

Aspectos básicos de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de bacterias. Estudio en el laboratorio de educación secundaria

José Pedro López Pérez^{1,2,a}, Raquel Boronat Gil^{3,b}

¹I.E.S. Ricardo Ortega. 30320 Fuente Álamo. Murcia. España.

²Departamento de Didáctica de las Ciencias Experimentales. Facultad de Educación. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100 Murcia. España.

³I.E.S. Antonio Menárguez Costa. 30710 Los Alcázares. Murcia. España.

^ajosepedro.lopez@murciaeduca.es, ^braquel.boronat@murciaeduca.es

[Recibido en septiembre de 2014, aceptado en junio de 2015]

La fijación de nitrógeno atmosférico por parte de microorganismos tiene notable importancia ambiental e industrial relacionada con el incremento de la fertilidad y productividad en los suelos, soporte de las plantas y las redes tróficas derivadas. En el presente artículo se especifica un sencillo protocolo de laboratorio, junto con la base teórica que lo sustenta, con el objetivo de observar los microorganismos responsables de la fijación en los nódulos de leguminosas.

Palabras clave: Fijación de nitrógeno. Bacterias; Simbiosis. Educación Secundaria Obligatoria.

Key aspects to atmospheric nitrogen fixation by bacteria. A study in the compulsory secondary education laboratory

The fixation of atmospheric nitrogen by microorganisms has significant environmental and industrial importance associated with increased in fertility and productivity in soils, supporting plants and its derived food webs. This paper shows a simple laboratory protocol, together with its theoretical foundations, in order to observe the responsible microorganisms of the nitrogen fixation in the nodules of legumes.

Keywords: Nitrogen fixation. Bacteria. Symbiosis. Compulsory Secondary Education.

Para citar este artículo: López Pérez, J.P. y Boronat Gil, R. (2016). Aspectos básicos de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de bacterias. Estudio en el laboratorio de educación secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 13 (1), 203-209. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10498/18024>

Introducción

Se define el suelo como la capa de vida de transformación de la corteza sólida terrestre, formada bajo el influjo de la vida y de las especiales características que determinan un hábitat biológico, sometido a un cambio estacional permanente y a un desarrollo característico (Kubiena 1952). Es decir, la zona de interfase entre la geosfera-hidrosfera y la atmósfera que permite la vida vegetal y microbiana, así como sustentar la base de las complejas redes tróficas (de productores a consumidores); un hábitat particular donde suceden transformaciones biogeoquímicas, flujo de materia y energía por el sostén de la vida. Los microorganismos, entre otros seres vivos, contribuyen a sustentar la presencia y desarrollo de las plantas. Éstas toman del suelo el agua y las sales minerales como fuente primaria para la fotosíntesis. Entre las sales minerales encontramos los cationes potasio, calcio y magnesio, los aniones sulfato, cloruro y nitrato, entre otros. El nitrógeno que se incorpora a la materia orgánica vía nitrato es indispensable para la constitución proteica, siendo la base de las subunidades que la constituyen, los aminoácidos (López y Boronat 2013).

Desde tiempos ancestrales, cuando el hombre fue capaz de domesticar y trabajar la tierra, introdujo el abonado del suelo con los restos vegetales y las sobras animales, provocando la multiplicación en la recolección de los productos derivados de las cosechas. La acción microbiana sobre los restos orgánicos provocaba la mineralización del suelo, es decir, la liberación de las sales minerales contenidas en la materia viva. No obstante, esta costosa y

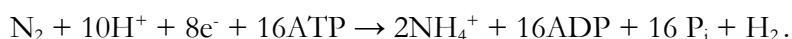
lenta liberación de los compuestos inorgánicos quedó desfasada como consecuencia de un aumento en las prácticas agrícolas (figura 1), la llamada Revolución Verde (mitad del siglo XX), necesitando los nuevos cultivos de la producción de los nutrientes minerales en gran cantidad vía síntesis química artificial.



Figura 1. Cultivo intensivo de alcachofa (*Cynara scolymus*) en el sureste de España.

Entre la síntesis agrícola más apreciada destaca la producción de amoníaco, base de la formación de nitrato, amonio y del resto de abonos químicos, mediante la reacción de Haber-Bosch: $\text{N}_2 + 3\text{H}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$ (un mol de nitrógeno gaseoso reacciona con tres moles de hidrógeno gaseoso para dar lugar a dos moles de amoníaco gas). Esta reacción química requiere de altísimas temperaturas (400 - 500 °C) y presiones de los gases reaccionantes (200 atmósferas) para lograr el producto final, con el consiguiente gasto energético derivado (Christen 1977). El análisis de la reacción por parte del alumnado deriva a cuestiones de cómo el nitrógeno puede pasar a formar parte de la base mineral del suelo en un ambiente que carece del mismo y no dispone de la tecnología química implantada por el ser humano. El nitrógeno se encuentra en grandes cantidades en la atmósfera, constituyendo el 78 % del total de la composición de gases del aire. Tan solo la acción de algunos grupos de bacterias y arqueas es capaz de fijar este gas e incorporarlo al suelo (Nelson y Cox 2009). Entre estos grupos de seres vivos destacan las cianobacterias, las arqueas productoras de metano, el género microbiano *Azotobacter* y otros grupos bacterianos simbioses de las raíces de las leguminosas, objeto de estudio del presente trabajo (Madigan *et al.* 2004).

La gran singularidad de la fijación biológica de nitrógeno, al contrario de lo que ocurre con el procedimiento descrito por Haber, es un transcurso de la reacción a temperatura ambiente y a las presiones de los gases presentes en la atmósfera. Esta reacción bioquímica, de notable interés para la vida se consigue, al menos en parte, gracias a la hidrólisis de la molécula energética biológica, el ATP. La reacción biológica que tiene lugar se puede sintetizar de la siguiente manera (Nelson y Cox 2009):



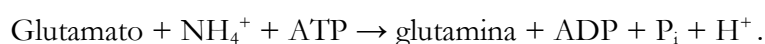
En resumen, la activación microbiológica del nitrógeno atmosférico genera amoníaco, que se ioniza al catión amonio, NH_4^+ , vía hidrólisis de ATP y la transferencia de poder reductor acoplado a una cadena de transporte electrónico.

La simbiosis biológica entre bacterias y plantas leguminosas. Justificación del trabajo

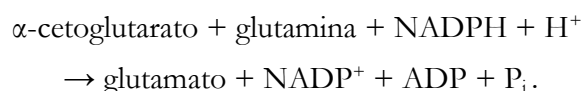
La fijación de nitrógeno por parte de bacterias tiene notable importancia ambiental relacionada con el mundo agrario. Los géneros de bacterias *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, integrantes de la microbiota autóctona del suelo, provocan la formación de abultamiento en las raíces de algunas plantas, las leguminosas (figura 2). La relación que se produce entre la bacteria y la planta es simbiótica, es decir, donde ambos individuos se ayudan y benefician mutuamente. Las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico y lo incorporan a la base proteica del vegetal. Por el contrario, este último da cobijo y ambiente propicio para el correcto desarrollo del microorganismo en su interior.

La entrada del microorganismo por las raíces de la planta genera la paralización inmediata de la producción de la hormona auxina, responsable del crecimiento, provocando los abultamientos descritos llamados nódulos. Además, en el interior de la célula vegetal, la bacteria condiciona a la planta la producción de una proteína transportadora de oxígeno, similar a la hemoglobina presente en el interior de los glóbulos rojos de la sangre, llamada Leg-hemoglobina. Y, ¿por qué este afán de capturar el oxígeno celular? La fijación de nitrógeno se lleva a cabo a través de un complejo enzimático, la nitrogenasa. Una característica muy importante de éste es su extrema sensibilidad e inhibición por la presencia de este gas oxidante (Nelson y Cox 2009). El oxígeno es la molécula final aceptora de los electrones en el metabolismo aeróbico microbiano productor de energía. Su disponibilidad en el citoplasma celular podría acarrear serios problemas para el correcto funcionamiento del complejo enzimático. La hemoglobina especial capturará este gas y lo incorporará de un modo más específico al paso final de aceptación electrónica.

La nitrogenasa bacteriana se nutre del poder reductor generado en el metabolismo, si bien requiere de energía suministrada por la molécula de ATP para el correcto funcionamiento (figura 3). El nitrógeno reducido a amoníaco (o lo que es lo mismo, a catión amonio- NH_4^+ , tras la combinación del gas con agua) será incorporado a los aminoácidos para, posteriormente, dirigirse a otras moléculas nitrogenadas, las proteínas. Dos aminoácidos influyentes en el proceso son la glutamina y el glutamato:



Algunos intermediarios del ciclo de Krebs, o ciclo de los ácidos tricarboxílicos, caso del α -cetoglutarato, experimentan reacciones bioquímicas específicas, utilizando la glutamina como molécula transportadora de nitrógeno, tal y como se recoge en la siguiente reacción (Nelson y Cox 2009):



Poner de manifiesto en el laboratorio de Educación Secundaria todo el proceso bioquímico de la fijación de nitrógeno, así como la tediosa aportación al microscopio electrónico de la localización de los microorganismos definidos en la introducción es un tanto arduo, complejo y con

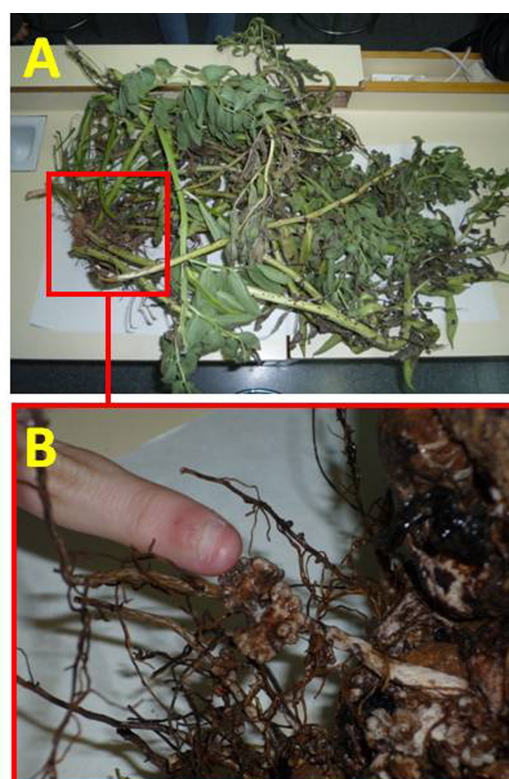


Figura 2. Aspecto macroscópico de la leguminosa *Vicia faba*, el haba (A) y observación de los nódulos de fijación de nitrógeno tras el lavado con agua del grifo de la zona más apical de las raíces (B).

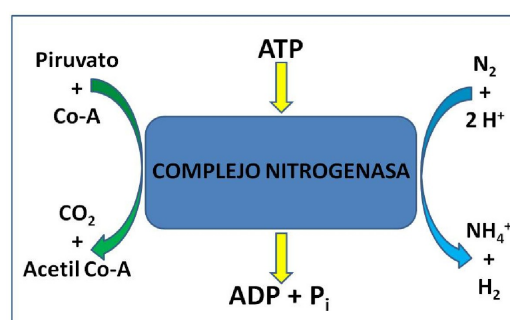


Figura 3. Reacciones bioquímicas básicas del complejo nitrogenasa. Los electrones se transfieren de la molécula de ácido pirúvico procedente del metabolismo al complejo nitrogenasa. La fijación de nitrógeno atmosférico requiere de la energía suministrada por la molécula de ATP, produciendo como productos finales amonio e hidrógeno gaseoso (accesorio).

una metodología y materiales no disponibles por falta de presupuesto. No obstante, en el laboratorio puede llevarse a cabo una metodología sencilla, rigurosa y con resultados sorprendentes para dar a conocer los nódulos presentes sobre las raíces de leguminosas, los agentes bacterianos localizados en su interior responsable de la fijación, así como la bioquímica del proceso desde un punto de vista didáctico. Más específicamente, para cuarto curso de Educación Secundaria y Bachillerato se han propuesto como objetivos precisos: (1) Dar a conocer los aspectos básicos de la microbiología y la observación al microscopio óptico de campo claro, (2) describir la bioquímica básica de las reacciones que se van a presentar una vez analizada la experiencia y (3) comprobar los agentes bacterianos responsables del proceso de fijación de nitrógeno y que residen dentro del nódulo en la raíz de leguminosas.

Descripción de la actividad. Metodología

El cultivo de habas tiene una singularidad notable y tradición en el sureste de España. Un ejemplar de Vicia faba extraída de raíz se llevó al laboratorio del centro de estudios (figura 2A) y se dispuso bajo el grifo de agua corriente para eliminar los restos de tierra de cultivo presente en la raíz. Tras el lavado se llamó la atención al alumnado con motivo de la presencia de unos engrosamientos o nódulos en la raíz de la planta, preguntándose qué podría ser este hecho (figura 2B). Se denotó la corta distancia de la presencia de los nódulos en las raíces y la interfase tierra-aire, así como su relación con la óptima incorporación de gases de la atmósfera (oxígeno y nitrógeno).

Mediante la ayuda de unas tijeras, perfectamente limpias, se procedió al corte de uno de estos nódulos y su posterior lavado escrupuloso con agua clorada para eliminar cualquier resto de partícula de suelo o microorganismo que pudiera enturbiar la futura observación de las bacterias responsables de la fijación de nitrógeno, objeto de estudio del presente trabajo. A continuación, se procedió con cortes finos, extrayendo cubos de tejido de 2 mm de arista (aproximadamente) y disponiéndolos en un tubo de ensayo provisto con 1 ml de disolución de formaldehído al 3%. La fijación consiste en una técnica mediante la cual se intenta mantener la arquitectura celular que organiza un tejido lo más inalterada posible y que mejor denote la realidad de estudio, evitando los procesos de autólisis celular y de protección frente a la posible contaminación microbiana. De este modo se mantienen las propiedades fisicoquímicas de la preparación y la correcta observación de las estructuras que se quieran visualizar mediante la insolubilización de ciertos componentes celulares. Los aldehídos cumplen fielmente este proceso mediante su unión a proteínas, provocando puentes de estabilización en estas estructuras dominantes de la célula (Dykstra 1992).

Tras 24 horas de fijación a 4 °C, los cubos se dispusieron sobre un vidrio de reloj con 3 ml de una disolución de azul de metileno 1 %, durante 5 minutos. Tras sucesivos lavados con abundante agua, una de las muestras se dispuso sobre un portaobjetos provisto de una gota de agua. Con ayuda del cubreobjetos se aplastó la preparación para su correcta observación al microscopio óptico y objetivo 100× de inmersión en aceite. Las imágenes de los cultivos microbianos se obtuvieron mediante una cámara digital y posterior tratamiento con el software informático adjunto a la misma.

Resultados y discusión

El lavado de la base de la planta de haba ofrece la observación de unos engrosamientos notables en la raíz (figura 2B) determinados por la infección de microorganismos simbiotes. Stanier *et al.* (1981) argumentan esta simbiosis como determinativa en una mejora sustancial para el crecimiento y desarrollo de la planta en suelos desprovistos de nitrógeno. Si bien los

ciclos biogeoquímicos son conocidos por el alumnado de primer y segundo ciclo de Educación Secundaria, la fijación de nitrógeno es uno de los acontecimientos microbianos desconocidos entre los discentes. Destaca el hecho que la microbiología es una de las disciplinas con un importante número de contenidos repartidos en la Educación Secundaria, en las materias de Ciencias de la Naturaleza y Biología y Geología (BOE 2007); si bien su desconocimiento deja pasar al olvido situaciones tan sorprendentes como la que se especifican en esta comunicación.

Cuando al alumnado se le comenta que la formación de estos nódulos sobre las raíces de leguminosas se debe a bacterias, y estas hacen acto de presencia en los mismos, la desconfianza es más que notable. No obstante, cuando uno de los engrosamientos de las raíces se procesa, tal y como se describe en el apartado de metodología, aparecen imágenes como la que se ilustra en la figura 4. Los bacteroides, como se definen a estos microorganismos simbioses (Stanier *et al.* 1981), se observan en el interior de las células de la raíz de la planta, así como en la suspensión acuosa preparada. La reorganización y crecimiento masivo del tejido formando el nódulo constituye el hábitat que potencia el desarrollo de los microorganismos participantes en el proceso.

Al contrario de los notabilísimos resultados obtenidos por Vedan *et al.* (2004) o Brown *et al.* (2011) trabajando con la simbiosis entre las especies *Rhizobium leguminosarum* y *Phaseolus vulgaris* (judía), tras un complejo procesado de las muestras e inclusión en resinas epóxicas, la metodología descrita en esta comunicación tras el uso de materiales rutinarios de laboratorio, permite una correcta observación de las bacterias responsables del proceso, con la meta que el alumnado pueda concebir la experiencia que se presenta como una ilustración empírica de los conocimientos teóricos aportados en el aula.

¿Cómo se ha llevado a cabo esta experiencia?

El estudio de los ciclos biogeoquímicos es un contenido básico en 2º y 4º curso de Educación Secundaria, en materias como Ciencias de la Naturaleza y Biología y Geología. Después de conocer los aspectos básicos del ciclo del nitrógeno y su profundización en la desnitrificación (Boronat y López 2013), se propuso llevar al alumnado al laboratorio para conocer otro aspecto singular, la didáctica de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de bacterias. El docente había especificado el valor sustancial del mundo microbiano en la captura del gas atmosférico y su incorporación a la materia orgánica vegetal, pero faltaba la comprobación en el laboratorio del proceso. Para ello, fue necesario disponer como material de trabajo, un ejemplar de *Vicia faba*, ofrecido éste por el director del I.E.S. Ricardo Ortega, D. José

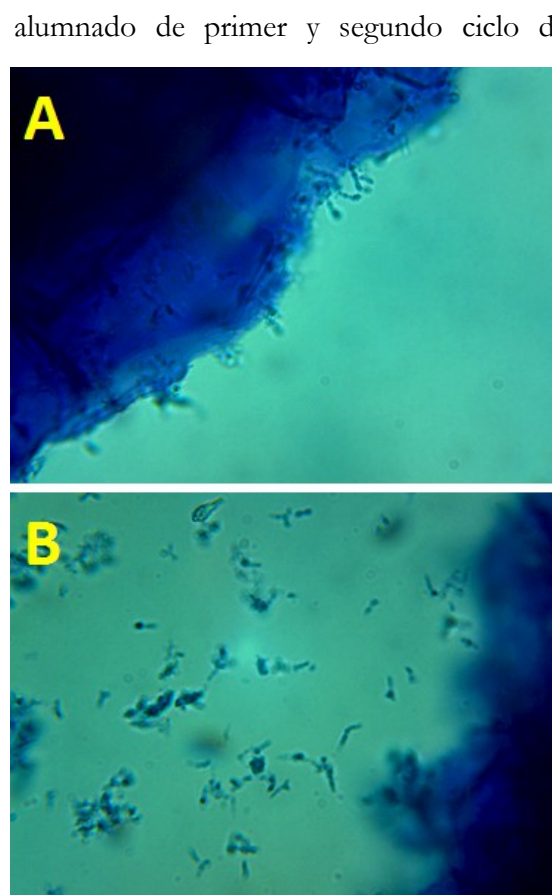


Figura 4. Fotografía bajo el microscopio óptico de campo claro y tinción con azul de metileno de microorganismos liberados de un nódulo de raíz de *Vicia faba*, responsables de la fijación de nitrógeno atmosférico. (A) Microorganismos en las inmediaciones de células de la raíz. (B) Bacterias en suspensión.

Mayordomo Mendoza, y por un familiar de una de las alumnas de la clase de *Profundización a la Biología y Geología* (4º ESO). En una primera sesión, y después del lavado escrupuloso de la raíz con abundante agua del grifo, se denotó a los discentes la presencia de los engrosamientos o nódulos de fijación (figura 2), abriendo esto el camino para una breve explicación de una bioquímica básica del proceso microbiológico. La simbiosis entre el mundo microscópico y macroscópico fue uno de los aspectos de mayor atención que ofreció la clase, ofreciéndose la posibilidad de la observación de las bacterias responsables del proceso bajo el microscopio de campo claro y uso de objetivo 100x e inmersión en aceite. A los discentes les llamó la atención el uso de aceite para la observación de preparaciones biológicas, cuando no es habitual este hecho en los laboratorios de Educación Secundaria. Como dato significativo su puntualizó en el poder de resolución de un equipo óptico, como la capacidad que tiene éste para poder observar dos puntos que se encuentran próximos y las bondades del uso de este nuevo equipamiento para poder aumentar esta propiedad en el microscopio óptico. En una segunda sesión, tras la fijación del nódulo, corte y tinción con azul de metileno, como se indica en el apartado de metodología, se procedió a la observación de las bacterias responsables. El laboratorio dispone de un único microscopio de inmersión en aceite y objetivo 100x, pero con la ventaja de proyectar imágenes mediante cámara y el apoyo de las nuevas tecnologías. El alumnado disponía de un equipo de microscopía básico, con aumentos reales de 400x, útil para el control del proceso y tratamiento de la muestra que estaban realizando para, tras finalizar, comprobar a mayor aumento la observación simbiótica y los aspectos singulares de la misma.

El proceso de evaluación ha consistido en la observación del desarrollo de la práctica en cuanto a la capacidad de autonomía del alumno en las distintas fases de la experiencia: la capacidad organizativa y la distribución de las funciones dentro del grupo, el intercambio de ideas y la colaboración para llevar a cabo un proyecto común entre discentes... En definitiva, abrirles una nueva forma de comprensión y entendimiento de una materia.

Materiales y aspectos a considerar

Finalizada la experiencia y como medida básica de higiene, es aconsejable el lavado de las manos con abundante agua y jabón. El material de trabajo de vidrio deberá dejarse unas horas en agua con hipoclorito de sodio, previo a su fregado escrupuloso. Los reactivos y material biológico utilizados en la experiencia no se desecharán por el desagüe del grifo del laboratorio, vertiéndose en un frasco contenedor para su posterior recogida por personal autorizado.

Agradecimientos Los autores quieren expresar su más sincero agradecimiento a todos los alumnos de 2º y 4º curso de Educación Secundaria del I.E.S. Ricardo Ortega, de Fuente Álamo, Murcia (curso 2013-2014), por el interesante trabajo realizado y por las imágenes presentadas en esta actividad.

Referencias

- BOE (2007) Real Decreto 1631/2006, de 29 de noviembre, por el que se establecen las enseñanzas mínimas correspondientes a la Educación Secundaria Obligatoria. BOE nº 5, 5 de enero de 2007, pp. 677-773.
- Boronat R., López J. P. (2013) Aspectos básicos de la desnitrificación microbiana en suelos. *Alambique. Didáctica de las Ciencias Experimentales* 73, 105-109.
- Brown D., Huang Y., Kannenberg E., Sherrier D., Carlsson R. (2011) An *acpXL* mutant of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli lacks 27-hydroxyoctacosanoic acid in its lipid A

and is developmentally delayed during symbiotic infection of the determinative nodulating host plant *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Bacteriology* 193 (18), 4766-4778.

Christen H. (1977) *Química general*, 1ª ed. Barcelona. Reverté. pp. 108-109.

Dykstra M. J. (1992) Specimen preparation for transmission electron microscopy. Cap. 1 en *Biological electron microscopy. Theory, techniques and troubleshooting*. New York. Plenum Press. pp. 5-78.

Kubiena W. L. (1952) *Claves sistemáticas de suelos*. Madrid. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2004) *Brock: biología de los microorganismos*, 10ª ed. Madrid. Prentice Hall.

Nelson D. Cox M. (2009) *Lehninger. Principios de bioquímica*, 5ª ed. Barcelona. Omega. pp. 852-857.

Stanier R., Doudoroff M., Adelberg E. (1981) *Microbiología. Colección Ciencia y Técnica*. Madrid. Aguilar. pp. 777-798.

Vedan V., Haynes S., Kannenberg E., Carlson R., Sherrier D. (2004) A *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide lipid-A mutant induces nitrogen-fixing nodules with delayed and defective bacteroid formation. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17 (3), 283-291.