

Efecto de la temperatura de almacenamiento del suelo sobre la población edáfica de *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis*

Effect of soil storage temperature on *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* edaphic population

MARIELIS GIL, ANA CAROLINA RAMÍREZ, ENRIQUE GARCÍA

Laboratorio de Microbiología del Suelo, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. E-mail: egamor@cantv.net

Recibido Octubre 2006 - Aceptado Mayo 2007

RESUMEN

Cuando se realizan estudios bioquímicos y microbiológicos del suelo, diferentes alternativas metodológicas pueden ser utilizadas para recolectar, transportar, almacenar y procesar el suelo con el fin de evitar alteraciones en las propiedades microbiológicas y bioquímicas de las muestras recolectadas. El secado de los suelos, su refrigeración, congelamiento o mantenimiento a 25 °C son algunos de los tratamientos a los cuales se someten las muestras para su almacenamiento en el laboratorio. En el presente estudio se investigó el efecto que sobre la población de *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis* tiene el almacenamiento de muestras de suelo a 4 y 25 °C. Para ello se inocularon muestras de suelo con suspensiones de tales microorganismos, se mantuvieron a 4 y 25 °C y se evaluaron los cambios en la población durante 12 semanas. Los resultados indican que la población de *N. asteroides* a 25 °C se mantiene relativamente estable durante todo el ensayo, mientras que a 4 °C muestra una disminución importante en su población. *N. brasiliensis*, por su parte, presenta en el mismo lapso de tiempo y a las dos temperaturas de almacenamiento una considerable disminución en su población, siendo este efecto más marcado a 4 °C.

PALABRAS CLAVES

almacenamiento de suelo, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, población edáfica

ABSTRACT

In biochemical and microbiological studies of the soil, different methodological alternatives may be applied to transport, store and process the samples in order to avoid alterations in its biochemical and microbiological properties. Drying, refrigeration, freezing or maintenance at 25 °C are some of the treatments that can undergo soil samples for their storage in the laboratory. The objective of the present study was to investigate the effect of storage at 4 and 25 °C on the population of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. For that, soil samples were inoculated with suspensions of such microorganisms, stored at 4 and 25 °C, and the changes in the populations were evaluated during 12 weeks. The results indicate that the population of *N. asteroides* at 25 °C stays stable, while at 4 °C there was an important decrease in its population. *N. brasiliensis*, on the other hand, presents, at the two storage temperatures, a considerable decrease in its population, although this effect is more marked at 4 °C.

KEY WORDS

Soil storage, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, edaphic population

INTRODUCCIÓN

Los estudios microbiológicos del suelo constituyen un área de gran interés, debido principalmente, a que los microorganismos del suelo participan en procesos involucrados en el flujo de la

energía y en la dinámica de nutrientes de los ecosistemas, son una fuente muy diversa e importante de metabolitos de interés biotecnológico y porque los suelos son el hábitat natural de microorganismos causantes de enfermedades en plantas, animales y el hombre (Horner et al., 2003; Beare et al., 1997)

Cuando se realizan estudios bioquímicos y microbiológicos del suelo, diferentes alternativas metodológicas pueden ser utilizadas para recolectar, transportar, almacenar y procesar el suelo con el fin de evitar alteraciones en las propiedades bioquímicas y microbiológicas de las muestras recolectadas. Un almacenamiento inadecuado de las muestras puede afectar negativamente a las comunidades microbianas, disminuyendo su tamaño y actividad, razón por la cual lo ideal es procesar cuanto antes la muestra de suelo fresco, aunque por diversas razones esto no siempre es posible, de ahí la necesidad de recurrir a su almacenamiento (Trabue et al., 2006; Zormoza et al., 2006).

El secado al aire o a 40 °C constituye una práctica muy común para estabilizar y almacenar suelos, ya que sus características físicas y químicas no varían significativamente con el tiempo, pero no es recomendado cuando se hacen estudios bioquímicos o microbiológicos, ya que el secado destruye una parte importante de la población microbiana (Mondini et al., 2002; De Nobili et al., 2006).

Otra opción para el mantenimiento de las muestras es incubarlas a una temperatura entre 25 y 30 °C, aunque esto puede alterar de manera importante sus características originales, ya que continúan algunos de los procesos que de manera natural tienen lugar en el suelo, como la descomposición y mineralización de la materia orgánica, lo que trae consigo que, con el tiempo, ocurran modificaciones significativas en los valores de estos y otros parámetros (Breitenbeck y Bremner, 1987).

La refrigeración a 4 °C o el congelamiento a -20 °C, son otras opciones utilizadas en la conservación de las muestras, y aunque pocos estudios han sido realizados para determinar el efecto que estos tratamientos pueda tener sobre los diferentes grupos de microorganismos, algunos reportes indican que ambas opciones pueden modificar el tamaño de las poblaciones bacterianas, así como también sus actividades (Breitenbeck y Bremner, 1987; Stenberg et al., 1998; Ross et al., 1980).

Con el presente estudio se ha querido investigar el efecto que tiene la conservación de muestras de suelo a 4 y 25 °C sobre la población de dos microorganismos edáficos, *N. asteroides* y *N. brasiliensis*. Esto con la finalidad de determinar la manera más conveniente de

almacenar los suelos para realizar estudios dirigidos a aislar y/o cuantificar las poblaciones edáficas de estas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de la muestra de suelo.

La muestra de suelo proviene de una zona cercana a la población de Humocaro Bajo, estado Lara, y fue tomada hasta 10 cm de profundidad. Las características fisicoquímicas de la muestra han sido descritas en un trabajo ya publicado (Ramírez et al., 2003) y brevemente, son las siguientes: es un suelo franco-arcilloso, con 38 % de arena, 30,4% de limo, 31,6% de arcilla, su pH es de 7,27, tiene 8,57% de capacidad de campo y 1,20 % de carbono, 2,08% de materia orgánica, 0,13% de nitrógeno, la relación carbono/nitrógeno es de 9.2, el contenido de humedad de 6% y presenta 2 ppm de fósforo, 175 ppm de potasio, 375 ppm de magnesio, 114 ppm de sodio y 2.680 ppm de calcio.

Esterilización del suelo.

La muestra se tamizó con un tamiz (Endecotts LTD, London, England) de 10 mesh (<2 mm), se dejó secar a temperatura ambiente (~25°C) por 24 h y se humedeció con agua estéril hasta el 60% de su capacidad de campo, se incubó a 31°C por 72 horas y finalmente se esterilizó en autoclave durante 2 h a 121°C y 15 libras de presión. Se repitió este procedimiento 2 veces. Por último se secó a 105°C por 72 h.

Preparación del inóculo bacteriano.

Se prepararon dos cultivos de *N. asteroides* ATCC 10905 y *N. brasiliensis* LMS 3 en caldo nutritivo y se incubaron a 31°C durante 7 días. Se homogeneizaron con un pistón de vidrio estéril y el homogeneizado se centrifugó a 4500 r.p.m durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó tres veces con solución salina fisiológica estéril para finalmente resuspenderlo en 5 mL de SSF estéril y ajustarlo al patrón 1,0 de McFarland.

Inoculación de las muestras de suelo.

Dos muestras de suelo, de 50 g cada una, colocadas en sendas placas de Petri, se inocularon con 3 mL de la suspensión de *N. asteroides* y otras dos muestras con *N. brasiliensis*. Para ello se agregaron 3 mL del inóculo y suficiente cantidad de agua destilada estéril para ajustar el contenido de humedad hasta un valor del 6 %. Cada muestra se mezcló bien hasta homogeneizar y se dejó 24 h a temperatura ambiente para la estabilización del sistema suelo-inóculo. Al término de este tiempo,

se cuantificaron las poblaciones de *Nocardia*, como se describen más adelante, y la mitad de las muestras se guardó a 4°C y la otra mitad se mantuvo a temperatura ambiente del laboratorio (~25 °C) durante 12 semanas. Se hicieron cuantificaciones de las poblaciones de *Nocardia* después de 1, 2, 4, 6 y 12 semanas.

Estimación de la población.

De cada una de las 4 muestras de suelo se procesaron 3 submuestras (3 réplicas) y para ello se tomaron 2 g. de suelo de cada submuestra y se resuspendieron en 18 mL de SSF estéril, de la que se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-7} . De cada dilución se sembraron 4 réplicas de 50 μ L cada una en 150 μ L de caldo nutriente estéril distribuido en microplacas de titulación de 96 pozos (Microtiter System). Este procedimiento se repitió para cada submuestra y se incubó a 31°C durante 15 días. Se consideró como resultado positivo el desarrollo de crecimiento y los valores de población se calcularon utilizando el método del número más probable, mediante tablas estandarizadas para 4 réplicas (Woomer, 1994).

Análisis estadístico.

Los resultados de la población microbiana (n) se normalizaron calculando el log de n+1 y las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) en una vía y el test de diferencias honestamente significativas de Tukey para comparaciones a posteriori de las medias. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0,05$. Se utilizó el paquete "STATISTICA for Windows".

RESULTADOS

La figura 1 muestra el comportamiento de *N. asteroides* y *N. brasiliensis* a 4 y 25°C en todo experimento. Después de una semana de la inoculación de las muestras, tanto a 4 como a 25°C se observó un importante aumento ($P < 0,05$) en la población de ambas cepas.

El inóculo inicial de *N. asteroides* a 4°C fue de $4,7 \times 10^6$ células por gramo de suelo (c/g) y transcurrida la primera semana aumentó ($P < 0,05$) a $1,13 \times 10^8$ c/gs, mientras que *N. brasiliensis* al final de la primera semana de refrigeración aumentó ($P < 0,05$) de $1,1 \times 10^5$ a $1,5 \times 10^7$ c/gs. Al medir la población de *N. asteroides* y *N. brasiliensis* en los suelos conservados a 25°C se observó un incremento ($P < 0,05$) de $4,2 \times 10^5$ a $1,5 \times 10^8$ c/gs y de $4,6 \times 10^4$ a $5,1 \times 10^5$ c/gs respectivamente.

A la segunda semana se observó que a 4°C *N. asteroides* disminuyó su población hasta $4,3 \times 10^7$ c/gs, y dos semanas más tarde lo hizo en un orden de magnitud más, alcanzando valores de $5,5 \times 10^6$ c/gs. Esta reducción rápida se detuvo en esta semana, sin desaparecer, ya que a partir de la siguiente y hasta la 12ª semana, hubo una disminución de la población, sin variación en el orden de magnitud.

A 25°C *N. asteroides* mantuvo su población en el mismo orden hasta la cuarta semana ($1,1$ y $1,2 \times 10^8$ c/gs a la segunda y cuarta semana, respectivamente). La disminución ($P < 0,05$) fue en casi un orden de magnitud entre la semana 6 y la 12, el tamaño de la población se mantuvo, $8,3$ y $9,2 \times 10^7$ c/gs, respectivamente.

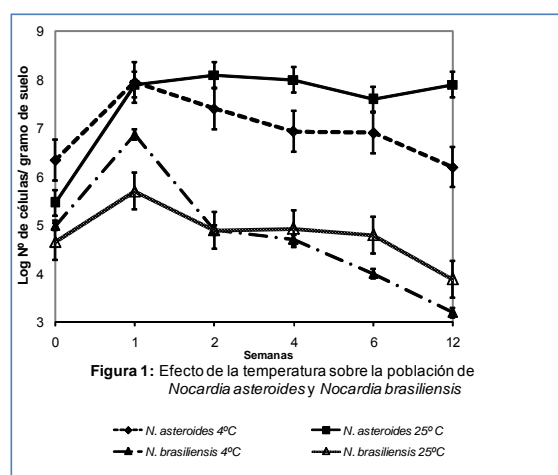


Figura 1: Efecto de la temperatura sobre la población de *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis*

Por su parte, la población de *N. brasiliensis* a 4°C mostró una caída importante ($P < 0,05$) de $1,5 \times 10^7$ c/gs a $5,5 \times 10^4$ c/gs entre la primera y la segunda semana. Esta disminución tan acentuada, que alcanzó los tres ordenes de magnitud, se hizo más lenta a partir de la 2ª semana y alcanzó su mínimo valor ($1,5 \times 10^3$ c/gs) 10 semanas después.

El comportamiento de *N. brasiliensis* a 25°C fue muy parecido al de ésta misma especie a 4°C, aunque la disminución en su población no fue estadísticamente significativa sino hasta la 6ª semana; a partir de este momento la población disminuyó ($P < 0,05$) en un orden de magnitud, alcanzando entonces un valor de $9,2 \times 10^3$ c/gs después de 12 semanas de almacenamiento.

En conclusión, después de la inoculación de las muestras de suelo y del aumento inicial de la población a las dos temperaturas estudiadas, *N. asteroides* a 25°C se mantuvo comparativamente estable durante el resto del ensayo, mientras que a 4°C mostró una disminución importante en su población. *N. brasiliensis*, por su parte presentó en el mismo lapso de tiempo y a las dos temperaturas de

almacenamiento una considerable disminución en sus títulos, aunque este efecto negativo fue más marcado a 4 °C.

DISCUSIÓN

Está muy bien documentado, que las propiedades bioquímicas y microbiológicas del suelo pueden cambiar en función de las condiciones de almacenamiento de las muestras. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que entre las dos alternativas utilizadas, el mantener los suelos a 25 °C es la que tiene menos efectos negativos sobre la población de las cepas estudiadas. Los resultados indican también que la cepa de *N. brasiliensis* es más sensible que *N. asteroides* a cualquiera de las dos condiciones de almacenamiento, pues, tanto a 4 °C como a 25 °C su población disminuye a lo largo de todo el experimento, siendo más marcada dicha disminución con la refrigeración. Desconocemos la razón de estas diferencias mostradas por las dos especies estudiadas y sería importante confirmar este comportamiento con otras cepas de *N. asteroides* y *N. brasiliensis*.

Por otra parte, en nuestros resultados se puede observar que la población de las dos especies estudiadas aumentó significativamente después de una semana de inoculados los suelos. Este fenómeno, ha sido reportado por otros investigadores y tiene su explicación en que la esterilización de los suelos provoca la lisis de los microorganismos originalmente presentes en la muestra por lo que su biomasa se hace disponible como fuente de carbono y nitrógeno, para ser aprovechada por los microorganismos recién inoculados, los que en consecuencia aumentan en cantidad (Acea et al., 1988; Katsifas et al., 2000). Una vez que estos sustratos de origen microbiano y de fácil utilización comienzan a agotarse, los inoculantes necesitan obtener sus elementos nutritivos de la materia orgánica humificada, no tan fácilmente utilizable, por lo que la población se mantiene estable tal y como ocurre con la cepa de *N. asteroides* cuando la muestra de suelo se mantiene a 25 °C o disminuye, como se observa en nuestro estudio con el resto de las muestras.

CONCLUSIONES

Almacenar las muestras a 25 °C, constituye la manera más conveniente de conservar los suelos para realizar estudios dirigidos a aislar y/o cuantificar las poblaciones edáficas de *Nocardia*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que bajo esta condición y a diferencia de *N. asteroides*, la población de

N. brasiliensis después de tres meses de almacenamiento, va a estar muy por debajo de los que tenía originalmente, lo cual puede conducir a subestimar los valores que la población tendría en su hábitat natural.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por el apoyo financiero recibido a través del proyecto S1-2001001177

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acea, M., Moore, C. and Alexander M. 1988. **Survival and growth of bacteria introduced into soil.** Soil Biol. Biochem. 20 (4): 509-515.
- Beare, M., Vikram, M., Tian, G., Srivastava, S. 1997. **Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of decomposer biota.** Appl. Soil Ecol. 6, 87-108.
- Breitenbeck, G.A. and Bremner, J.M. 1987. **Effects of storing soils at various temperatures on their capacity for denitrification.** Soil Biol. Biochem. 19:4, 377-380.
- De Nobili, M., Contin, M., Brookes, P.C. 2006. **Microbial biomass dynamics in recently air-dried and rewetted soils compared to others stored air-dry for up to 103 years.** Soil Biol. Biochem. 38, 2871-2881
- Horner, M.C., Carney, K.M., Bohannon, B.J.M. 2003. **An ecological perspective on bacterial biodiversity.** Proc. R. Soc. Lond. B. 271, 113-122.
- Katsifas, E.A., Koraki, T.G., Karagouni, A.D. 2000. **Determination of metabolic activity of Streptomyces in soil microcosm.** J. Appl. Microbiol. 89: 174-178.
- Mondini, C., Contin, M., Leita, L., De Nobili, M. 2002. **Response of microbial to air-drying and rewetting in soils and compost.** Geoderma. 105, 111-124.
- Ramírez, A., Blanco, M., García, E. 2003. **Biogeografía de Nocardia: Estudio de la población edáfica de Nocardia en diversas zonas climáticas del estado Lara, Venezuela.** Rev. Soc. Ven. Microbiol. 23:142-147.
- Ross, D.J., Tate, K.R., Cairns, A. and Meyrick, K. 1980. **Influence of storage on soil microbial biomass estimated by three biochemical procedures.** Soil Biol. Biochem. 12:4, 369-374
- Stenberg, B., Johansson, M., Pell, M., Sjödal, S., Stenstrom, J. and L. Torstensson. 1998. **Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage.** Soil Biol. Biochem. 30:3;393-402.

Trabue,S.L.,Palmquist,D.E.,Lydick,T.M.,Koch,S.2006.
**Effects of soil storage no the microbial community
and degradation of metsulfuron-methyl.** J. Agric.
Chem. 54, 142-151.

Woomer, P.1994. L. **Most Probable Number
Counts.** En: Mickelson, S.N. (Ed.), Methods of
Soil Analysis. Part 2. Microbiological and

Biochemical Properties. E.E.U.U. Soil Society of
America, Inc. p. 60-78.

Zomoza,R.,Guerrero,C.,Mataix,S.J.,Arcenegui,V.,García
F.,Mataix B.J., 2006. **Assesing air-drying and
rewetting pre-treatment effect on some enzyme
activities under Mediterranean conditions.** Soil Biol.
Biochem. 38,2125-2134.