

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DE LA QUEBRADA EL MUÑA EMPLEANDO COLUMNAS DE WINOGRADSKY

Autores: Shirley Xiomara Martínez Vanegas¹ – xiomaramv08@gmail.com
Juan Felipe Moyano Fonseca² – juanfelipe_mf@live.com

Docente asesor: Lena Carolina Echeverry Prieto, MSc

Semillero de Investigación: KAIZEN-UD

RESUMEN

La columna de Winogradsky (CW) es un método para evaluar diversidad microbiana mediante variaciones colorimétricas, producto de las reacciones bioquímicas de bacterias involucradas en ciclos geoquímicos. Este estudio tuvo como objetivo la evaluación preliminar de la diversidad microbiana en la quebrada El Muña (San Francisco, Cundinamarca), empleando Columnas de Winogradsky, para recrear artificialmente un ecosistema microbiano del lugar variando sustratos para enriquecer grupos microbianos diferentes. Esto servirá como base en el desarrollo de investigaciones en ecología microbiana. Se realizaron seis CW (cinco tratamientos y un control) con lodo y agua de la quebrada El Muña, a cada columna tratamien-

to, se le modificó la fuente de carbono, azufre y hierro. Las columnas se mantuvieron por 27 semanas en exposición parcial a luz natural y se registraron los cambios en las semanas cero, cuatro y veintisiete.

Se determinó en la zona de estudio una alta concentración de bacterias sulfúreas y quimioheterótrofas asociadas a la presencia de sulfatos y metales pesados, conforme se desarrollaron las CW, esto permite relacionar las condiciones del lugar con la diversidad microbiana allí presente, por consiguiente, dichos organismos son de interés ambiental porque pueden ser empleados como posibles agentes biorremediadores en zonas contaminadas con sulfatos y metales pesados.

PALABRAS CLAVES

¹Ingeniería Ambiental.

²Ingeniería Ambiental

Diversidad microbiana, columnas de Winogradsky, ciclos biogeoquímicos, quebrada El Muña.

ABSTRACT

The Winogradsky column (WC) is a method to evaluate microbial diversity through colorimetric variations; these appear as a product of the biochemical reactions of bacteria involved in geochemical cycles. This study aimed at the preliminary assessment of microbial diversity in El Muña ravine (San Francisco, Cundinamarca), using WC to artificially recreate a microbial ecosystem of the site by varying substrates to promote the growth of different microbial groups. This may be used as a base for the development of researches in microbial ecology. Six WC (five treatments and one control) were performed with mud and water from El Muña ravine, in each treatment column was modified the source of carbon, sulfur and iron. The columns were kept for 27 weeks in partial exposure to natural light and changes in zero, four and twenty-seven weeks were recorded. The study area had a high concentration of Sul-

phur bacteria and chemoheterotrophs associated with the presence of sulphates and heavy metals, this allows to relate the conditions of this place using the analysis of the microbial diversity in there, therefore, these organisms have an environmental interest because they can be used as potential bioremediatory in areas contaminated with sulphates and heavy metals.

KEYWORDS

Microbial diversity, Winogradsky columns, biochemical cycles, El Muña ravine.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos del suelo contribuyen en la sustentabilidad de los ecosistemas por ser los principales agentes del ciclado de nutrientes regulando la dinámica de la materia orgánica, el secuestro de carbono, la estructuración, retención de agua, entre otros (Correa, 2013), siendo intermediarios entre componentes bióticos y abióticos. Con su metabolismo son capaces de incorporar elementos minerales de los constituyentes del

suelo, cuyos productos tienen una afectación directa en los ciclos biogeoquímicos (Gadd, 2010), los cuales se ven alterados por actividades antrópicas como la agricultura, emisiones industriales, entre otras.

El estudio de la diversidad microbiana permite realizar un diagnóstico preliminar de las condiciones del suelo porque la ausencia o presencia de determinados componentes limita o favorece el desarrollo de microorganismos, estableciéndose comunidades bacterianas específicas en función de sus requerimientos nutricionales; estas pueden identificarse macroscópicamente empleando CW, al evaluar el desarrollo de franjas colorimétricas, resultado del metabolismo microbiano y del ciclo geoquímico en el que intervienen. Este modelo artificial representa un medio de cultivo enriquecido bajo condiciones controladas, utilizado para estudiar el crecimiento de comunidades microbianas, sucesiones y las interacciones con los ciclos geoquímicos, como la incorporación de sustancias contaminantes a rutas metabólicas (Babcsányi, Meite y Imfeld, 2017).

La vereda Muña (San Francisco, Cundinamarca) se caracteriza por tener suelos clases III, IV, VI y VII, que presentan limitaciones para la explotación agropecuaria, por esto principalmente se destinan para conservación (Betancourt y Torres, 2016), sin embargo, mediante una visita realizada al lugar, se encontró que el territorio presenta problemáticas asociadas a actividades avícolas, inadecuado manejo y disposición de residuos sólidos y líquidos a cuerpos de agua y en campo abierto.

El objetivo del presente estudio fue la evaluación preliminar de la diversidad microbiana de la quebrada El Muña, empleando CW, modificando las fuentes nutricionales para conocer los gremios microbianos predominantes que se han adaptado a las condiciones actuales de la quebrada, con mira a ser empleados en investigaciones futuras como posibles candidatos para procesos de biorremediación, teniendo presente que no se han realizado estudios así en este lugar.

MÉTODOS

Se realizó la construcción de cinco CW con diferentes fuentes nutricionales y una columna control. Se mantuvieron por 27 semanas con exposición parcial a luz solar y se registraron los cambios macroscópicos en las semanas cero, cuatro y veintisiete.

Preparación de columnas:

El agua y el suelo utilizados para construir las columnas se tomaron de la quebrada El Muña (San Francisco, Cundinamarca), en las coordenadas 4° 59' 42.21'' de latitud norte y 74° 17' 21.89'' de longitud occidental a una altura de 1508 m.s.n.m.

Las CW se elaboraron en 6 botellas plásticas de 600 mL previamente lavadas para retirar algún contaminante, a las cuales se les cortó la parte angosta y se rotularon así: (I) control, (II) carbono, (III) azufre, (IV) hierro, (V) carbono y azufre, (VI) hierro, carbono y azufre. Se tomaron del lugar de estudio 2L de agua y 3L de lodo. En la CW control se depositó 450mL de lodo sin retirarle o modificarle su composición

y 100 mL de agua de la quebrada.

Para las CW tratamiento primero se retiró del lodo residuos grandes -como rocas y paños- y en cada columna se depositó 450 mL de lodo con sus respectivas variaciones. Los tratamientos se modificaron así: (a) Columna (II): 250 g de papel periódico triturado -sin tinta-, (b) Columna (III): una yema cruda de huevo de gallina, (c) Columna (IV): tres puntillas de hierro, (d) Columna (V): los mismos materiales de las columnas (II) y (III) y, la Columna (VI): los mismos elementos de las columnas (IV) y (V).

Se mezclaron los ingredientes adicionados con el lodo, en caso de ser necesario se adicionó agua del mismo lugar de estudio para que la mezcla tuviera la misma consistencia del lodo de la CW control. Se golpeó sobre una superficie la base de la columna para retirar aire y finalmente se agregó a cada CW 100mL de agua recolectada en la quebrada para cubrir el lodo.

En todas las CW se dejó un espacio de 2cm entre el borde de la columna y el nivel del

agua. Se cubrió la parte superior de cada CW con papel plástico transparente y se colocaron en una ventana.

Bitácora de las columnas de Winogradsky:

Se realizó el registro fotográfico de cada CW en las semanas 0, 4 y 27 y en una bitácora se anotó: fecha de cada revisión, los cambios observados en cuanto a color y turbidez en el lado

de la columna que recibía luz natural directa (zona A) y el lado que no recibía luz natural directa (zona B).

RESULTADOS

A continuación, se presenta el registro fotográfico de las CW control y tratamientos evaluadas.

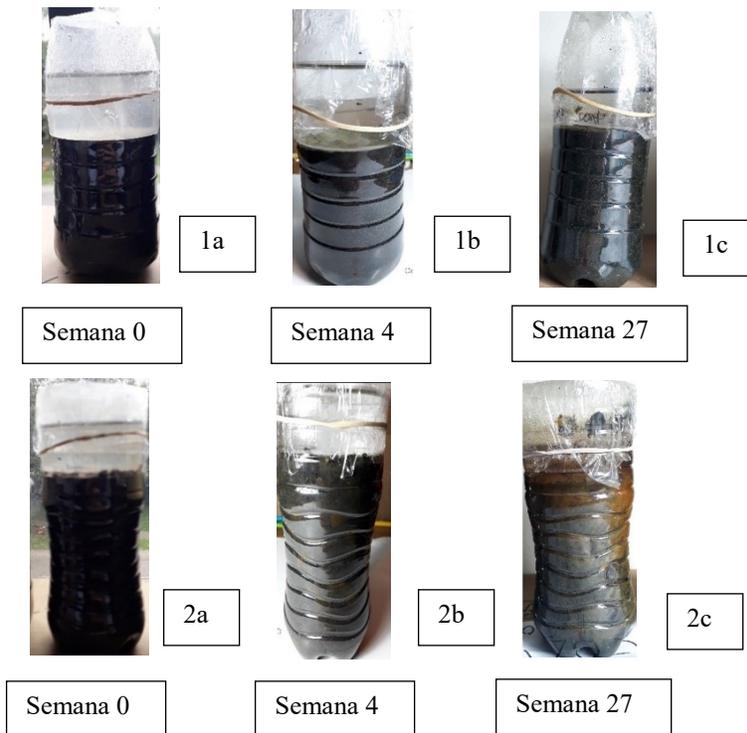


Figura 1. Evolución macroscópica de las Columnas de Winogradsky I y II

Fuente: Autores



Ilustración 1. Evolución macroscópica de las Columnas de Winogradsky III y IV. **Fuente:** Autores

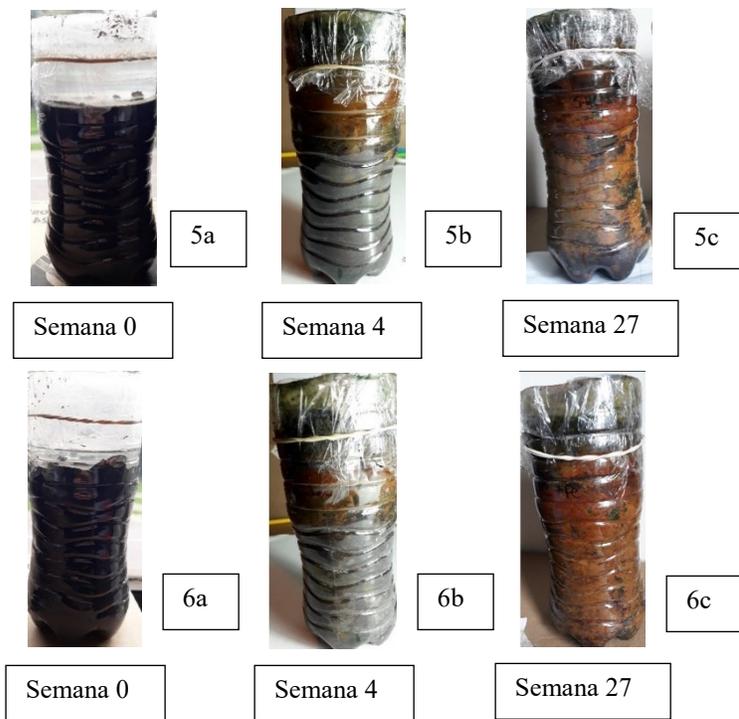


Ilustración 2. Evolución macroscópica de las Columnas de Winogradsky V y VI. **Fuente:** Autores

En la semana cero se distinguía en todas las CW dos capas: (i) una sólida de suelo oscura y (ii) una líquida transparente, éstas fueron variando a través del tiempo, ver figuras 1 – 6 parte a.

En la semana cuatro, la columna (I) presentó en la superficie de la fase sólida un color verde tenue y en la fase líquida no hubo cambios significativos (figura 1). Las columnas (II), (III), (IV), (V) y (VI) presentaron coloraciones verdes, amarillas y naranjas, con mayor intensidad del color en la zona A (figuras 2b, 3b, 4b, 5b y 6b). Las columnas (III), (V) y (VI) presentaron una tonalidad vino tinto, con mayor intensidad en la zona B. Predominando las tonalidades amarilla y naranja en estas columnas (figuras 3b, 5b y 6b). En la columna (IV) se evidenciaron ligeras tonalidades amarillas y en la columna (II) una tonalidad naranja fraccionada en el lodo, siendo más intensas en la zona B (figuras 2b y 4b).

En la semana 27, las coloraciones naranjas y amarillas adquirieron mayor intensidad en la

zona A de las columnas (V) y (VI) y en la zona B presentaron mayor concentración de manchas vino tinto y verdes (figuras 5c y 6c). En la columna (III) se formó una estratificación microbiana muy evidente en la zona A, observándose las mismas franjas colorimétricas reportadas en la semana cuatro con mayor intensidad, a excepción de la franja vino tinto que viró a color negro (figura 3c).

DISCUSIÓN

La CW permite evaluar el metabolismo de los microorganismos para identificar ecosistemas microbianos, su composición, como las actividades metabólicas que se llevan allí por este tipo de organismos. Su desarrollo puede limitarse por la intensidad de la luz, presencia de compuestos azufrados y disponibilidad de oxígeno (Abbasian, Lockington, Mallavarapu y Naidu, 2015). Por consiguiente, la capacidad metabólica microbiana es el resultado de las reacciones catalizadas según la composición química del sistema suelo/agua, por tanto, cada especie prolifera en el ambiente según las condiciones y nu-

trientes ideales estableciendo comunidades claramente visibles y diferenciables según el color desarrollado en el microecosistema. Por esto fue posible evaluar el desarrollo en las CW identificando las coloraciones porque en las columnas tratamiento se agregaron las sustancias adicionadas en las CW tratamiento actuaron como fuente de carbono y/o como aceptor o donador de electrones en las diferentes reacciones metabólicas microbianas.

En todas las columnas se desarrollaron microorganismos fotoautótrofos aerobios, formando tonalidades verdes en la zona superior del sedimento y del agua, estos microorganismos generan oxígeno y mantienen la zona óxica de las columnas al realizar fotosíntesis aerobia (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, y Stahl, 2015).

En las columnas (III), (V) y (VI) se determinó la presencia de bacterias púrpuras del azufre, ya que según Rundell et al., (2014) son las responsables de zonas de color rojo, violeta o vino tinto en las CW, particularmente en la parte superior media, como se observa en las figuras

3, 5 y 6. Las coloraciones son el resultado metabólico cuando las bacterias púrpuras del azufre utilizan H_2S u otros compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones en la fotosíntesis anoxigénica, por esto la zona A tenía esta coloración. El H_2S proviene de la respiración anaerobia de sulfatos que ocurre en las zonas profundas de la columna gracias a la provisión de lipovitulina presente en la yema de huevo, que actúa como precursor de compuestos azufrados (Ruiz, 1994). Las coloraciones verdes en la zona anaerobia de las columnas se asocian a bacterias verdes del azufre, estas son fotosintéticas anoxigénicas y obtienen energía a partir de la luz pero no producen oxígeno y necesitan azufre reducido como fuente reductora (Curtis, Barnes, Schnek, y Massari, 2007). En la zona B de las columnas (III), (V) y (VI) se presentaron las mismas coloraciones mencionadas para la zona A. Finalmente, la coloración negra en la parte inferior de estas columnas se relaciona con microorganismos quimioheterótrofos fermentadores o reductores de sulfatos; tam-

bién evidencia la precipitación de sulfuros de metales pesados (López, 2007), indicando la presencia de estos en el sedimento original. También señala la presencia de compuestos orgánicos productos de procesos de fermentación microbiana (Atlas y Bartha, 2002).

Según Rundell et al. (2014) las comunidades microbianas se ven afectadas por el sedimento, su profundidad y la fuente de celulosa suplementaria. En el presente estudio la fuente de carbono evaluada fue papel periódico que contiene carbohidratos como la celulosa y la hemicelulosa entre el 20 al 75% (Zhu, 2011), sin embargo, se determinó que los microorganismos presentes en el suelo no fueron capaces de asimilar completamente este compuesto porque la columna (II) presentó poco desarrollo bacteriano en comparación a las que contenían azufre y al finalizar la semana 27 se apreció la estructura del papel intacta.

El hierro es utilizado como cofactor para muchas enzimas y proteínas reguladoras, en sus formas ferroso y férrico, con todo el crecimiento microbiano se vio limitado en las columnas

(IV) y (VI), por esto se asume que las bacterias autóctonas no son capaces de involucrar el hierro en sus rutas metabólicas, debido a que no se observó un desarrollo significativo del color.

En la CW control no se evidenció un crecimiento de bacterias pertenecientes al ciclo del azufre, debido a que estas dependen de un sustrato orgánico, y el sedimento original tomado de la quebrada se caracteriza por ser un suelo poco evolucionado, en otras palabras, es un suelo que tiene alto contenido de minerales y bajo contenido de materia orgánica (IGAC, 2000) por ello el desarrollo microbiano fue más evidente en las CW enriquecidas. Madigan et al. (2015) afirma que la ubicación de cada gremio microbiano - grupos de microorganismos metabólicamente semejantes- está dado por la disponibilidad de donadores y aceptores de electrones. Además, las reacciones de óxido-reducción que se dan en cada ciclo geoquímico están directamente involucrados con el ciclado de nutrientes en el sistema.

Finalmente, al hacer una revisión bibliográfica de estudios realizados en la quebrada El Muña (San Francisco, Cundinamarca) no se encontró información sobre la diversidad microbiana del lugar, por lo que el presente estudio toma relevancia, pues es necesario conocer la microbiota de la zona para determinar las condiciones del cuerpo de agua, caracterizar microorganismos capaces de llevar a cabo procesos de biorremediación en lugares contaminados con sulfatos y metales pesados.

CONCLUSIONES

La evaluación sobre la presencia de microorganismos en sistemas artificiales como la columna de Winogradsky permite conocer la presencia de gremios microbianas y su interacción con los componentes abióticos del ecosistema. Estos datos son la base para procesos de biorremediación en ambientes contaminados para realizar procesos de bioaumentación según el ciclo geoquímico en el cual intervengan y las características químicas de los contaminantes a retirar del lugar en estudio.

Con esta evaluación preliminar, se puede inferir que el suelo de la quebrada el Muña contiene sulfatos debido a la presencia de bacterias quimioheterótrofas fermentadores o reductores de sulfatos y de compuestos azufrados, relacionados con la inadecuada disposición de residuos, por tanto, se recomienda continuar con estudios en la quebrada que permitan aislar e identificar los géneros microbianos en estudios de ecología microbiana y evaluar la utilización de estos en procesos de biorremediación.

AGRADECIMIENTOS

A la docente Lena Carolina Echeverry Prieto por acompañarnos y ser nuestra guía en esta investigación, a Jennifer Pinzón y Daniela Pérez por su participación y apoyo en la etapa inicial de este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M. y Naidu, R. (2015). A pyrosequencing-based analysis of microbial diversity governed by ecological conditions in the Wino-

- gradsky column. *World J Microbiol Biotechnol*, 31 (7), 1115 – 1126. doi: 10.1007/s11274-015-1861-y
- Atlas, R. y Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. (Traductor Corzo, A.) Madrid: PEARSON EDUCACIÓN S.A. (1997)
- Babcsányi, I., Meite, F. y Imfeld, G. (2017). Biogeochemical gradients and microbial communities in Winogradsky columns established with polluted wetland sediments. *FEMS Microbiology ecology*, 93 (8). doi: 10.1093/femsec/fix089
- Bacchetti, T., Barroeta, B. y Esteve, A. (2015). La columna bioelectrogénica: una herramienta para introducir conceptos de ecología microbiana y electroquímica en la educación secundaria. *Revista Eureka sobre enseñanza y divulgación de las ciencias*, 12 (3), 529 – 535. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92041414009>
- Betancourt, Y. y Torres, C. (2016). Caracterización parcial de escenarios de riesgo del área urbana municipio de san francisco de Sales (Tesis de pregrado) Universidad libre de Colombia, Bogotá D.C.
- Correa, O. (2013). Los microorganismos del suelo y su rol indiscutido en la nutrición vegetal. En INBA (2013) *Aportes de la microbiología a la producción de cultivos*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Facultad de Agronomía universidad de Buenos Aires
- Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A. y Massarini, A. (2008). *Biología*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Gadd, M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156 (Pt 3), 609 – 643. doi: 10.1099/mic.0.037143-0
- IGAC (2000). *Estudio general de suelos y zonificación de tierras del departamento de Cundinamarca*. Bogotá D.C., Colombia: DANE
- López, J. P. (2007). La columna de winogradsky. Un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secunda-

- ria. Revista Eureka sobre enseñanza y divulgación de las ciencias, 5 (3), 373 – 376. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92050311>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., y Stahl, D. A. (2015). Brock, Biología de los microorganismos (Traductor Gacto, M) Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A. (2014)
- Ruiz, A. (1994). El huevo en la alimentación mediterránea. Recuperado de <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/3805/07-1994-06.pdf?sequence=1>
- Rundell, E. A., Banta, L. M, Ward., D. V., Watts, C. D., Birren, B. y Esteban, D. J. (2014). 16SrRNA gene survey of microbial communities in Winogradsky columns. PloS One, 9 (8). doi: 10.1371/journal.pone.0104134
- Zhu, M. J., Zhu, Z. S., y Li, X. H. (2011). Bioconversion of paper sludge with low cellulosic content to ethanol by separate hydrolysis and fermentation. African Journal of Biotechnology, 10 (66). doi: 10.5897/AJB11.164.