

pregunta de cómo podrían obtenerse buenas medidas, una alumna «cortó por lo sano»: inventando otro procedimiento. Dos o tres pensaron que quizá podría haber un sistema eléctrico para detener el cronómetro en el momento exacto. Previamente, las alumnas que manejaban los cronómetros habían detectado la principal causa de error: es muy difícil parar el cronómetro en el instante justo en que la bola pasa por el punto considerado.

Para un próximo curso trataremos de obtener medidas utilizando un electroimán para poner en marcha y detener el cronómetro, compararlos con las «manuales» y discutir los resultados.

Finalmente, tratamos de que la alumna aprenda a aplicar el espíritu científico y crítico que procuramos inculcarle, a otras ramas del conocimiento, y a valorar las distintas fuentes de información que le llegan.

CIENCIAS NATURALES

Ciclo del nitrógeno. Prácticas de microbiología del suelo

Por Francisco BERMUDEZ de CASTRO (*), Angel COSTA (**) y Carlos MIGUEL (***)

Generalmente, a nivel de Bachillerato no se realizan prácticas de Microbiología, debido a las dificultades que entrañan los procesos de esterilización del material y de los medios de cultivo, la complejidad de estos últimos y las condiciones de siembra e incubación cuando no se dispone de un laboratorio adecuado. Sin embargo, algunas técnicas empleadas en Microbiología del Suelo son fáciles de realizar, requieren medios relativamente sencillos y encierran un valor didáctico indudable, pues inician a los alumnos en el estudio práctico de un sector de la Naturaleza tan interesante como es el mundo de los microorganismos.

El suelo no es un soporte inerte de las plantas. Es un ente vivo que se ha formado gracias al trabajo de millones de microorganismos que lo habitan y que contribuyen a su fertilidad. La complejidad de funciones realizadas por los microorganismos del suelo como resultado de las diversas reacciones de su metabolismo aconsejan estudiarlos reunidos en grupos funcionales o fisiológicos que ejercen una función específica como la celulolisis, la proteólisis, la nitrificación, etc. A su vez, estos grupos funcionales se incardinan en los grandes ciclos del nitrógeno, del carbono, del azufre, del hierro y del fósforo.

La Microbiología del suelo emplea habitualmente técnicas propias encaminadas a evaluar grupos determinados de microorganismos sin pretender aislar en cultivo puro un germen determinado como se procura en otras ramas de la Microbiología.

Vamos a estudiar aquí una parte del Ciclo del Nitrógeno, la fijación del nitrógeno atmosférico limitándonos al reconocimiento de un fijador libre del suelo, *Azotobacter*, y a dos simbióticos, *Rhizobium* y *Frankia*.

1. FIJACIÓN LIBRE DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO

- 1.1. Material de campo.
Azadillas.
Bolsas de plástico.
Alcohol.
Algodón.
Cuaderno de notas.
Jabón y toalla.
- 1.2. Material de laboratorio.
Lápiz grueso o rotulador para vidrio.
Cristalizador grande.
Espátulas.
Cajas Petri de 5 cm Ø.
Erlenmeyer.
Tamices de 2 mm de malla.
Papel de filtro.
Cristal.

Balanza.
Frasco de vidrio de boca ancha.
Microscopio.
Portas y cubres.
Asa de siembra.
Mecheros de alcohol o gas.

Reactivos.
Nitrato sódico.
Carbonato cálcico.
Fosfato bipotásico.
Etanol de 96°.
Agua destilada.
Muestreo.

Para asegurar la validez de los resultados es imprescindible recoger correctamente las muestras. Se buscará una tierra cultivada, que previamente haya observado el profesor, y se recogerán muestras en una época en la que el suelo no esté ni demasiado seco ni encharcado por la lluvia. Para cada muestra se harán 10 recogidas en diversas zonas del terreno, juntándolas en una bolsa y homogenizándolas posteriormente en el laboratorio. La

(*) Doctor en Ciencias Biológicas. Profesor Adjunto de Biología en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca.

(**) Doctor en Ciencias Biológicas. Profesor Agregado de Ciencias Naturales del Instituto Nacional de Bachillerato «Jorge Manrique» de Palencia.

(***) Doctor en Ciencias Biológicas. Profesor Ayudante de Biología en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca.

azadilla se esterilizará flameándola a la llama de alcohol y se evitará tocar la muestra con las manos. Es conveniente lavar las manos con alcohol antes de cada recogida y con agua y jabón después de las mismas.

Se operará de la manera siguiente:

— Se retira con la azadilla la vegetación y se raspan aproximadamente los 5 cm primeros del suelo que se desechan.

— Con la misma azadilla se recogen porciones de tierra hasta una profundidad de 15 cm y se introducen en la bolsa.

— Se repite la operación en diez puntos del campo hasta completar una cantidad de tierra recogida de un kilogramo, aproximadamente.

Se cierra la bolsa y se rotula. En el cuaderno de notas se apuntará el número de la muestra y las observaciones de campo que sean pertinentes, como lugar, día y hora de recogida, cultivo a que está destinado el campo, vegetación colindante, etc.

1.5. Tratamiento de las muestras en el laboratorio.

Todo el material debe estar estéril. Si no se dispone de estufa de esterilización basta con flamearlo a la llama y enjuagar el vidrio con alcohol.

Se pasa la tierra por el tamiz metálico que se ha flameado rápi-

damente. El tamizado se recoge sobre un cristal y se homogeniza con la espátula. Si no se va a emplear inmediatamente, se guarda en un frasco de boca ancha en un sitio fresco sin meterlo en la nevera.

1.6. Método de análisis de *Azotobacter* por la técnica de Winogradsky.

Emplea como medio de cultivo la misma tierra enriquecida con una fuente carbonada.

— Se pesan dos lotes de 100 g. de tierra cada uno.

Con cada lote se realizan las operaciones siguientes:

— Se añade 1 g. de piruvato sódico y se mezcla bien con la espátula.

— Se preparan 5 montones sensiblemente iguales. Al primero se le añaden 0,4 g. de carbonato cálcico. Al segundo, 0,1 g. de fosfato bipotásico. Al tercero, 0,4 g. de carbonato cálcico y 0,1 g. de fosfato bipotásico. Al cuarto y quinto no se les añade nada. Cada montón se divide en dos y de esta forma se obtienen dos réplicas de cada tratamiento y cuatro de la tierra sin tratar. A cada uno se le va añadiendo agua destilada estéril mezclando con la espátula hasta conseguir una pasta fácilmente moldeable con la que se llena completamente una placa Petri y se alisa la superficie con la espátula. Las placas se numeran con el lápiz grasoso y se introducen sin tapar en el cristali-

zador que se cubre con un cristal. Se incuban en estufa a 28° C.

Notas: 1.^a Después de llenar cada placa se lava y se flamea la espátula.

2.^a Si no se dispone de estufa de cultivos basta con poner el cristizador en un cuarto oscuro o dentro de un armario o cajón manteniendo la temperatura del local con una placa solar u otro calefactor con termostato.

3.^a El agua destilada estéril puede ser reemplazada por agua recién destilada o por agua destilada que se ha hervido durante bastante tiempo y que se ha dejado enfriar a temperatura ambiente.

4.^a Los alumnos deberán anotar en el cuaderno de prácticas el día y la hora en los que se han depositado las placas en la estufa y el tratamiento que tiene la muestra introducida en cada placa.

1.7. Lectura de los resultados.

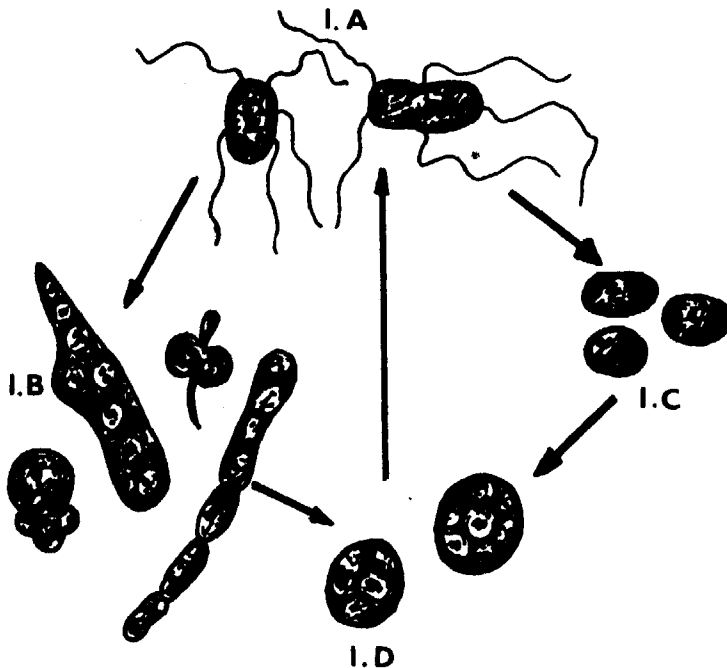
Las placas se examinarán diariamente a partir del segundo día de incubación. Las colonias de *Azotobacter* aparecen como manchas brillantes un poco abombadas. A partir del cuarto día las manchas van tomando color pardo que oscurece progresivamente.

En el cuaderno anotarán los alumnos el número de colonias obtenidas en cada placa y sus características morfológicas: diámetro, color, brillo y forma del margen. Es muy conveniente dibujar la situación de las colonias en cada placa, anotando como dudosas las que no aparezcan claras, para estudiar la evolución del crecimiento.

Como la falta de calcio y fósforo inhiben el crecimiento de *Azotobacter* se deduce por el número de colonias que presentan cada una de las placas a las que se han añadido estos elementos, si la tierra contenía estos nutrientes en cantidades apreciables.

El profesor planteará las cuestiones oportunas relativas a las características de la tierra examinada con respecto al número de *Azotobacter* y a la presencia en el terreno de P y Ca. Para responder a estas preguntas hay que tener en cuenta que en las cuatro placas a las que no se ha añadido nutrientes, el número de colonias es directamente proporcional a la riqueza de la tierra.

Al cabo de 6 días de incubación finaliza la experiencia y los alumnos deberán tirar la tierra y dejarán el material limpio. Como no se han cultivado organismos patógenos basta lavar las placas con agua y un detergente comercial.



Ciclo de *Azotobacter*. I.A: fase vegetativa, formas móviles. I.B: formas inmóviles (prequísticas). I.C: formas aberrantes. I.D: quistes o cuerpos regenerativos

1.8. Observaciones microscópicas

A juicio del profesor se puede examinar al microscopio un cultivo de *Azobacter*. Para ello se toma con un asa una porción de una colonia, se deposita en un porta se diluye en una gota de agua destilada, se tapa con el cubre y se observa a los aumentos máximos del microscopio.

Según la nueva clasificación del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8.ª ed., 1974), *Azobacter* pertenece al grupo de bacilos aerobios gram-negativos. Al microscopio se podrán observar algunas de las formas siguientes que los alumnos deberán dibujar en su cuaderno: bacilos cortos móviles por flagelos insertados por todo el cuerpo de la bacteria (flagelos peritricos) (Fig. 1a), formas inmóviles sin flagelos (Fig. 1b), formas aberrantes (Fig. 1c) y quistes esféricos (Fig. 1d).

2. FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO

Las dos simbiosis fijadoras de nitrógeno atmosférico mejor estudiadas, leguminosa-*Rhizobium* y no-leguminosa-*Frankia*, pueden ser reconocidas fácilmente en nuestro país.

2.1. Simbiosis leguminosa-*Rhizobium*.

2.1.1. Material de campo.

El mismo que para 1.1.

2.1.2. Material de laboratorio.

Microscopios.

Portas y cubres.

Pinzas.

Mecheros de alcohol o de gas.

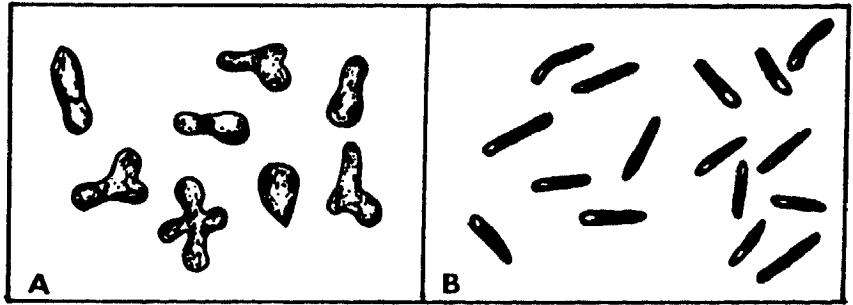
2.1.3. Reactivos.

Solución de azul de metileno, o

Solución de safranina.

2.1.4. Recogida de material.

Aprovechando la excursión anterior se pueden recoger plantas de trébol para observar los nódulos radicales fijadores, que aparecen distribuidos por las raíces. Aconsejamos el trébol ya que se encuentra nodulado por todas partes, a no ser en terrenos muy ricos en fertilizantes nitrogenados, en los que el exceso de nitratos inhibe la nodulación. Otras plantas como la alfalfa presentan dificultades para la recogida de material, ya que las raíces suelen ser más profundas. Por otra parte, la nodulación está notablemente influida por el pH del suelo. En el cacahuete y los altramuces no aparecen los nódulos típicos descritos aquí, sino que



Esquema de las formas pleomórficas que presenta *Rhizobium*: A: bacteroides y B: bacilos

presentan gruesos tumores distribuidos a lo largo de la raíz principal. En fin, otras especies que constituirían buen material de observación, como habas, judías, guisantes, garbanzos y lentejas, se cultivan en épocas y zonas determinadas.

Se recogen con la azadilla plantas enteras y, después de cerciorarse de que se encuentran noduladas, se introducen con algo de tierra en bolsas de plástico. Se anotan las observaciones pertinentes en el cuaderno del alumno.

2.1.5. Observaciones macroscópicas.

En el laboratorio los alumnos limpiarán con agua del grifo la tierra y materia orgánica adherida al sistema radical. A continuación dibujarán en su cuaderno la planta entera, resaltando los nódulos de los que anotarán tamaño, número y color. Luego romperán algunos nódulos para observar la hemoglobina, pigmento de color y estructura similar a la hemoglobina de la sangre, que desempeña un papel importante en el transporte de oxígeno, ya que un exceso de este gas perturbaría el proceso fijador de nitrógeno.

2.1.6. Observaciones microscópicas.

Se arranca un nódulo y se coloca en un portaobjetos sobre una gota de agua. Se pone encima otro porta y se presiona con los dedos hasta triturar completamente el nódulo. Se transfiere una porción pequeña de esta preparación a un tercer porta, se extiende y se añaden unas gotas de safranina o de azul de metileno. Se pasa por la llama la parte inferior del porta para fijar la preparación, se lava el exceso de colorante y se pone el cubreobjetos. A continuación se observa la preparación con el aumento máximo del microscopio.

Rhizobium está clasificado en el mismo grupo que *Azotobacter* como bacilo o coco aerobio Gram-negativo. Veremos numerosos bacilos, como pequeños bastones, y otras formas irregulares que asemejan peras, porras y las letras T, X, Y, denominadas bacteroides (Fig. 2).

2.2. Simbiosis no-leguminosa-*Frankia*.

2.2.1. Material de campo.

El mismo que en 1.1 y un hacha pequeña o pala grande de jardín.

2.2.2. Material de laboratorio.

El mismo que en 2.1.2, y además: Microtomo de mano con su navaja.

Médula de saúco.

Pinzas.

2.2.3. Reactivos.

Los mismos que en 2.1.3.

2.2.4. Recogida de material.

Las angiospermas no-leguminosas fijadoras de nitrógeno son plantas leñosas, árboles y arbustos. La más fácil de encontrar en España es el aliso (*Alnus glutinosa*) y a él nos vamos a referir por ser, además, la no-leguminosa nodulada tipo. Normalmente se encuentra nodulado.

Elegido el ejemplar, cávese cerca del tronco hasta encontrar raíces con nódulos como las de la figura 5, o bien grandes núcleos de hasta 10 cm de diámetro como los de la figura 6. Las raíces noduladas aparecen en los primeros 20 cm de suelo. Se recogerán nódulos que presenten color castaño claro u oscuro, despreciando los que aparezcan con color negro o pardo negruzco que están necrosados.

Córtense con la pala o el hacha unas cuantas raíces noduladas e introdúzcanse en bolsas de plástico y luego vuélvase a cubrir con tierra los huecos hechos al recoger las raíces. En el cuaderno de campo deben los alumnos anotar las di-

mensiones aproximadas del árbol, si está aislado o formando alisedas, si éstas forman un bosque o la ripisilva de una corriente de agua, la vegetación asociada (indique el profesor el carácter nitrófilo de la misma como consecuencia del nitrógeno fijado por los alisos, que se acumula en el suelo como nitrato

pués los racimos nodulares para observar y dibujar los nódulos individualizados.

2.2.6. Observaciones microscópicas.

Se corta con el microtomo de mano un nódulo pequeño procu-

de forma esférica y de un tamaño relativo grande; y bacteroides, corpúsculos de diámetro de 5-10 veces menor que las vesículas.

2.^a En Galicia y en el norte de España es muy fácil encontrar alisos, ya que generalmente se encuentran en los bordes de todos los prados, ríos y arroyos, regatos y lagunas. En el resto de la Península aparecen en ciertos sectores de los cursos de aguas y sobre terrenos silíceos.

3.^a Los nombres vulgares que *A. glutinosa* recibe en Galicia son: ameneiro, abeneiro, amieiro y umeiro. En Asturias se le conoce por umer y omero. En el país vasco le llaman altz, aspil y aspiltze, y en Cataluña, vern y verna.

4.^a Por la zona de Cataluña y Levante es fácil recoger *Coriaria myrtifolia* (roldor o emborrachabras), planta fijadora cuyos nódulos son de menor tamaño que los del aliso, en Canarias, *Myrica faya* (faya) y *Casuarina equisetifolia*, y en lugares diversos está plantada como ornamental en jardines y plazas *Elaeagnus angustifolia* (árbol del Paraíso). Cualquiera de estas especies puede reemplazar al aliso en las experiencias 2.2.4 y 2.2.5, teniendo en cuenta las diferencias siguientes:

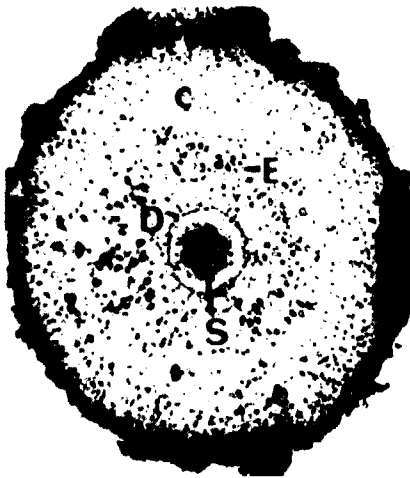
a) Los nódulos de *Myrica* y *Casuarina* poseen unas raíces nodulares con geotropismo negativo que nacen en los extremos apicales de los nódulos.

b) En los nódulos de *Myrica* y *Casuarina* no aparecen las formas vesiculares de *Frankia*.

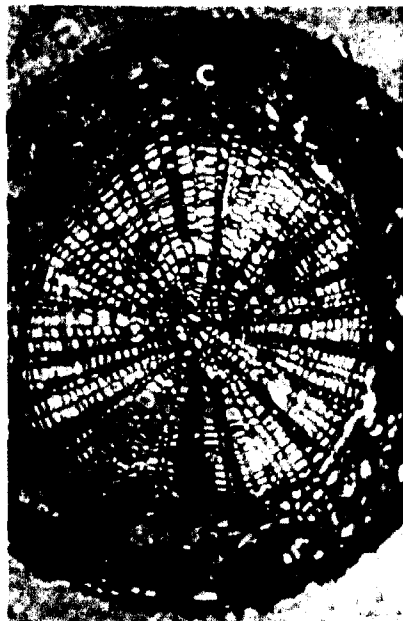
5.^a Los colorantes que se indican en 2.1.3 se preparan de la siguiente manera:

a) Azul de metileno: se prepara una solución saturada de azul de metileno en alcohol etílico. Se añaden 30 ml de esta solución a 100 ml de una solución de KOH al 1/10.000 (p/v).

b) Safranina: se prepara una solución saturada de safranina 0 en alcohol etílico. Se añaden 100 ml de dicha solución a un litro de agua destilada y se filtra a continuación.



Corte transversal de un nódulo de *A. glutinosa*: C: córtex hipertrofiado. E: células con el endofito simbiote. D: endodermis. S: estela o cilindro central (60 x)



Corte transversal de una raíz de *A. glutinosa*. C: córtex. S: estela (100 x)

gracias a la acción de bacterias nitrificantes), las características del suelo, el lugar, la fecha y la hora de recogida.

2.2.5. Observaciones macroscópicas.

En el laboratorio se lavan las raíces y los nódulos. Se observa cómo los dedos quedan teñidos de color castaño a causa de los taninos que contienen en gran cantidad. En el cuaderno se dibujarán los racimos nodulares y las raíces que lleven nódulos pequeños, anotando el tamaño de los nódulos y racimos nodulares. Rómpanse des-

rando hacer cortes transversales lo más delgados posibles. Estos cortes se colocan sobre un porta tiñéndolos con una gota de azul de metileno. Al microscopio se puede observar la estructura típica de una raíz leñosa con un córtex muy desarrollado (Fig. 3). (Compárese con el corte de raíz de la figura 4.) En el parénquima cortical hipertrofiado aparecen varias células muy teñidas que son las células donde ha penetrado *Frankia*, endofito simbiote del aliso.

Notas: 1.^a *Frankia* es un actinomiceto que dentro de las células del parénquima cortical del nódulo presenta tres formas: hifas, como filamentos muy delgados; vesículas

BIBLIOGRAFÍA

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1974, Ed. Buchanan, R. E. y Gibbons, N. E. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- BERMÚDEZ DE CASTRO, F. (1978): *Angiospermas no-leguminosas fijadoras de nitrógeno atmosférico de la Península Ibérica*, en «Bol. Est. Central Ecología» (sometido).
- BERMÚDEZ DE CASTRO, F.; MIGUEL, C.; COSTA, A.; CAÑIZO, A., y RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. (1978): «Estudios sobre la infección y nodulación de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. An. Edafol. Agrobiol. (En prensa.)
- BRILL, W. J. (1977): «Fijación biológica de nitrógeno», en *Investigación y Ciencia*, 8, págs. 44-54.
- POCHON, J. y TARDIEUX, P. (1962): *Techniques d'analyse en Microbiologie du Sol*. Ed. de la Tourelle. St. Mandé.
- RAMOS, A. (1975): *Apuntes de Taxonomía bacteriana*. Univ. de Granada.