

7.6: Uso de compuestos nitrogenados

Prueba de reducción de nitrato

Fundamento: La capacidad de reducir nitratos es una característica importante en la identificación y diferenciación de especies de muchos grupos de microorganismos. La reducción de los nitratos en las bacterias se lleva a cabo a través de diversas vías y siguiendo procesos que se pueden resumir de la siguiente manera:

- **Asimilación:** reducción de los NO_3^- hasta amoníaco que se incorpora al material celular (fuente de nitrógeno).
- **Desaminación:** reducción de los NO_3^- a NO_2^- al utilizarlos como aceptores finales de electrones (respiración anaeróbica).
- **Desnitrificación:** los NO_2^- se reducen hasta N_2 que se desprende del medio de cultivo.

La reducción de NO_3^- a NO_2^- se evidencia por el desarrollo de un color rojo cuando el NO_2^- reacciona con dos reactivos: ácido sulfanílico y dimetil a-naftilamina. El color resultante es debido a la formación de un compuesto diazoico, el p-sulfobenceno-a-2-naftilamina.

Procedimiento: Inocular el **caldo nitrato** (extracto de carne 3 g; peptona 5 g; nitrato potásico 1 g; agua destilada 1000 ml) con una ansada del organismo a estudiar aislado en cultivo puro (agar nutritivo o caldo tripticosa soya) e incubar a 37°C , durante 18 - 24 h. Al finalizar el período de incubación añadir una gota de dimetil a-naftilamina y ácido sulfanílico.

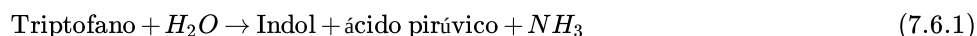
Interpretación: El desarrollo de un color rojo 30 s después de la adición de los reactivos (dimetil a-naftilamina y ácido sulfanílico) indica la presencia de NO_2^- y representa una reacción positiva para la reducción de NO_3^- .

Si no hay cambios de color después del agregado de los dos compuestos, puede indicar que o bien los NO_3^- no han sido reducidos (reacción negativa) o que han sido reducidos a amoníaco o a N_2 . Puesto que los reactivos dimetil a-naftilamina y ácido sulfanílico solo detectan NO_2^- , si se realiza este último proceso podría llevarnos a una lectura falsa (-). Por lo tanto, es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de Zn a todas las reacciones negativas. Si después del agregado del Zn, hubiera cambios de color se comprueba la reacción negativa, ya que el Zn redujo el NO_3^- a NO_2^- . Si no hay cambio de color la reacción es positiva ya que los microorganismos pasaron el NO_3^- a NO_2^- y luego a N_2 .

Sin el agregado de Zn	Con el agregado de Zn
Viraje del medio a rojo: nitrato reductasa (+)	Viraje del medio a rojo: nitrato reductasa (-)
No se observa cambios de color: nitrato reductasa (-)	No se observa cambios de color: nitrato reductasa (+)

Prueba de desaminación e hidrólisis (indol)

Fundamento: Se detecta la presencia de la enzima **triptofanasa** que hidroliza el triptofano según la siguiente reacción:



El Indol se puede detectar en un medio apropiado con el agregado del reactivo *p*-dimetil aminobenzaldehído (reactivo de Kovacs), el cual forma un producto de condensación rojo que al ser extraído con un solvente orgánico (alcohol amílico) forma un anillo de color rojo en la superficie.

Procedimiento: Agregar al cultivo bacteriano desarrollado en agua peptonada durante 24 h, 0.2 ml de reactivo de Kovac's (alcohol amílico + *p*-dimetil aminobenzaldehído) y agitar.

Interpretación:

Reacción (+): anillo rojo en la superficie.

Reacción (-): anillo amarillo en la superficie.

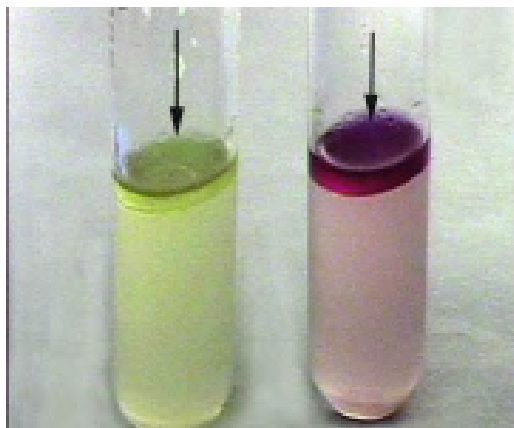


Figura 7.6.1: (CC-BY; Este libero)

Prueba de desaminación (fenilalanina)



Figura 7.6.2: (CC-BY; Este libero)

Fundamento: Se pone en evidencia la presencia de la enzima **fenilalanina deaminasa**, la cual cataliza el pasaje de fenilalanina a fenil pirúvico. Se detecta por el agregado de Cl_3Fe que reacciona con el fenilpirúvico dando un complejo verde oscuro.

Procedimiento: Se inocula un tubo conteniendo medio Fenilalanina y se incuba a 37°C durante 24 h. Luego, del periodo de incubación se agregan aproximadamente 5 gotas de cloruro férrico sobre el desarrollo bacteriano.

Interpretación:

Reacción (+): verde oscuro

Reacción (-): no se observa cambio de color.

This page titled [7.6: Uso de compuestos nitrogenados](#) is shared under a [not declared](#) license and was authored, remixed, and/or curated by [María M. Reynoso, Carina E. Magnoli, Germán G. Barros y Mirta S. Demo](#).