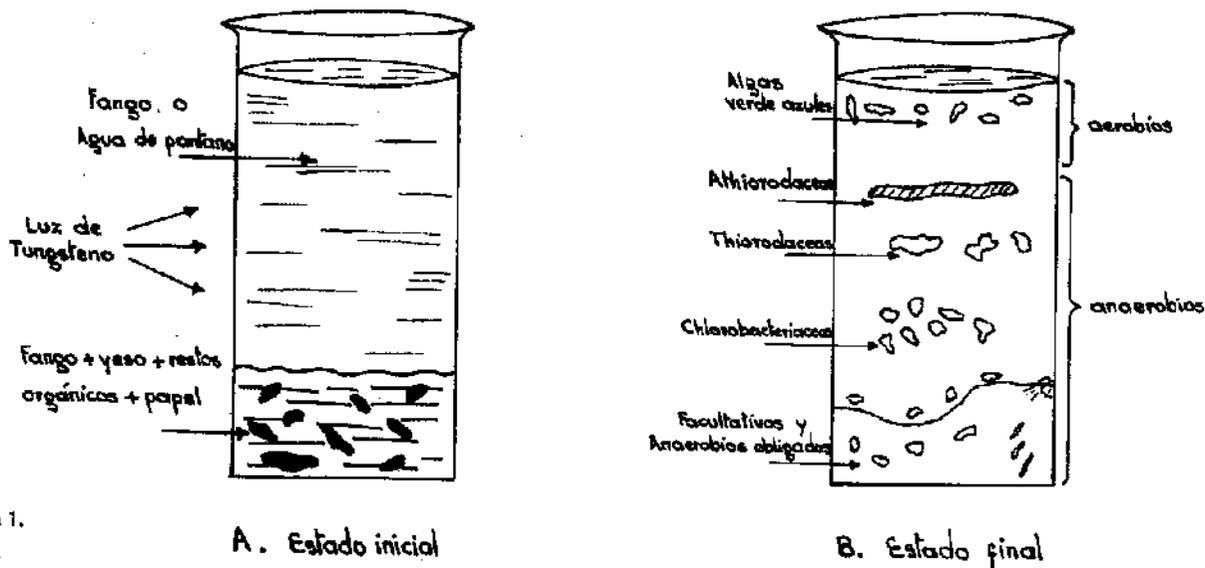


Figura 1.

A. Estado inicial

B. Estado final

## PROCEDIMIENTO.

- A. Columna de fango. Primero se debe remover del suelo o del fango todos los elementos grandes que existan (piedra, madera).

Se recomienda la utilización de un cedazo o malla para obtener un conjunto uniforme.

El fondo de la columna se prepara mezclando fango con 1-2 g de  $\text{CaSO}_4$  y, 1 g  $\text{CaCO}_3$  y algunas tiras de papel de filtro. Este conjunto se vierte dentro de la columna formando una capa de 2-3 cms.

Luego se vierte el resto de fango hasta alcanzar una capa de 15 cms. El fango debe mezclarse bien durante el vertido para prevenir la formación de burbujas de aire en la columna. Ajuste el pH si es necesario. Al final de la operación se decanta el agua de la parte superior dejando sólo una capa de 1 cm. de agua. Cubra con un plástico para evitar la evaporación, ilumine usando preferiblemente una lámpara incandescente. Si se utiliza luz solar se necesita una incubación por más tiempo. Haga observaciones periódicas.

- B. Columna acuosa: Prepare el fango enriquecido inicial, agregándole  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ , o celulosa, como se explicó en la parte A. Para esta primera parte es necesario doblar la cantidad de fango para formar una capa de 4-6 cms. en la columna. Luego cuidadosamente agregue el agua de pantano. Cubra e incube como en la parte A.

Usted puede hacer otras variaciones, como cambiar el pH o usar muestras del mar o desechos de una fábrica, etc..

## INTERPRETACION DE RESULTADOS

Aunque observaciones ecológicas simples pueden algunas veces ser difíciles para interpretarlas sin ambigüedades, se puede llegar a seleccionar entre las posibles alternativas la más satisfactoria o por medio de un análisis juicioso. Un caso que sirve de ejemplo en este punto es el suministrado por la ecología de las bacterias del azufre. Estos organismos son encontrados en ambientes que contienen sulfuro de hidrógeno y muchos de ellos se pueden reconocer fácilmente porque contienen cuerpos de inclusión en forma de *gotas* de azufre. Por muchos años la interpretación de las relaciones ecológicas significaban que las bacterias del azufre eran la causa de la producción del sulfuro de hidrógeno. Nunca se pensó en otra posibilidad hasta que Winogradsky llevó a cabo sus experimentos maestros, los cuales permitieron revolucionar los conceptos de los Quimioautótrofos (Winogradsky 1887-1888). Demostró que el crecimiento de las bacterias del azufre depende de la presencia del sulfuro de hidrógeno y fue así como resolvió la ambigüedad de esta situación ecológica. Aunque hay que reconocer que las nuevas interpretaciones fueron favorecidas por los experimentos fisiológicos, los estudios ecológicos figuran en un papel significativo.

Tan pronto como la nueva interpretación había sido concebida, Winogradsky realizó lo que implicó una consecuencia verificable. Si las bacterias del azufre crecían en ambientes especiales porque éstas contenían sulfuro de hidrógeno, estos organismos también deberían encontrarse en lugares donde estos constituyentes estuvieran presentes como resultado de actividades no microbiológicas tales como manantiales azufrados. Se encontró que esto era correcto. Bacterias del azufre eran aisladas en todos los manantiales azufrados.

## PREGUNTAS

1. ¿Por qué se forman manchas negras en el fango?
2. ¿En cuál posición se encuentran las bacterias verdes azufradas? Por qué?
3. ¿Diferencia entre las *Athiorodaceas* y las *Thiorodaceas*.
4. La columna de Winogradsky se ha hecho tradicionalmente con fango negro y de fuerte olor. ¿Por qué?
5. Si el  $H_2S$  de la columna no es completamente utilizado, ¿Cuál secuencia de eventos se puede predecir?

## BIBLIOGRAFIA

- N. Pfenning. 1957. Photosynthetic bacterie. *Ann. Rev. Microbiol.* 21:285.
- J. R. Postgate. 1966. Media for sulfur bacteria. *Lab. Pract.* 15:1239-44.
- Niel, C.B. van. 1954. The chemotrophic and Photosynthetic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 8:105.
- H. Truper. 1970. Culture and isolation of Phototrophic sulfur bacteria from the marine environment. *Helgolander Wiss. Meersunters.* 20:6-16.