

Identificación de microorganismos a partir de la elaboración de la columna de Winogradsky.

Jiménez Salazar Marcela, Parra Serna Laura Vanessa^{*}, Buriticá Herrera Héctor Mario ^{**}

RESUMEN

La columna de Winogradsky consiste en un método relativamente simple que permite llevar a cabo el estudio de una variedad de procesos microbianos a escala de laboratorio. Para la aplicación del método, se requirió básicamente de una columna de vidrio o plástico en su defecto, la cual contiene un ambiente acuático suplementado con unos pocos compuestos químicos, sin embargo esta composición y suplementación puede variar en su preparación según el estudio en particular que se desee realizar. La columna de Winogradsky es una demostración clásica de como los microorganismos ocupan “microespacios”, los cuales se caracterizan por ser altamente específicos de acuerdo con sus tolerancias medioambientales y lo que a sus necesidades vitales se refiere. La metodología de la realización de la columna consiste en incubarla durante un largo periodo de tiempo bajo luz solar, es común la formación de un gradiente de oxígeno y otro de sulfuros, lo cual determina específicamente una amplia variedad de ambientes en los que se disponen diversas especies de microorganismos con base en sus requerimientos específicos, tales como: algas, cianobacterias, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Chlorobium*, etc. El objetivo del presente estudio consistió en realizar la columna con el fin de identificar la presencia de los microorganismos nombrados con anterioridad formados en los diversos ambientes, con el fin de comprender su especificidad basada en los requerimientos de oxígeno particulares. Los resultados obtenidos, permitieron evidenciar la presencia de varios microorganismos a partir de los aislamientos de diferentes porciones de la columna.

Palabras clave: Recuento de colonia microbiana, ecología, aerobiosis, anaerobiosis, sustratos.

^{*}Estudiantes de Microbiología. ^{**}Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilibre.edu.co Universidad libre Pereira.

ABSTRACT

Winogradsky column is a relatively simple method to carry out the study of a variety of microbial processes laboratory scale. For the application of the method, it required basically a column of glass or plastic failing which contains an aquatic environment supplemented with a few chemicals, however this composition and supplementation may vary in their preparation according to the study in particular that you want to perform. As for microbial ecology is concerned, the column Winogradsky is a classic demonstration of how microorganisms occupy "microvoids" which are characterized by being highly specific in accordance with their environmental tolerances and what their basic needs are concerned. The process generated after the completion of the column consists of the fact that after incubating the same for a long period of time under sunlight, it is common the formation of a gradient of oxygen and other sulfides, which specifically determines a wide variety algae, cyanobacteria, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Chlorobium*, etc environments where various species of microorganisms based on their specific requirements, such as arranged. The aim of this study was to conduct the column in order to identify the presence of microorganisms named previously formed in various environments, in order to understand their specificity based on particular requirements oxygen. The results obtained, allowed to evidence the presence of several microorganisms from different isolates portions of the column.

Keywords: Colony count microbial, ecology, aerobic, anaerobic, substrates.

INTRODUCCIÓN

Sergio Winogradsky (1856-1953) inventó un método el cual permite estudiar una diversidad de procesos microbianos a escala de laboratorio, este microbiólogo Ruso usó la columna por primera vez para estudiar los microorganismos del suelo. El método requiere una columna de vidrio u otro material adecuado que contenga un ambiente acuático, el cual es suplementado con unos compuestos químicos específicos para el crecimiento de los microorganismos según sus necesidades.¹

La columna de Winogradsky es un sistema acuático en el que se ayuda a los microorganismos a establecerse en regiones diferentes según su metabolismo y constituye un modelo de ecosistema, es decir, el proceso de adaptación a los diferentes ambientes empleando diferentes estrategias para la obtención de energía.²

Una vez que se prepara la columna, esta se expone a luz solar, tras esto se desarrolla una sucesión de comunidades bacterianas

interrelacionadas metabólicamente, por otra parte esta columna es un sistema anóxico en miniatura que puede usarse como suministro a largo plazo de bacterias para cultivos de enriquecimiento.

Cuando la columna se encuentra en óptimas condiciones se pueden diferenciar tres zonas características en base a su concentración relativa de oxígeno:

- 1- Zona aerobia: es la más superficial, dispone de una alta concentración de oxígeno.
- 2- Zona microaerófila: con una menor concentración de oxígeno.
- 3- Zona anaeróbica: constituye el lecho de lodo³

Figura 1: Columna de Winogradsky

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilibre.edu.co Universidad libre Pereira.



Fuente: Elaboración propia

Las algas y las cianobacterias forman una capa superficial de color verde brillante y al producir oxígeno ayudan a mantener la aerobiosis en la zona superior de la columna. Mientras que en el fondo de la columna las bacterias reductoras del sulfato producen sulfuro, que provoca el crecimiento de bacterias rojas y verdes del azufre, de modo que se establecen dos gradientes en la columna, uno de oxígeno y otro de sulfuro de hidrógeno (H_2S).

Las bacterias quimiorganotrofas crecen a lo largo de toda la columna, los microorganismos aerobios y

microaerófilos en la parte superior, los anaerobios en las zonas donde hay sulfuro de hidrógeno.

Zona aeróbica: la parte superior de la columna de agua puede contener abundantes poblaciones de bacterias de diferentes tipos. Son organismos aerobios que se encuentran habitualmente en los hábitats acuáticos ricos en materia orgánica. Suelen ser flagelados, lo que les permite moverse y establecerse en nuevas áreas. Puede desarrollarse también microorganismos fototrófos variados 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.³

Sin embargo también allí llegan por difusión procedentes del barro de zonas inferiores, ciertas cantidades de SH_2 que será oxidado a sulfato por bacterias que oxidan azufre (como *Beggiatoa* y *Thiobacillus*).

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilibre.edu.co Universidad libre Pereira.

Estas bacterias obtienen energía oxidando el SH₂ a azufre elemental.

METODOLOGIA:

A una botella plástica de 3 L, que hizo las veces de cilindro se le corto la parte superior, con el fin de obtener un orificio de entrada amplio, posteriormente se llenó hasta 1/3 parte del volumen de la misma con lodos ricos en materia orgánica obtenidos con anterioridad, una vez realizado este proceso se añadieron restos orgánicos de diferente origen. Se añadió respectivamente a la mezcla de lodo un suplemento de SO₄Ca y CO₃Ca, los cuales actúan como fuente de sulfato y tampón respectivamente. Tras adicionar los diferentes componentes, hubo la necesidad de cerciorarse de que la mezcla quedara bien apretada para que no quedaran burbujas de aire, posteriormente la mezcla de lodo y suplementos fue cubierta con agua procedente de un lago, por otra parte se adicionaron residuos de papel, cascaras y clara de huevo, seguidamente la mezcla se cubrió con papel cristal y se dispuso en un mesón

frente a una ventana donde recibió la luz del sol entre 4 a 6 semanas aproximadamente, tiempo en el cual la instalación de la columna se estabilizo en cuatro ambientes básicos distintos en los cuales se desarrollaron diferentes comunidades bacterianas específicas, en función de sus requerimientos ambientales.

Preparación de medios de cultivo:

-Agar leche: se adicionaron 2.5 g de peptona, 3.0 g de extracto de levadura, 1.0 g de leche en polvo descremada y 7 g de Agar-agar, la mezcla se disolvió en 250 mL de agua destilada.

-Agar almidón: se adicionaron 1.5 g de extracto de levadura, 2.5 g de peptona, 1.0 g de almidón soluble y 7.5 g de Agar-agar, la mezcla se disolvió en 250 mL de agua destilada. Posteriormente se llevó a ebullición, se agito de 3 a 4 minutos hasta su disolución, finalmente se enfrió y se esterilizo.

-Agar avena: se hirvieron 30 g de avena en 200 mL de agua por 20 minutos, posteriormente se filtró la mezcla y se aforo a 250 mL, luego se

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilibre.edu.co Universidad libre Pereira.

adicionaron los gramos de agar-agar de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial para este volumen y se esterilizo.

Por último los agares preparados con anterioridad se sirvieron en las cajas de Petri estériles en cabina de seguridad, con el fin de evitar contaminación cruzada.

* Preparación de diversas muestras:

Para llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos de la columna de Winogradsky fue necesario separar 3 muestras (aerobios, microaerobios y anaerobios), para lo cual se siguió este procedimiento:

1) Zona aerobia: se tomó 1mL agua lodos de la superficie de la columna y se realizaron diluciones seriadas, para lo cual se tomaron cuatro tubos de ensayo y se depositaron 9 mL de agua en tres de ellos y 10 mL de agua destilada en el cuarto tubo restante (control). En el tubo uno se adiciono el mL de agua tomada con anterioridad de la superficie de la columna, este se mezcló con los 9 mL de agua destilada y posteriormente se transfirió 1mL de

este tubo al tubo dos, por último se adiciono 1 mL del tubo dos al tres, completando de esta forma las diluciones requeridas hasta llegar a 10^{-3} .

Seguidamente del tubo que contenía la dilución 10^{-3} se tomó de a 0.1mL de solución y se depositó en una caja de Petri de cada uno de los medios preparados con anterioridad. Es decir, se sembró de forma masiva 0.1mL de la dilución 10^{-3} en una caja de agar mantequilla, agar avena, agar almidón y agar leche respectivamente.

2) Zona anaerobia facultativa: se tomó 1mL de agua lodosa de la columna, en este caso de la zona de la mitad y se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a 10^{-3} , para esto se realizó el proceso tal y como se indicó en paso previo, realizando posteriormente la siembra de forma masiva en cada medio de cultivo.

*Observaciones microscópicas:

Con el fin de evidenciar la morfología microscópica de los microorganismos presentes en la columna, se tomaron muestras (gotas) de agua lodosa de las diferentes zonas de la columna y

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilibre.edu.co Universidad libre Pereira.

se fijaron en placas, aplicando en unos casos tinción de Gram y en otros llevando a cabo la visualización directa sin aplicar tinción, esto con el fin de identificar los microorganismos existentes observables por este método. Adicionalmente, debido a que se podían percibir algunas larvas en la superficie de la columna, estas se depositaron en portaobjetos y se observaron directamente al microscopio.

Una vez realizado el proceso anterior a partir de los medios de cultivo que contenían siembras de las diferentes zonas de la columna se tomaron muestras y se realizó tinción de Gram con el fin de identificar los microorganismos desarrollados en los medios respectivos de siembra.

RESULTADOS:

A partir de la identificación de las colonias formadas en los diferentes medios de cultivo tras exponer los mismos a la incubación respectiva, fue posible observar crecimiento bacteriano en todas las placas, siendo evidentes diferencias significativas entre cada una de estas como se

muestra en las siguientes figuras.

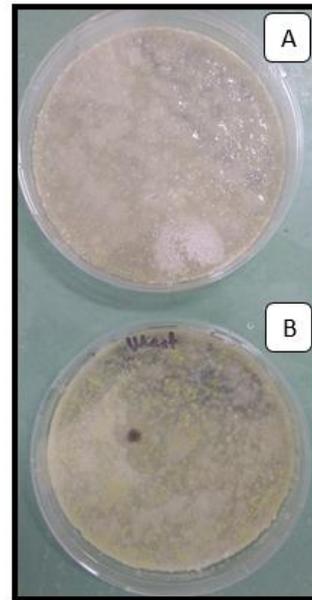


FIG 3: Formación de halos lipolíticos por acción de microorganismos en agar mantequilla

Fuente: Elaboración propia

A la hora de llevar a cabo el análisis asociado al crecimiento microbiano observado en el agar mantequilla, es importante mencionar que este es un producto lácteo que se caracteriza por considerarse importante como alimento, ya que contiene grasa, siendo esta nutricionalmente importante porque transmite principalmente las vitaminas liposolubles de la leche como lo son las Vitaminas A, D y E principalmente. Técnicamente la mantequilla es una emulsión de tipo “agua en aceite”,

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilivre.edu.co Universidad libre Pereira.

obtenida por batido de la nata y que puede contener no menos del 82% de materia grasa, alrededor del 16% de agua y un 2% de otros componentes de la leche.⁴ Tras conocer la composición de este producto es de esperarse que el crecimiento bacteriano se vea favorecido ya que los microorganismos cuentan con un hábitat rica en nutrientes en donde pueden desarrollarse y multiplicarse de manera óptima. Tras observar la morfología macroscópica obtenida en el crecimiento en las cajas de Petri es posible identificar la formación de halos lipolíticos, tras realizar la revisión de la literatura es posible indicar que los microorganismos lipolíticos pueden producir pequeños halos de opacidad, los *clostridium spp* y las especies de *Bacillus* se caracterizan por producir halos grandes de opacidad que se extienden desde el borde del desarrollo; por otra parte los microorganismos fermentadores producen halos pequeños de opacidad.⁵ La Figura 3-A corresponde a los microorganismos aislados de la zona aerobia de la columna y 3-B hace referencia a los

microorganismos aislados de la zona aerobia facultativa.

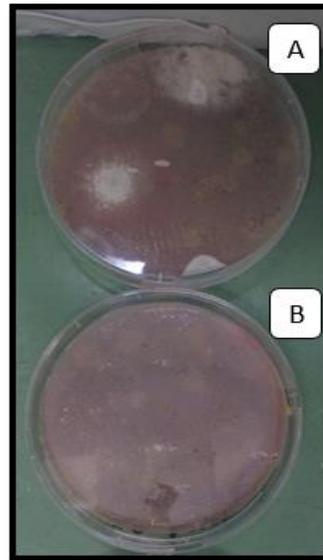


FIG 4: Crecimiento de hongos en agar avena

Fuente: Elaboración propia

Tras analizar la composición de la avena es posible encontrar que esta es un cereal, el cual se caracteriza por su alto contenido en proteínas y fibra insoluble y soluble, llamada betaglucanos.⁶ Tras observar el medio de cultivo posterior a la incubación es evidenciable la formación de hongos, esto puede asociarse al hecho de que estos microorganismos tienen requerimientos similares al resto de los seres vivos para su nutrición, poseen la capacidad de utilizar una

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilibre.edu.co Universidad libre Pereira.

gran variedad de materiales orgánicos, entre ellos se destacan carbohidratos simples, como la glucosa, siendo una fuente de carbono apropiada para la mayoría de los hongos, con base en lo anterior es lógico el hecho de que el medio de agar avena favorezca el crecimiento de hongos ya que proporciona las condiciones requeridas tales como fuente aminoácidos, vitaminas, tiamina, biotina y minerales, razón por la cual puede considerarse un medio complejo.⁷ La figura 4-A corresponde a los microorganismos aislados de la zona aerobia de la columna, los hongos que se pudieron observar macroscópicamente presentaron textura y apariencia algodonosa, razón por la cual fue necesario realizar posteriormente observaciones microscópicas con el fin de identificar diferentes estructuras más específicas. La figura 4-B hace referencia a los microorganismos aislados de la zona aerobia facultativa.

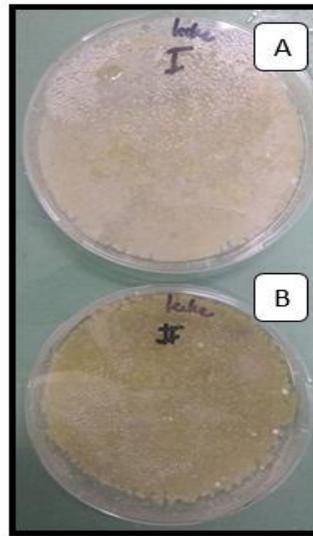


FIG 5: Crecimiento bacteriano en agar leche

Fuente: Elaboración propia

Al evaluar la composición de la leche es posible identificar que esta proporciona nutrientes esenciales, constituyendo una fuente importante de energía alimentaria, tras contener proteínas de alta cantidad de grasas. La leche puede contribuir en la ingestión necesaria de nutrientes como: el calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B12 y ácido pantoténico.⁸ Con lo anterior se puede inferir que el agar leche favoreció el crecimiento microbiano ya que es una fuente rica en diversos nutrientes que son óptimos para garantizar el desarrollo y multiplicación de los diferentes microorganismos,

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilivre.edu.co Universidad libre Pereira.

adicionalmente es posible afirmar que los bacilos son habitantes normales de la leche. La figura 5-A corresponde a los microorganismos aislados de la zona aerobia de la columna y 5-B hace referencia a los microorganismos aislados de la zona aerobia facultativa. Se pudo observar que ambos medios de cultivo se tornaron secos por la evaporación de la leche y la acción de los microorganismos.

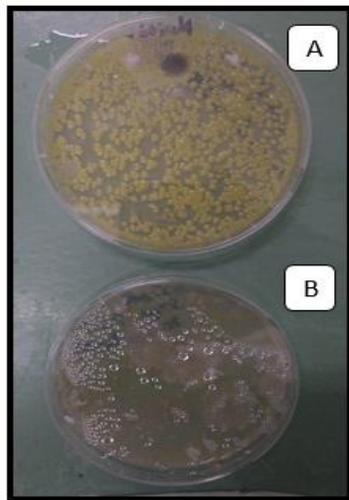


FIG 6: Crecimiento bacteriano en agar almidón

Fuente: Elaboración propia

Tras analizar la composición del almidón, es posible encontrar que se basa en glucosa, además de componentes minoritarios como grasas y minerales, los cuales tienen

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilibre.edu.co Universidad libre Pereira.

un efecto definitivo sobre las propiedades del mismo. El almidón constituye una mezcla de amilosa y amilopectina.¹⁰ Los microorganismos que pudieron haber crecido en este medio tienen la capacidad de hidrolizar el almidón tras utilizarlo como fuente de nutrientes. La Figura 6-A corresponde a los microorganismos aislados de la zona aerobia de la columna y 6-B hace referencia a los microorganismos aislados de la zona aerobia facultativa.

- Morfología microscópica en colonias aisladas:

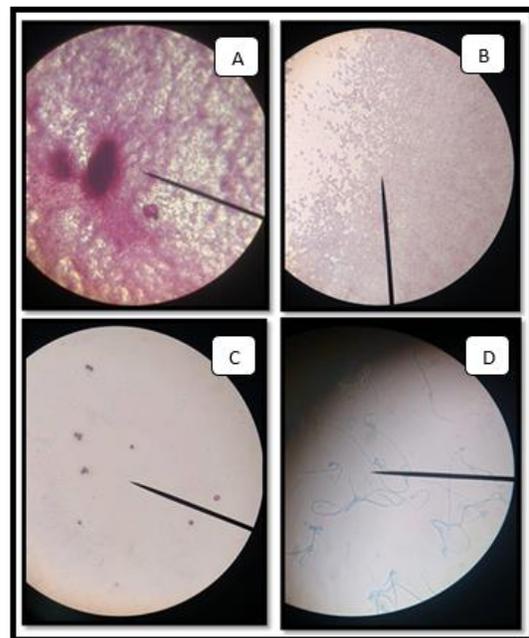


FIG 7: Observaciones microscópicas a partir de los aislamientos de los diferentes medios de cultivo

Fuente: Elaboración propia

Al observar la figura 7-A correspondiente al agar mantequilla fue posible evidenciar la presencia de cocabacilos Gram positivos, en la Figura 7-B que corresponde al agar leche, se observó bacilos Gram positivos, en la Figura 7-C que corresponde al agar almidón se observan *Streptococos* y peptococos Gram negativos. Por otra parte en la Figura 7-D correspondiente al agar avena se observaron estructuras características de un hongo como hifas y levaduras, sin embargo no se identificó específicamente a qué hongo correspondía.

Con base a lo anterior fue posible identificar que el factor común tras evaluar todas las muestras estudiadas, a partir de los diferentes medios de cultivo, en las diferentes zonas de la columna, fue la presencia de cocos y bacilos en su mayoría Gram positivos, sin embargo no se realizaron pruebas bioquímicas confirmatorias que permitieran identificar las especies correspondientes a cada uno de los microorganismos encontrados.



FIG 8: *Strongyloides stercoralis* identificada en la zona aerobia de la columna

Fuente: Elaboración propia

Las larvas encontradas en la zona aerobia corresponden a *Strongyloides stercoralis* Figura 8, el cual es un nematodo capaz de desarrollarse en dos ecosistemas, uno terrestre de vida libre y otro del ser humano. Este produce la estrogiloidiasis, una parasitosis en humanos, pueden ser procedentes de los lodos y del agua del lago utilizado inicialmente en la elaboración de la columna, estos organismos son flagelados, lo que les permite poseer movilidad, esta fue observada microscópicamente.

Finalmente cabe resaltar que la columna no presento la diferenciación de colores asociados a la presencia de diversos microorganismos, tal y como

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilivre.edu.co Universidad libre Pereira.

se muestra en la Figura 1, si no que los colores obtenidos fueron muy oscuros y homogéneos, sin embargo en la zona facultativa se pudieron observar coloraciones difusas que se tornaban rojizas y purpuras como se observa en la Figura 9, lo cual se puede asociar a la presencia de los microorganismos típicos de esta zona, como se mencionan en la parte inicial, es la zona en la que solapan ambos gradientes, el de oxígeno y el de sulfuro de hidrogeno.

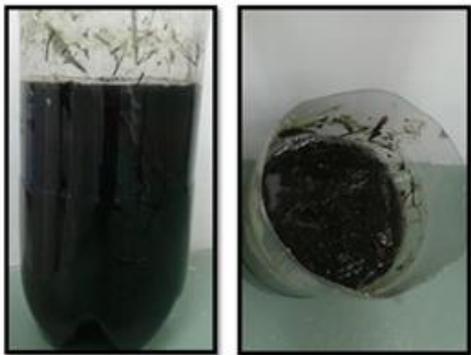


FIG 9: Columna de Winogradsky

Fuente: Elaboración propia

CONCLUSIONES:

La columna de Winogradsky es un método para demostrar como los microorganismos ocupan lugares altamente específicos según sus necesidades de carbono, energía y

sus tolerancias medioambientales, además enseña cómo diferentes microorganismos desarrollan sus ciclos y la interdependencia que llega a existir entre ellos. Esta columna es un sistema completo y autónomo de reciclamiento, mantenido sólo por la energía de la luz.

Se pueden diferenciar tres zonas características en base a su concentración relativa de oxígeno: zona aeróbica, zona microaerófila y zona anaeróbica.

Tras realizar las observaciones macroscópicas fue posible evidenciar crecimiento de bacterias y hongos en los diferentes medios de cultivo, esto se asocia al hecho de que dichos medios contienen diversidad de nutrientes que pueden favorecer el crecimiento de diferentes organismos respectivamente.

Por otra parte las observaciones microscópicas realizadas tras aislar colonias de los medios de cultivo, el factor común indico la presencia de microorganismos de tipo bacilos y cocos, en su mayoría Gram positivos, además de la formación de

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilibre.edu.co Universidad libre Pereira.

estructuras de hongos en el caso del agar avena.

La realización de la columna permitió identificar como los microorganismos ocupan microespacios que son altamente específicos y van en concordancia con sus necesidades que se caracterizan por ser diversas.

REFERENCIAS

- 1) Marcelo A. Sagardoy; María E. Mandolesi. *Biología del suelo, guía de estudio*. Editorial de la Universidad Nacional del Sur (En línea). Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=-Uvg75tgmWoC&pg=PA76&dq=columna+de+winogradsky&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjMx7eK4cvPAhVDFR4KHxVrAc4Q6AEIGjAA#v=onepage&q=columna%20de%20winogradsky&f=false>
- 2) Curtis; Barnes; Schnek; Massarini. *Curtis Biología*. Editorial medica panamericana (En línea). Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=mGadUVpdTLsC&pg=PA470>
- 3) Microinmuno. *La Columna de Winogradsky* (En línea). Disponible en: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBiodiversidad.htm>
- 4) MacFaddin. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica*. Edición medica Panamericana (En línea). Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=FYWSzy7EjR0C&pg=PA260&lpq=PA260&dq=HALOS+LIPOLITICOS&source=bl&ots=RNQMOKKaOt&sig=QvykOkvtzpUopr024qiVwKrN35Y&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiUtKHB5dXPAhUCgx4KHfXJDb4Q6AEIKDAC#v=onepage&q=HALOS%20LIPOLITICOS&f=false>
- 5) Botanical. *Avena* (En línea). Disponible en: <http://www.botanical-online.com/avena.htm>

*Estudiantes de Microbiología. **Docente programa de Microbiología. hectorm.buriticah@unilivre.edu.co Universidad libre Pereira.

