

Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos

**Julio Ricardo Moreno. Marta Fabiana Gorriti.
María Regina Flores. Virginia Helena Albarracín.**

Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205-4000.
San Miguel de Tucumán. Argentina.

Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas LIMLA. Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos PROIMI-CONICET. Av. Belgrano y Pje. Caseros 4000.
San Miguel de Tucumán. Argentina.

julio_m@live.com.ar marta_gorriti@hotmail.com
rflores@proimi.org.ar virginia@proimi.org.ar

Resumen: se integrarán conceptos generales de ecología microbiana que permitan identificar diferentes microorganismos por medio de técnicas dependientes e independientes del cultivo en muestras ambientales de comunidades microbianas extremófilas. Además, dilucidaremos el rol de dichos organismos observando e interpretando el desarrollado del ecosistema que se establece dentro de una Columna de Winogradsky. Además, teniendo en cuenta la importancia de los pigmentos microbianos, realizaremos una caracterización de los mismos y determinaremos su importancia en el desarrollo de microorganismos en ambientes extremos.

Palabras clave: Ecología Microbiana. Columna de Winogradsky. Nitrificación. Metabolismo. Ciclos biogeoquímicos. Fotoautótrofos. Oxidadores. Fermentadores. Reductores. Oxígeno. Pigmentos microbianos. Cromatografía. Fase Móvil. Fase estacionaria. Carotenoides.

INTRODUCCIÓN

Los procariontes muestran una impresionante variedad de procesos metabólicos. Dentro de ellos, las reacciones degradativas o catabólicas, suministran la energía necesaria para las funciones celulares mientras que las reacciones anabólicas o biosintéticas, llevan a cabo la síntesis de componentes celulares a partir de los nutrientes del medio externo

De acuerdo a la fuente a partir de la cual obtengan el carbono, se definen dos grupos:

- **Autótrofos;** organismos que son capaces de obtener todo el carbono que necesitan a partir de fuentes inorgánicas.

- **Heterótrofos**; a los organismos que obtienen el carbono de fuentes orgánicas.

De acuerdo a cómo los organismos produzcan energía (metabolismo energético) se pueden establecer dos grandes categorías:

- **Quimiosintéticos** o **quimiótrofos**; aquellos en que la fuente de energía es un compuesto químico.
- **Quimiorganotrofos** si obtienen energía por oxidación de un compuesto orgánico (glucosa u otros).
- **Quimiolitotrofos**, si obtienen energía a partir de oxidaciones de compuestos inorgánicos (S^0 , NO_2^- , Fe^{2+} , NH_3)
- **Fotosintéticos** o **fotótrofos**; aquellos en que la fuente de energía es la luz.

En el medio ambiente, estos complicados metabolismos bacterianos se encuentran relacionados y contribuyen a generar ecosistemas complejos siendo protagonistas fundamentales de los ciclos biogeoquímicos. Estos metabolismos pueden ser evidenciables y estudiados mediante el empleo de un dispositivo instrumental simple denominado Columna de Winogradsky (Fig. 1). Lleva este nombre por el científico Sergei Nikolaievich Winogradsky, microbiólogo y ecologista ruso quien introdujo el concepto del ciclo de la vida y descubrió el proceso biológico de la nitrificación. Fue uno de los fundadores de la ecología microbiana y de los ciclos biogeoquímicos a finales del siglo XIX y principios de siglo XX.

La columna Winogradsky es un instrumento útil para estudiar las relaciones entre diferentes tipos de microorganismos en comunidades mixtas, y constituye una forma de diferenciar microorganismos con metabolismos energéticos muy variables, además de ser una estupenda práctica para comprobar cómo se establece un ecosistema microbiano, ya que se puede reproducir en el laboratorio, un ecosistema natural correspondiente a un sedimento con contenido orgánico de diferente origen (restos de raíces de plantas, hojarasca etc.). Esta columna es un sistema completo y autónomo de reciclaje, mantenido sólo por la energía lumínica.

La columna aquí descrita se enfoca sobre todo al ciclo del azufre, pero se podría desarrollar igualmente la reproducción de otros ciclos biogeoquímicos equivalentes para nitrógeno, carbono y otros elementos.

La construcción de una Columna de Winogradsky es sencilla; se realiza a partir de un cilindro de vidrio o plástico transparente mediante la adición de sedimento rico en materia orgánica, una fuente de carbono y energía para la cadena trófica microbiana, que bien puede ser tiras de papel de filtro o de papel periódico, una base de sulfato (sulfato de calcio, anhidrita o yeso) y un agente tamponador del pH (carbonato de calcio o fragmentos de piedra caliza), cubierto todo por arena de color claro y agua de la propia fuente de donde se recogió el sedimento o bien agua destilada.

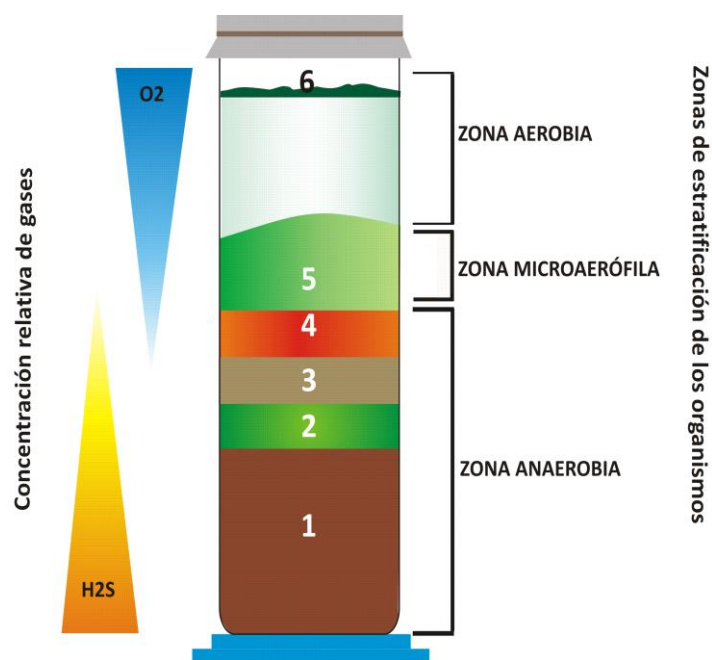


Figura 1. Esquema general de una Columna de Winogradsky indicando sus tres zonas principales con sus diferentes estratos: 1 estrato de los organismos reductores y fermentadores. 2 estrato de Bacterias Verdes del azufre. 3 Estrato de Bacterias Púrpuras del azufre. 4 Estrato de Bacterias Púrpuras no del azufre. 5 Estrato de sulfo-oxidadores aeróbios y 6 estrato de fotótrofos oxigénicos.

A lo largo de la Columna de Winogradsky (Fig. 1) se presentan zonas de estratificación con diversos organismos. En la zona inferior (zona anaerobia) se desarrollan organismos que desempeñan procesos fermentativos produciendo alcohol y ácidos grasos como subproductos de su metabolismo. Estos productos metabólicos son a su vez el sustrato para el desarrollo de bacterias reductoras de sulfato. Como resultado se liberan productos sulfurados que difunden a la zona superior creando un gradiente de sulfuro de hidrógeno ascendente, donde bacterias púrpuras y verdes se estratifican según su tolerancia al sulfuro de hidrógeno. En la zona media (zona microaerófila) se disponen bacterias sulfo-oxidadoras aerobias y bacterias fotosintéticas que utilizan el azufre. Por encima de esta zona pueden desarrollarse aquellas bacterias púrpuras que no utilizan el azufre. En la zona superior (zona aerobia) crecen algas eucariotas y cianobacterias que liberan oxígeno manteniendo aerobia esta zona.

ESTRATIFICACIÓN DE LA COLUMNA DE WINOGRADSKY

Entre cuatro y seis semanas después de su instalación, la columna debe estabilizarse en tres ambientes básicos distintos en los que se desarrollarán comunidades microbianas específicas en función de sus requisitos medioambientales, las cuales pueden identificarse macroscópicamente visualizando una serie de parámetros, tales como producción de gases (en la zona aerobia será oxígeno producto de la fotosíntesis y en la zona anaerobia será metano producto de la metanogénesis o ácido sulfhídrico

producto de los reductores) y la coloración resultado del metabolismo de diferentes organismos (Tabla. 1).

COLOR	MICROORGANISMOS
Verde	Algas y Cianobacterias
Rojo/marrón	Cianobacterias o Tiobacilos
Rojo/Púrpura	Bacterias púrpuras no del azufre
Blanco	Bacterias sulfo-oxidadoras
Rojo/Púrpura	Bacterias púrpuras del azufre
Verde	Bacterias verdes del azufre
Negro	Bacterias sulfo-reductoras o fermentadoras

Tabla 1. Cuadro de identificación de potenciales microorganismos en base a la coloración de los estratos.

Zona anaerobia

Hay dos tipos de organismos que pueden crecer en condiciones anaerobias: los que fermentan la materia orgánica o los que realizan la respiración anaerobia. 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 dióxido de carbono, pero usando una sustancia distinta del oxígeno como aceptor terminal de electrones; algunas bacterias, por ejemplo, utilizan nitratos o iones sulfato en vez del oxígeno. En el nivel más bajo de la columna, en un ambiente con alta concentración de sulfuro de hidrógeno, aparecen varios grupos diferentes de bacterias: en el fondo de la columna, dependiendo del tipo de barro utilizado, puede aparecer una capa de color rosado formada por bacterias púrpura del azufre portadoras de vesículas de gas. Una especie característica es *Amoebobacter*. 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, fermentan la glucosa para obtener la energía que necesitan, produciendo una serie de compuestos orgánicos simples (etanol, ácido acético, etc.) como productos finales de esa fermentación.

Un poco por encima, las bacterias reductoras del azufre, que se visualizan como una profunda capa negra y están representadas por *Desulfovibrio*, pueden utilizar estos subproductos de la fermentación para su respiración anaerobia, usando sulfato, u otras formas parcialmente oxidadas de azufre como el tiosulfato, generando grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno en el proceso. Este sulfuro de hidrógeno reaccionará

con cualquier compuesto férrico presente en el sedimento, produciendo sulfuro ferroso, que da color negro. Es por esto que los sedimentos acuáticos son frecuentemente negros. Sin embargo, no todo el sulfuro de hidrógeno es utilizado, sino que ciertas cantidades 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 sulfuro de hidrógeno se desarrolla una zona de bacterias púrpuras del azufre, como *Chromatium*, caracterizada por su color rojo-púrpura. Estas bacterias del azufre, verdes y púrpuras, producen sus materiales celulares a partir de dióxido de carbono. En gran medida, de manera muy similar a cómo lo hacen las plantas aunque, sin embargo, no producen oxígeno durante la fotosíntesis porque no utilizan agua como elemento reductor sino sulfuro de hidrógeno. Un poco por encima de esta zona nos encontramos una franja de bacterias púrpuras no del azufre, como *Rhodospirillum* y *Rhodopseudomonas*, que adquiere un color rojo-anaranjado. Su mayor o menor abundancia dependerá de la cantidad de sulfuro de hidrógeno que se haya producido y de la cantidad que, no utilizada por otros organismos, difunda hacia arriba, ya que su presencia inhibe a estas bacterias. Son anaerobios fotoorganótrofos que sólo pueden realizar la fotosíntesis en presencia de una fuente de carbono orgánico.

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 habitualmente en los hábitats acuáticos ricos en materia orgánica (estanques poco profundos, arroyos contaminados, etc.). Suelen ser flagelados, lo que les permite moverse y establecerse en nuevas áreas. Puede desarrollarse también microorganismos fototróficos 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.

Sin embargo, también aquí llegarán por difusión, procedentes del barro de zonas inferiores, ciertas cantidades de H_2S que será oxidado a sulfato por bacterias que oxidan azufre (como *Beggiatoa* y *Thiobacillus*). Estas bacterias obtienen energía oxidando el sulfuro de hidrógeno a azufre elemental y sintetizan su propia materia orgánica a partir de dióxido de carbono. Por esto se les llama organismos quimioautótrofos.

En las zonas superiores pueden crecer también cianobacterias fotosintéticas, lo que se visualizaría como 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. Además, en esta

zona podemos encontrar algas eucariotas, como clorofitas y diatomeas, las cuales junto a las cianobacterias mantienen elevada la concentración de oxígeno en la parte superior de la columna.

PIGMENTOS MICROBIANOS

Los carotenoides y las clorofilas son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la Naturaleza y en los organismos vivos. Específicamente, a los carotenoides se los encuentra en todo el Reino Vegetal, tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos (siendo responsables del color amarillo, naranja y rojo de la mayoría de frutos), en bacterias, algas, hongos y animales. Estos últimos no son capaces de sintetizarlos y los incorporan a través de la dieta. Se estima que la producción anual en la Naturaleza es de 108 toneladas, y en la actualidad se conocen cerca de 700 carotenoides.

Propiedades físico-químicas de los carotenoides

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranyl-geranylpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno). Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos solo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el β -caroteno, el licopeno, etc.), mientras que las xantófilas contienen además oxígeno (por ejemplo la luteína).

La presencia del extenso sistema de dobles enlaces conjugados de la cadena polienoica de los carotenoides conforma un cromóforo (parte de la estructura responsable de la absorción de luz visible y por tanto del color del compuesto) cuya capacidad de absorción de luz da lugar a los llamativos y característicos colores de estos pigmentos. El número de dobles enlaces conjugados y la presencia de diferentes grupos funcionales determinará en última instancia las características espectroscópicas propias de cada pigmento.

Cuando se extraen para su estudio, se los debe manejar con mucha precaución para evitar su degradación ya que debido a la alta conjugación de enlaces dobles presentes en sus moléculas se descomponen por efecto de la luz, la temperatura y el aire. La luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide (por ejemplo, isomerismo *cis* y *trans*) y es un factor a considerar al momento de realizar su extracción. El calor favorece reacciones térmicas de degradación mientras que el aire debido al oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidroxilos y peróxidos, entre otros. Por estas razones la extracción de carotenoides se debe realizar preferentemente en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, y en ausencia de

oxígeno (por ejemplo con una atmósfera artificial de nitrógeno). Además se debe realizar lo más rápido posible, y a partir de tejidos frescos, para evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos.

Debido a que los carotenoides en su mayoría son solubles en solventes apolares como éter etílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo, entre otros; y a que se deben extraer de cultivos frescos, los cuales presentan un alto contenido de agua la cual dificulta una extracción eficiente, es conveniente eliminar dicho agua. Un procedimiento recomendable es la liofilización, la cual resulta ventajosa porque se realiza a baja temperatura y al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y presencia de aire.

Una vez obtenido el extracto de carotenoides, estos se pueden separar y analizar por cromatografía en capa fina, en papel o en columna. El método más usado es la cromatografía en capa fina con varias clases de fases estacionarias que incluyen: óxido de magnesio activado, sílica gel, hidróxido de calcio y fosfato de magnesio entre otros.

Cromatografía

Se denomina cromatografía a un conjunto de técnicas de separación basadas en la competencia entre dos fases, una fija y otra móvil. La muestra aplicada en la fase estacionaria es adsorbida en la superficie del material por la acción de fuerzas electrostáticas (fuerzas de Van der Waals, puentes de Hidrógeno, efectos inductivos, etc.) para su posterior liberación de acuerdo a la constante de afinidad de los constituyentes de la muestra por la fase móvil.

La cromatografía (*chromo*= color y *graphie*=escritura) fue inventada a principios del siglo XX por el botánico ruso Mikhail Tswett. Unas décadas más tarde, Ismailov y Scaiber describieron el uso de la capa fina de alumina extendida para caracterizar extractos vegetales mientras que en 1956, Egon Stahl le dió el nombre de cromatografía de capa fina, estandarizó los procedimientos, equipos y adsorbentes dando un auge a esta técnica simple, económica y eficiente.

Terminología

- Fase Estacionaria (Adsorbente)

Es una de las dos fases que forman un sistema cromatográfico. Puede ser un sólido, un gel o un líquido. Si es un líquido, puede estar distribuido en un sólido, el cual puede o no contribuir al proceso de separación. El líquido puede también estar químicamente unido al sólido (Fase Ligada) o inmovilizado sobre él (Fase Inmovilizada). Los adsorbentes más utilizados son:

- ✓ Sílica gel (se utiliza en el 80% de las separaciones).
- ✓ Óxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra ó básica).
- ✓ Tierra Silíceá ó *Kieselguhr*.

- ✓ Celulosa (Nativa o micro-cristalina).
- ✓ Poliamidas.

Estos adsorbentes varían en tamaño de partícula, diámetro del poro, homogeneidad y pureza.

- Fase Móvil (eluyente)

Es el fluido (solvente o mezcla de solventes) que se filtra a través o a lo largo del lecho estacionario (fase estacionaria), en una dirección definida. Puede ser un líquido (Cromatografía Líquida), un gas (Cromatografía de Gases) o un fluido supercrítico (Cromatografía con Fluido Supercrítico). Cuando se utiliza un líquido como fase móvil mediante una serie eluotrópica se escoge la mejor combinación de solventes miscibles para una buena separación cromatográfica de una muestra en sus componentes. Serie eluotrópica de solventes:

Hidrocarburos «ligeros» (éter de petróleo, hexano, heptano. etc.)

Ciclohexano

Tetracloruro de carbono

Tricloroetileno

Tolueno

Benceno

Diclorometano

Cloroformo

Eter etílico

Acetato de etilo

Acetona

n-Propanol

Etanol

Metanol

Agua

- Muestra

Mezcla consistente en cierto número de componentes, cuya separación se pretende en el lecho cromatográfico al ser arrastrados o eluidos por la fase móvil.

- Componentes de la muestra

Los constituyentes químicamente puros de la muestra. Pueden no ser retenidos por la fase estacionaria (es decir, no retardados), retenidos parcialmente (es decir, eluidos a tiempos diferentes) o retenidos permanentemente.

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Es la técnica de separación en la que la fase estacionaria está sobre un plano formando una capa de partículas sólidas extendida sobre un soporte, tal como una placa de vidrio o aluminio (Thin Layer Chromatography, TLC), la muestra es aplicada en puntos o en banda, para posteriormente ser eluída dentro de un tanque cromatográfico como se ilustra en la figura 2.

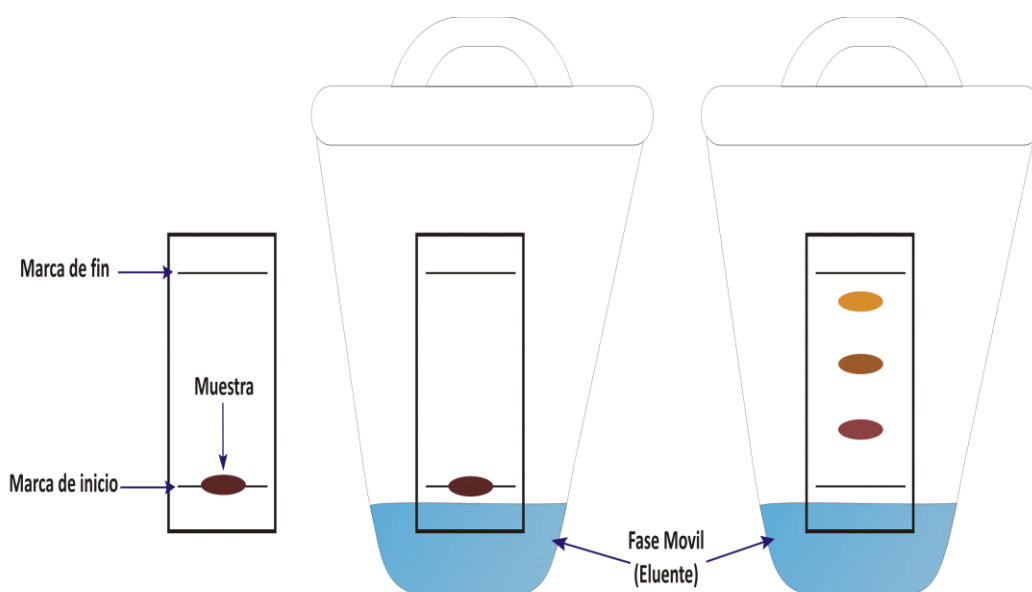


Figura 2. Diagrama de la cromatografía en capa fina.

Si los componentes de la muestra (manchas) no son coloreados, se requiere de métodos que nos permitan visualizarlos componente presentes (Lobasso, S. *et al* 2008). Este procedimiento también se conoce como “revelado de la placa”.

Métodos de revelado de placa

- **Método químico** (por inmersión o rociado de reactivos colorantes). Se obtienen derivados coloreados o fluorescentes de los componentes de la muestra.
- **Método físico** (ópticos). Generalmente se utiliza mediante la radiación con luz UV a la placa cromatográfica a 254nm y/o 365nm.

La cromatografía en capa fina como método cualitativo y cuantitativo, siempre requiere contar con un estándar de referencia para comparar su valor de factor de retardo (R_f) y el color de la mancha del estándar al ser revelada con agentes químicos, con los datos experimentales obtenidos. El factor de retardo (R_f) es un valor relativo para cada sustancia y depende de las condiciones cromatográficas con que se haya trabajado (fase móvil, fase estacionaria y el tiempo de saturación). Se define como el

cociente entre la distancia recorrida por el centro de la mancha y la distancia recorrida simultáneamente por la fase móvil como se ilustra en la figura 3, donde R_f para la mancha 1 = a / X , R_f para la mancha 2 = b / X y R_f para la mancha 3 = c / X . Los valores de R_f siempre son menores o iguales a uno ($R_f \leq 1$).

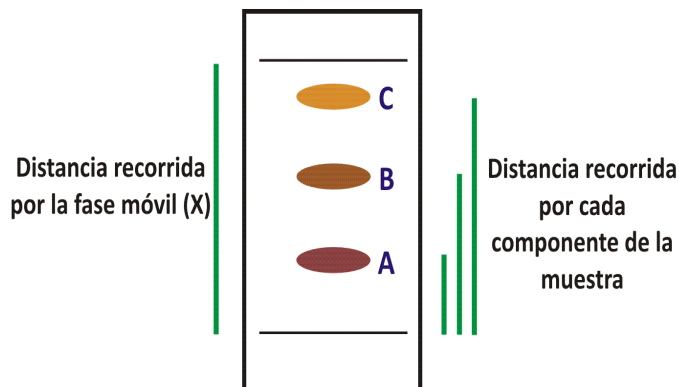


Figura 3. Factor de retardo de una muestra.

La cromatografía de capa fina, en la separación de sustancias lipófilas, es mucho más ventajosa que la cromatografía de papel, cuyo principio es el mismo (D'Souza S.E., *et al* 1997). Se empleó este método también, unos años más tarde para la separación de combinaciones hidrófilas y en algunos casos fue comparado sistemáticamente con la cromatografía de papel, demostrándose que empleando sustancias apropiadas, es tan buena o mejor que aquella. Las ventajas más importantes de la cromatografía de capa fina son: excelente nitidez, alta sensibilidad, rapidez en la obtención del producto final. Ciertas mezclas, que sobre papel necesitan muchas horas para separarse, se pueden discriminar sobre una capa apropiada en pocos minutos.

En caso de que las diferencias de las velocidades de desplazamiento sean pequeñas, se aumenta el trayecto o otras técnicas de CCF que permiten una buena separación. El trayecto debe ser lo más corto posible, pues de lo contrario se producirá efecto de difusión, disminuyendo la sensibilidad.

Caracterización espectral

Como se anotó anteriormente, aunque es relativamente fácil identificar la mayoría de los carotenoides por comparación de muestras y estándares mediante la CCF y la CLAE, cuando se tienen carotenoides que no es posible identificar por tales métodos, es necesario recurrir a los métodos espectrales como UV-visible, IR (Infrarrojo), EM (espectrometría de masa) y RMN (resonancia magnética nuclear). El espectro visible de los carotenoides es bastante característico en el rango de 400 a 500 nm. En el trabajo de Asker y col., (2002), se observa un máximo alrededor de 450 nm y generalmente se aprecian dos máximos u hombros a cada lado, (Figura 4).

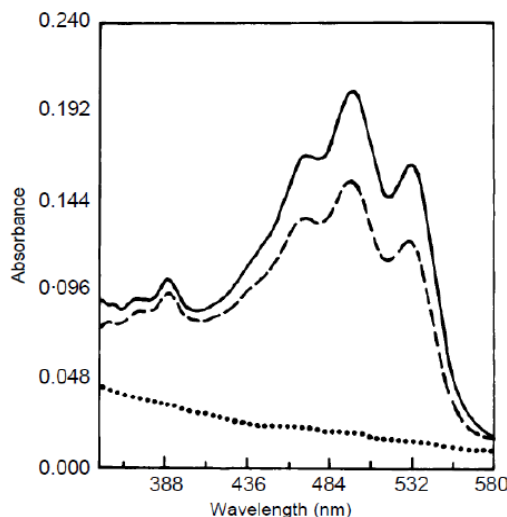


Figura 4. Espectro de absorción de un extracto de *Haloferax alexandrinus*. Detallado en el trabajo de Asker D. *et al*, 2002.

El espectro IR generalmente no es muy útil para la caracterización de la mayoría de carotenoides, sin embargo puede servir para el reconocimiento de carotenoides raros, pues proporciona información sobre la presencia de otros grupos funcionales como grupos carbonilo y enlaces triples C-C. Debido a la baja volatilidad de los carotenoides, sus espectros de masas de impacto electrónico son de difícil interpretación y no proporcionan el ion molecular, por lo cual prácticamente no se usan. Sin embargo, gracias al desarrollo de las técnicas de ionización suave, se obtiene información estructural muy valiosa. Como en la gran mayoría de metabolitos secundarios, en lo correspondiente a la caracterización química, la mejor técnica para la elucidación estructural de los carotenos es la RMN en sus diferentes modalidades mono- y bidimensionales.

ACTIVIDADES

- 1- Diseño y construcción de la Columna de Winogradsky.
- 2- Observación e interpretación de Columnas de Winogradsky previamente realizadas.
- 3- Identificación fenotípica preliminar de la diversidad microbiana presente en la Columna de Winogradsky.
- 4- Extracción, separación y caracterización de pigmentos microbianos.

DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LA COLUMNA DE WINOGRADSKY

Objetivo

Establecer el ecosistema microbiano de sedimentos autóctonos y de ambientes extremos (Lagunas de Altura Puno-Andinas LAPAs) a partir de la construcción de una columna de Winogradsky.

Materiales

Sedimento superficial y subsuperficial de una laguna de altura Puno-Andina.

Sales complementarias al sedimento (CaCO_3 , CaSO_4 y CaHPO_4).

Probetas de vidrio de 500 ml.

Cantidad necesaria de agua desionizada y agua de LAPAs.

Papel de filtro.

Papel de aluminio.

Procedimiento

- El inóculo se prepara mezclando el sedimento con 4 g de cada una de las siguientes sales: CaCO_3 , CaSO_4 y CaHPO_4 .
- Esta preparación se coloca en una probeta de vidrio de 500 ml, se agrega agua desionizada hasta aproximadamente 3 cm del borde de la probeta y se deja decantar esta suspensión durante dos o tres días.
- Finalmente, se agrega papel de filtro finamente picado hasta cubrir casi totalmente la superficie del sedimento, teniendo cuidado de que no queden burbujas de aire atrapadas en la columna.
- Recubrir la columna con papel de aluminio para protegerla de la luz, colocarla en un cuarto a 28-30°C (se puede disminuir la temperatura de incubación, pero se alarga el experimento) y dejarla en reposo durante una semana. Durante este período comienza a aparecer el primer grupo de microorganismos, que generan un flujo ascendente de H_2S y CO_2 (respiración anaeróbica heterotrófica). Este flujo ascendente originará un gradiente positivo de O_2 hacia la superficie.
- Luego de una semana, se comienza a iluminar la columna con luz solar o luz artificial de 60 Watts. Se recomienda cubrir la boca de la columna para evitar tanto el depósito de polvo como la evaporación de agua.

- Se debe agregar agua periódicamente para mantener el nivel inicial procediendo con mucho cuidado a fin de no modificar los distintos niveles de flujos de los gases y de no introducir aire dentro de la columna.
- A fin de seguir el proceso completo desde el principio, se deben realizar descripciones macroscópicas y observaciones microscópicas de muestras de agua a diferentes alturas del cilindro.

OBSERVACIÓN E INTERPRETACIÓN DE COLUMNAS DE WINOGRADSKY

Objetivo

Lograr capacidad de reconocimiento e interpretación de los diferentes estratos de la Columna de agua en base a su microbiota colonizadora y sus interrelaciones.

Materiales

Columnas de Winogradsky previamente realizadas.

Cuadro de identificación de potenciales microorganismos en base a la coloración de los estratos (Tabla. 1).

Procedimiento

- Quitar cuidadosamente el papel de aluminio que envuelve las columnas, evitando agitar el agua.
- Asignar un código de identificación de las columnas, y describir lo observado en el cuaderno de anotaciones teniendo en cuenta los siguientes parámetros: número de estratos observados, consistencia de los mismos y finalmente, empleando la Tabla 1, diferencie cuales de los estratos integran las tres zonas principales de las columnas.

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA PRELIMAR DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA

Objetivo

Conocer los grupos taxonómicos presentes en la comunidad microbiana que integra la columna de Winogradsky.

Materiales

Muestras de cada estrato de la columna.

Portaobjetos, cubreobjetos, microscopio óptico.

Colorantes citológicos (Azul de metileno, Cristal violeta Eritrosina, Fucsina fenicada, Lugol, Nigrosina, Rosa de Bengala, Safranina y Verde de malaquita).

Procedimiento

- Realizar preparados en fresco de cada estrato de la columna, observar al microscopio y realizar descripciones generales; en caso de ser necesario realice tinciones simples de contraste.
- Teniendo en cuenta los grupos identificados macroscópicamente en la actividad número 2, a modo de complemento realice las siguientes tinciones diferenciales previamente estudiadas: Tinción de Gram, Ziehl-Neelsen, determinación de esporas y presencia de capsula.
- Finalmente, realice un informe con los resultados obtenidos.

EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PIGMENTOS MICROBIANOS

Materiales

Cultivo celular de una bacteria aislada de la columna de Winogradsky.

Centrífuga.

Micropipetas.

Papel Whatman.

Placas de silica gel.

Solventes (Acetona, cloroformo, ácido acético, metanol)

Procedimiento

- **Extracción:** al pellet obtenido se adiciona un volumen suficiente de acetona (también puede usarse metanol o cloroformo) en una campana de extracción para que el solvente extraiga los pigmentos carotenoides. Se centrifuga a 8000 rpm 5 min. El residuo sólido se puede re extraer varias veces con el fin de

obtener el mayor rendimiento posible. El sobrenadante con los pigmentos se trasvasa a un tubo nuevo limpio y se concentra de ser necesario a un volumen más pequeño (500 μ L) mediante aplicación de calor suave (37-40 °C) y vacío. El extracto concentrado de carotenoides se tapa y se guarda para protegerlo de la luz, la humedad, el calor y el aire.

- **Selección de fase móvil:** el extracto de carotenoides se analizará por cromatografía en papel, con una serie eluotrópica que se preparara en el laboratorio con metanol-cloroformo (7:93) y cloroformo-ácido acético 90%-metanol (30:20:4) Se dispone de una tira de papel whatman nº3 (fase estacionaria) en la que se dibuja con lápiz una línea a 1-2 cm de uno de sus extremos. Sobre el centro de esta línea se deposita una alícuota (20 μ L) del sobrenadante pigmentado con una micropipeta. La aplicación se hace con intervalos, esperamos a que se seque y aplicamos en el mismo punto de aplicación que la anterior, repitiendo la operación de forma que se forme una mancha no mayor de unos 5 mm de diámetro. Se introduce con cuidado la tira de papel con la muestra en un tubo de ensayo que contiene 2 ml de la fase móvil. El extremo del papel que ha de quedar más próximo a la fase móvil es el que tiene la muestra. Esta no puede quedar sumergida en la fase móvil. Se deja durante unos 30 minutos en la oscuridad. Al cabo de este tiempo se saca la tira de papel del tubo, se seca y se analizan los resultados.
- **Fraccionamiento cromatográfico y análisis espectral:** Con el mejor eluente seleccionado previamente proceder a realizar el fraccionamiento a escala mayor del extracto en placas de silica gel del mismo modo en el que se realizó en papel. Una vez aplicada y secada la solución de sustancias sobre el origen, se coloca la placa en la cámara separadora que contiene el eluente hasta una altura de 0,5-1 cm, previamente saturada. Antes de introducirla se marcan las líneas de origen. Se marca el frente del eluente inmediatamente después de haber sacado la placa de la cámara y se secan los cromatogramas a temperatura ambiente o con un secador eléctrico.

BIBLIOGRAFÍA

- Asker D., Awad T., Ohta Y., 2002. *Lipids of Haloferax alexandrinus Strain TMT: an Extremely Halophilic Canthaxanthin-Producing Archeon*. Journal Bioscience Bioengineering. 93: 37-43.
- D'Souza, S.E., Altekar, W., D'Souza, S.F. 1997. *Adaptive response of Haloferax mediterranei to low concentrations of NaCl (< 20%) in growth medium*. Arch Microbial 168: 68-71.
- Lobasso, S., Lopalco, P., Mascolo, G., Corcelli, A. 2008. *Lipids of the ultra-thin square halophilic archeon Haloquadratum walsbyi*. Archaea 2: 177-183.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Atlas, R. y Bartha, R. 2001. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4° Edición. Ed. Addison Wesley, Madrid. 677p.
- Flores, M.R., Ordoñez, O.F. & Farías, M.E. 2009. *Isolation of UV-B resistant bacteria from two Andean wetlands (4,400 m asl) with saline and non-saline conditions*. J Gen Appl Microbiol 55: 447-58.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker J. 1999. *La Herencia de Winogradsky*. En Brock: *Biología de los Microorganismos*. 8° Edición. Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. 1064p.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker J. 2004. Brock: *Biología de los Microorganismos*. 10° Edición. Ed. Pearson Educación., Madrid. 1011p.
- Moliné, M., Flores, M.R., Libkind, D., Diéguez, M.D.C., Farías, M.E. & Van Broock, M. 2010. *Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast Rhodotorula mucilaginosa: the role of torularhodin*. Photochem Photobio Sci. 9(8): 1145-51.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 2002. *Microbiology*. 5th Edn. McGraw-Hill. London. 950pp
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9° Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 988p.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquía, Colombia.

<http://farmacia.udea.edu.co>

Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas, LIMLA-CONICET, Argentina.

<http://limla.com.ar>

Recibido: 15 julio 2012.

Aceptado: 4 octubre 2012.