



## Identificación de bacterias nitrificantes en leguminosas

Nombre \_\_\_\_\_ Grupo \_\_\_\_\_

Los principales compuestos celulares, como las proteínas y ácidos nucleicos, contienen en su estructura nitrógeno, por lo que los organismos necesitan de una fuente nitrogenada para poder crecer. Es importante mencionar que todos los compuestos nitrogenados provienen del nitrógeno molecular ( $N_2$ ), que representa el 80% de los gases que forman la atmósfera terrestre. La mayoría de los organismos de la naturaleza no pueden asimilar el  $N_2$  de la atmósfera, sólo un centenar de géneros de bacterias que se conocen con el nombre de bacterias nitrificantes o fijadoras de nitrógeno están capacitadas para fijar el nitrógeno del aire por lo que las plantas y demás organismos que son incapaces de asimilar el nitrógeno en forma molecular, dependen del metabolismo de las bacterias nitrificantes para tener una fuente nitrogenada.

Entre las bacterias fijadoras de nitrógeno se pueden mencionar a las cianobacterias (*Anabena*, *Nostoc*), arqueobacterias (*Methanococcus*), bacterias grampositivas (*Frankia*, *Clostridium*), enterobacterias (*Klebsiella*) y otras proteobacterias (*Rhizobium*, *Azospirillum* y *Acetobacter*). Las bacterias nitrificantes o fijadoras de nitrógeno se asocian con un número significativo de especies vegetales mediante la simbiosis (relación entre dos especies donde ambas reciben un beneficio, pero no es absolutamente indispensable para la sobrevivencia de alguna de las especies)

Las leguminosas se cuentan entre las familias más numerosas, con unas 19.000 especies distribuidas en ambientes muy diversos, las más conocidas son las que tienen valor comercial y alimentario para el ser humano o para el ganado, como el frijol, el chícharo, la lenteja, el haba, la alfalfa y la soya. Su éxito adaptativo se debe a que han establecido simbiosis con las bacterias que realizan la fijación de nitrógeno, esto les permite colonizar suelos pobres en nutrientes.

Las leguminosas alojan a las bacterias en estructuras especiales que se forman en sus raíces: los nódulos. El nódulo es una estructura situada en el sistema radicular de la planta, formada por tejido de la planta y está encargado de fijar y asimilar nitrógeno. Algunas de las células que lo constituyen contiene bacterias englobadas en membranas dentro de su citoplasma, estas bacterias atraviesan un proceso de diferenciación y es precisamente la forma diferenciada (bacterioide) la que fija nitrógeno. Las bacterias nitrificantes, toman el  $N_2$  de la atmósfera y lo



convierten en amonio por medio de la enzima nitrogenasa y la hidrólisis del ATP, estando en forma de amonio o nitrato, el nitrógeno puede ser utilizado por la planta para la síntesis de compuestos nitrogenados como los aminoácidos que constituyen a las proteínas y ácidos nucleicos. La planta suministra glúcidos a la bacteria y la leghemoglobina necesaria para la fijación de nitrógeno. Los nódulos activos muestran una coloración rojo pálido debido a la presencia del pigmento **leghemoglobina**. Este pigmento es una hemoproteína de gran afinidad por el O<sub>2</sub> y cuya función básica es limitar la concentración de oxígeno dentro del nódulo. De esta forma los bacteroides reciben suficiente oxígeno para sobrevivir y se evita que la nitrogenasa pueda ser inactivada por el oxígeno. Actualmente se realiza la fijación biológica del nitrógeno como una biotecnología agrícola respetuosa con el medio ambiente y representa una alternativa a la fertilización nitrogenada, evitando la contaminación de suelos y aguas por nitratos.

*Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* son bacterias del suelo móviles atraídas hacia la raíz por compuestos que la planta libera. Pertenecen al grupo de quimioorganotrofos aerobios, formadoras de nódulos en raíces de leguminosas de climas templados y subtropicales. Para su observación se puede utilizar un procedimiento muy usado en microbiología la tinción Gram. Si se desea simplemente aumentar el contraste de las células para la microscopía, son suficientes los procedimientos que usan un solo colorante llamado de tinción simple. Sin embargo, a menudo se utilizan métodos que no tiñen de igual modo todas las células, es el proceso denominado tinción diferencial. Basándose en su reacción a la tinción Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos: grampositivas y gramnegativas. Esta tinción tiene gran importancia en taxonomía bacteriana ya que indica diferencias fundamentales de la pared celular de las distintas bacterias.

Objetivo:

- Identificar bacterias nitrificantes en los nódulos de algunas

Equipo	Sustancias	Material biológico
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bisturí o tijeras</li> <li>• Pinzas</li> <li>• Mechero</li> <li>• Asa de siembra</li> <li>• Cuba de tinción</li> <li>• Caja Petri</li> <li>• 2 portaobjetos</li> <li>• Gotero</li> <li>• Microscopio óptico</li> <li>• Microscopio estereoscópico</li> <li>• Lupa</li> </ul>	<p>Cristal violeta (1 g de cristal violeta en 100 cc de agua destilada).</p> <p>Lugol (1 g de yodo en 2 g de yoduro potásico en 100 cc de agua destilada).</p> <p>Fucsina básica (1 g de fucsina básica en 100 cc de agua destilada).</p> <p>Aceite de inmersión.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Una planta de frijol con raíces que presenten nódulos.</li> <li>• Una planta de trébol, con raíces que presenten nódulos.</li> </ul>



Reactivos que se utilizan	Reacción y coloración de las bacterias	
	GRAM +	GRAM -
1) Cristal violeta	Células color violeta	Células color violeta
2) Lugol solución iodada	Se forma el complejo CV-I. Las células continúan teñidas de color violeta.	Se forma el complejo CV-I. Las células continúan teñidas de color violeta.
3) Alcohol	Se deshidratan las paredes celulares. Se contraen los poros. Disminuye la permeabilidad. El complejo CV-I no sale de las células que continúan teñidas de color violeta.	Eliminación por extracción de grasas de las paredes celulares. Aumenta la porosidad. El complejo CV-I se separa de la célula.
4) Safranina	Células no decoloradas; quedan teñidas de color violeta.	Células decoloradas; se tiñen de color rosado.

## Procedimiento

### 1. Observación de nódulos

a) Toma una planta de leguminosa lava sus raíces con agua si se encuentran sucias, colócala la planta en el microscopio estereoscópico o bajo una lupa para observar las raíces, toma una foto o elabora un dibujo. Con las pinzas toma uno de los nódulos y con ayuda del bisturí, o las tijeras abre uno de los nódulos por la mitad observa su coloración y toma otra foto o dibújalo. Contesta las siguientes preguntas:

- ¿Qué coloración presentan los nódulos?
- ¿A qué se debe?
- ¿Qué beneficio obtiene cada uno de estos organismos en su relación mutua?

b) Toma otro nódulo y colócalo en la caja de Petri, lávalo con agua destilada para ser desinfectado antes de extraer a los rizobios que habitan dentro. Una vez desinfectados, los nódulos se aprietan con unas pinzas estériles sobre la caja Petri para formar una suspensión de bacterias y se coloca la caja cerca del mechero para evitar la contaminación, se procede a la observación.

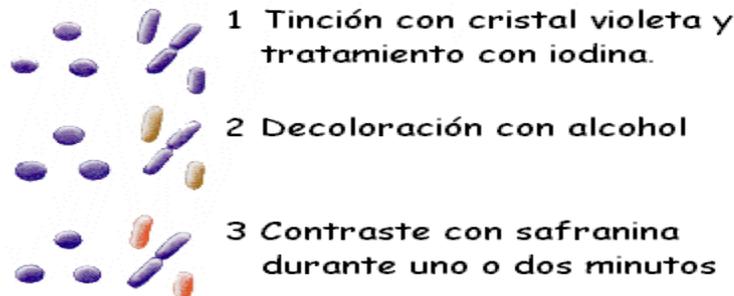
- Identificación de bacterias por la tinción de Gram.

1. Elaborar un Frotis, utiliza un portaobjetos limpio (con alcohol, y flameado), con el gotero se coloca una gota de la suspensión de bacterias, se extiende la mezcla sobre el portaobjetos con el asa de siembra formando una capa para facilitar su secado.



2. Pasar dos o tres veces rápidamente el portaobjetos sobre la flama del mechero para secarlo.
3. Poner el portaobjetos en la cuba de tinción y agregar con el gotero suficiente colorante de cristal violeta dejar que actúe durante un minuto.
4. Lavar suavemente con agua.
5. Inunde el portaobjetos suavemente con el mordiente, yodo de Gram, y deje actuar durante un minuto.
6. Lavar suavemente con agua.
7. Decolorar con alcohol etílico al 95%. Nota: no sobredecolore, agregue el alcohol gota a gota hasta que este salga casi claro, solo ligeramente azul.
8. Lavar suavemente con agua.
9. Agregar la safranina para la tinción de contraste.
10. Lavar suavemente con agua.
11. Secar la preparación con el mechero o **suavemente y sin frotar** con papel de filtro.
12. Poner una gota muy pequeña de aceite de cedro (aceite de inmersión) y observar al microscopio con el objetivo de 100x.

## Tinción de Gram



Las bacterias Gram + (Gram positivas) se ven de color púrpura-violeta y las Gram - (Gram negativas) de color rojizo-rosado.

[www.uv.es/~jjmateo/microb/Gram\(II\).doc](http://www.uv.es/~jjmateo/microb/Gram(II).doc)

Realiza los dibujos correspondientes a tus observaciones o toma fotos donde identifiques a las bacterias. Elabora el reporte de la práctica.

- ¿Qué coloración presentan las bacterias?
- ¿A qué se debe?
- ¿Cuál es la importancia de las bacterias nitrificantes para el metabolismo de las plantas y otros organismos?

Modificada de: Sandra Saitz Ceballos.