



USO DE MICROCALORIMETRÍA ISOTÉRMICA PARA CARACTERIZAR OXALOTROFÍA EN SUELOS TROPICALES AFECTADOS POR CAMBIO CLIMÁTICO

Daniel Bravo ✉

Laboratoire de
Microbiologie, Université
de Neuchâtel, Switzerland,

✉
dabravob@gmail.com

Palabras clave:
Termodinámica
microbiana, oxalotrofia,
ruta oxalato-carbonato,
suelos ferralíticos, cambio
climático

RESUMEN

La microcalorimetría isotérmica (IMC) es una técnica *in stato nascendi* en la microbiología de suelos. El objetivo de esta investigación fue aplicar dicha técnica para caracterizar actividad oxalotrófica implicada en la ruta oxalato-carbonato (OCP) en suelos tropicales afectados por cambio climático. Las bacterias oxalotróficas en suelos, contribuyen a disminuir las altas concentraciones de CO₂. Sin embargo, no se conocían técnicas que permitieran determinar la actividad oxalotrófica *in vitro* e *in situ*. Por ello, la IMC es única, porque permitió monitorear en función del tiempo, tanto la actividad como el producto (dinámica entálpica) de oxalótrofos en suelos tropicales de Bolivia, India y Camerún. Diez bacterias oxalotróficas de los tres suelos fueron seleccionadas para comparar su capacidad oxalotrófica por IMC. Por otro lado, en suelo muestreado en Camerún suplementado con oxalato, se analizó por IMC la actividad oxalotrófica. Tanto las bacterias como el suelo, fueron monitoreados en un microcalorímetro TAM48, y comparados con controles negativos. Los termogramas fueron interpretados cinéticamente. *Variovorax soli* (Camerún) fue más rápida en degradar oxalato (0.240 μmol.h⁻¹), y *Bacillus sp.* (Bolivia), fue la más lenta (0.024 μmol.h⁻¹). También se determinó que *V. soli* y *Terrabacter sp.* (India) son las de más rápido y lento crecimiento, respectivamente. En suelo, la actividad aumentó junto con la comunidad oxalótrofa (10⁹ copias gen frc x g⁻¹ suelo), con respecto al control (10² copias gen frc x g⁻¹ suelo). Se concluyó por IMC que la actividad oxalotrófica en suelos de Camerún es la más eficiente vía OCP con relación a India y Bolivia.

USE OF ISOTHERMAL MICROCALORIMETRY TO CHARACTERIZE OXALOTROPHISM IN TROPICAL SOILS AFFECTED BY CLIMATE CHANGE

Key words: Microbial thermodynamics, oxalotrophy, oxalate-carbonate pathway, ferralitic soils, climate change.

SUELOS
ECUATORIALES
44 (1): 11-21

ISSN 0562-5351

ABSTRACT

Isothermal microcalorimetry (IMC) is a *in stato nascendi* technique used in soil microbiology. This study aims to use IMC to characterize oxalotrophic activity implied in the oxalate-carbonate pathway (OCP) in tropical soils affected by climate change. Thus, soil oxalotrophic bacteria contribute to decrease high concentrations of CO₂. However, it was not known any technique to determine oxalotrophic activity *in vitro* nor *in situ*. Therefore, IMC is quite useful, because it allowed monitoring in function of time both, activity and metabolic product (enthalpic dynamics), from oxalotrophic bacteria in tropical soils from Bolivia, India, and Cameroon.

Ten oxalotrophic strains belonging to those soils were selected to compare their oxalotrophic capability using IMC. In addition, soil sampled from Cameroon with oxalate was analyzed to measure oxalotrophic activity. Both, bacteria and soil samples were monitored using a TAM48 microcalorimeter, and compared with negative controls. The thermograms were interpreted kinetically. *Variovorax soli* (Cameroon) was the fastest calcium oxalate degrader (0.240 μmol.h⁻¹), whereas *Bacillus sp.* (Bolivia) was the lowest (0.024 μmol.h⁻¹). As well, it was determined that *V. soli* and *Terrabacter sp.* (India), were the fastest and lowest growing bacteria, respectively. In soil, the activity was increased together with oxalotrophic community (10⁹ copies gen frc x g⁻¹ soil), in comparison with the control (10² copies gen frc x g⁻¹ soil). The conclusion is that, thanks to isothermal microcalorimetry it was possible to determine that oxalotrophic activity in a tropical soil belonging to Cameroon is more efficient via OCP compared with those soils analyzed in Bolivia and India.

INTRODUCCIÓN

La aceleración en el incremento de CO₂ en los últimos 250 años desde la revolución industrial ha superado los niveles críticos de supervivencia de los sistemas biológicos, por encima de los 400 ppm, valor no registrado sino hasta hace 30 millones de años (Hansen, *et al.*, 2012). En este sentido, la urgencia de buscar sistemas biológicos auto-regulables en el flujo metabólico del CO₂ hacia la conversión de compuestos geoestables es una prioridad. Actualmente se acepta que el cambio climático global es un hecho, y es debido principalmente al excesivo incremento de CO₂ por intervención antrópica (Morales, *et al.*, 2014). Una de las alternativas naturales que se ha explorado recientemente es el uso del sistema natural bioquímico oxalato-carbonato, explorado en bosques de Bolivia, o Camerún (Braissant, *et al.*, 2002, Cailleau, *et al.*, 2014). En dicha ruta biogeoquímica confluyen tres sistemas biológicos: i.) plantas oxalogénicas, ii.) bacterias oxalotróficas, y iii.) hongos saprófitos. En una ruta activa, la termodinámica microbiana y el análisis de flujos metabólicos deberían dar indicios sobre cómo el proceso fija el carbono proveniente de CO₂ atmosférico en biomoléculas como el oxalato de origen vegetal, hasta ser precipitado en carbonato secundario en suelos ácidos tropicales.

Esta alternativa denominada OCP por sus siglas en inglés (Oxalate-carbonate pathway) ocurre particularmente en biotopos terrestres, pese a que ha sido descrita muy recientemente (Verrecchia, *et al.*, 2006) y por tanto poco estudiada. En Colombia, ningún estudio se ha reportado hasta este momento.

Para una descripción mayor de la ruta OCP el lector puede referirse a Martin, *et al.*, 2012. Brevemente, la ruta oxalato-carbonato inicia con la fotosíntesis en plantas que producen oxalato (organismos oxalogénicos) inducidas por una alta concentración de pCO₂. El oxalato producido puede presentarse en forma de whewellita (forma mono) o weddellita (di-hidratada) (Franceschi & Nakata, 2005). Al ser tóxico en altas concentraciones, este compuesto es liberado mediante hongos (saprófitos) presentes tanto en litera como en diferentes estructuras de la planta. Una vez liberado el oxalato, un grupo particular de bacterias lo consume (oxalótrofos). La importancia de los oxalótrofos es que incrementan el anión carbonato, alcalinizando el suelo, permitiendo

así la precipitación de carbonato de calcio secundario, denominado calcita (Aragno & Verrecchia, 2012).

Poco se conocía sobre la actividad metabólica del grupo funcional de bacterias oxalotróficas en el proceso de conversión de oxalato a carbonato en ambientes tropicales. Este tópico debe ser explorado y de gran interés para los países de la zona intertropical, debido que es en dichas regiones donde la perspectiva de los efectos de cambio climático es más negativa e inminente (Blamey, *et al.*, 2010). Debido a que la ruta fue recientemente descrita, se desconocía la diversidad microbiana (p.e. mediante qPCR de comunidad oxalotrófica) asociada a suelos tropicales, donde la confluencia de CO₂ atmosférico ha aumentado hasta un 3% (Raupach, *et al.*, 2007), particularmente en países como Bolivia, India y Camerún, como principales regiones de la zona de convección intertropical, donde los cambios abruptos de clima por sesión se han registrado como consecuencia del incremento de gases de invernadero (Ivanochko, *et al.*, 2005). Parte del desconocimiento de la diversidad y su función en la ruta se debió a la ausencia de una técnica que permitiera determinar el consumo exacto de oxalato debido a una población particular, ya que la cromatografía líquida HPLC y la colorimetría por actividad oxalato-oxidasa (Schilling & Jellison, 2004, Svedruzic, *et al.*, 2005), lo hacen de forma indirecta y poco reproducible.

En este manuscrito se resalta la importancia de introducir la microcalorimetría isotérmica (IMC) en Colombia particularmente en la microbiología de suelos. Pese a que esta técnica termodinámica ha sido incorporada en trabajos termodinámicos de cinética farmacología en Europa, tan solo hace dos décadas se incorporó en el campo de la biología aplicada (Wadsö, *et al.*, 2002). De hecho, en microbiología de suelos tan solo hace una década la IMC fue incorporada (Barros, *et al.*, 2003). Es así como en los últimos años la IMC se ha extendido a otras áreas como la agricultura, la medicina y la biotecnología (Braissant, *et al.*, 2013). En Colombia no existen reportes de uso de la microcalorimetría en microbiología. La IMC en el caso de esta disciplina científica, permite medir el calor producido por bacterias, debido a biomasa y consumo de fuentes de carbono, como el oxalato (Bravo, *et al.*, 2011, Braissant, *et al.*, 2013), determinándose crecimiento y actividad total de la microbiota.

La idea de esta investigación, llevada a cabo en suelos tropicales de tres continentes, fue usar la técnica IMC para determinar actividad oxalotrófica tanto de microorganismos aislados, como en comunidad total de suelo *in situ*. Sin embargo, para la segunda parte fue necesario complementar la IMC con otra técnica cuantitativa de biología molecular (qPCR). Para comprender el uso de la IMC en estudios de microbiología de suelos el lector puede referirse a: Wadsö, *et al.*, 2009; Maskow, *et al.*, 2010; Bravo, *et al.*, 2011 y Braissant, *et al.*, 2013. Para conocer más sobre la técnica qPCR del gen *frc* que codifica para la enzima formil-CoA transferasa en bacterias oxalotróficas, el lector puede referirse a Khammar, *et al.*, 2009 y Bravo, *et al.*, 2013a. Mediante esas dos técnicas, IMC y qPCR, se sugiere al final de este manuscrito el sistema OCP más eficiente en la búsqueda de potenciales soluciones al cambio climático en suelos tropicales por secuestro de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de muestreo

Se realizó un screening de bacterias oxalotróficas en muestras de suelo colectadas a menos de un metro de árboles oxalogénicos en Bolivia (*Terminalia oblonga*), India (*Terminalia bellirica*) y Camerún (*Millicia excelsa*). En cada caso, se realizaron perfiles edafológicos de un metro de profundidad en los cuales se colectaron 11 muestras de suelo por perfil. Las bacterias oxalotróficas fueron aisladas en medio Schlegel AB suplementado con 4g.L^{-1} de oxalato de calcio como única fuente de carbono y energía (Braissant, *et al.*, 2002, Bravo, *et al.*, 2013b). Los aislamientos fueron incubados a 20°C durante 8 semanas. Las colonias aisladas y purificadas que presentaron halo de consumo de oxalato en medio sólido, fueron seleccionadas para medir su actividad oxalotrófica por microcalorimetría isotérmica.

Selección de cepas bacterianas y de suelo a analizar

A partir de las bacterias aisladas de muestras de suelo provenientes de Bolivia, India y Camerún, 10 cepas fueron seleccionadas por sus mayores halos de consumo de oxalato ($\geq 0.4\text{ cm}$) y por su mejor tiempo de incubación, puesto que algunas crecían en 8 días, mientras otras, podían tardar hasta 2 meses en crecer en medio sólido. Por otro lado, se tomó 10 g de suelo rizosférico muestreado en el árbol oxalogénico

Millicia excelsa en Camerún, para monitorear la actividad oxalotrófica y de esta manera demostrar que la técnica IMC funciona para estudios de suelos *in situ*. Paralelamente, esta técnica calorimétrica fue comparada con los valores de cuantificación de comunidad oxalotrófica mediante la técnica molecular qPCR del gen *frc* por extracción de ADN total en dicho suelo. Once extracciones de ADN fueron realizadas a partir de 1 g de las muestras de suelo, para la amplificación y cuantificación del gen *frc* que codifica para la enzima formil-CoA transferasa, una enzima importante en el metabolismo oxalotrófico (Khammar *et al.*, 2009). Las extracción de ADN se realizaron según el protocolo del kit (MoBio PowerSoil DNA extraction kit, California, US). La amplificación del gen *frc* se realizó según el protocolo ajustado en estudios anteriores en oxalótrofos (Khammar, *et al.*, 2009, Bravo, *et al.*, 2013a).

Microcalorimetría isotérmica (IMC) y PCR cuantitativa (qPCR)

Las bacterias fueron inoculadas en ampollitas de vidrio de 4mL con 2mL de medio inclinado sólido Angle (Angle, *et al.*, 1991) suplementado con oxalato de potasio (4 g.L^{-1}), de acuerdo con la metodología ya descrita para este gremio bacteriano (Bravo, *et al.*, 2011). Se utilizó un microcalorímetro TAM III (TA instruments, Eschborn, Germany), equipado con 48 canales en condiciones isotérmicas (Braissant, *et al.*, 2010). Después de incubación se inició el monitoreo del consumo de sustrato en el tiempo. Simultáneamente, 3 g de suelo, fueron dispuestos en ampollitas de vidrio estéril por triplicado suplementado con la misma concentración de oxalato de potasio en medio Angle usado en el primer lote de bacterias. El monitoreo se realizó bajo las mismas condiciones isotérmicas. Una cepa de *Escherichia coli* K12 fue usada como control negativo (Sahin, 2003, Bravo, *et al.*, 2011). La cuantificación de la comunidad oxalotrófica total en la muestra de suelo de Camerún, fue determinada por PCR cuantitativa (qPCR) (Khammar, *et al.*, 2009). Para ello, se usó como “template” el ADN extraído de las muestras de suelo. El master-mix se preparó de acuerdo con el protocolo del kit (SYBR Green PCR kit, Qiagen, GmbH, Konstanz, Germany). Los productos qPCR se obtuvieron en un Rotor-Gene 3000-A (Corbett Life Science, Melbourne, Australia). Esta técnica molecular, permitió comparar los estándares del gen *frc* obtenidos a partir de ADN de *Methylobacterium extorquens* AM1

con la cantidad de copias de dicho gen encontradas en la muestra compuesta de suelo, tanto en el perfil edafológico, al lado del árbol oxalotrófico, como en un suelo control (sin influencia oxalotrófica), para determinar el efecto que tiene el suplir la fuente de oxalato de potasio (KOx) en el suelo y cómo altera este nutriente la comunidad oxalotrófica *in situ*. Esto permitió mejorar el análisis de los resultados de IMC con la comunidad en suelo, determinando la sensibilidad de dicha técnica calorimétrica en estudios *in situ*, algo que ninguna técnica ha ofrecido hasta el momento en microbiología de suelos.

Análisis de datos

Los termogramas obtenidos a partir de la comparación de cepas bacterianas en triplicado, fueron utilizados para determinar la velocidad de consumo de oxalato como fuente de carbono. Para ello se integró los datos de flujo de calor en Julios, unidad usada para sistemas biológicos (Braissant, *et al.*, 2013). Los termogramas fueron graficados para comparar la capacidad de degradación de KOx en las bacterias analizadas. Para determinar la eficiencia de la técnica IMC *in situ*, se correlacionó mediante un scatterplot los termogramas del suelo con las copias de gen *frc* obtenidas por qPCR tanto del perfil edafológico realizado al lado del árbol, como los de suelo estéril (control negativo).

RESULTADOS

El screening de bacterias permitió obtener un pool de diez bacterias oxalotróficas, con un halo de consumo considerable para el análisis de microcalorimetría isotérmica (halo ≥ 0.4 cm, ver Tabla 1). Este pool de bacterias fue identificado mediante la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, así como mediante pruebas bioquímicas (GEN III MicroPlate for both Gram-negative & Gram-positive bacteria, BIOLOG, CA, US) y por su morfología de colonia y coloración de Gram (DigiMicroscope USB Reflecta GmbH, Rottenburg, Germany).

Los parámetros cinéticos de crecimiento como tasa de crecimiento (μ) y la velocidad de consumo de oxalato (tabla 1), fueron calculados a partir de los termogramas obtenidos por microcalorimetría isotérmica (Fig. 1). Dichos esquemas de flujo de calor, muestran que en las cepas evaluadas, hay dos grupos mayores de crecimiento (dos tipos de formación de biomasa) y consecuente consumo de oxalato (velocidad de consumo y entalpía de formación de producto, principalmente en forma de CO_3^-). Entre las cepas de rápido crecimiento se destacó *Variovorax soli*, aislada de Camerún ($0.26 \mu\text{h}^{-1}$). Por su parte, *Terrabacter* sp., aislada de India, fue una de las cepas más lentas en crecer usando oxalato en medio sólido Schlegel AB ($0.13 \mu\text{h}^{-1}$). Y *Bacillus* sp. fue la cepa que menor capacidad de degradación de KOx presentó ($0.024 \mu\text{mol.h}^{-1}$).

Tabla 1. Diez cepas oxalotróficas que representan la diversidad de la fracción cultivable de oxalótrofos activos en suelos de Bolivia, India, y Camerún, donde el sistema OCP ha sido reportado.

Género oxalotrófico	Bolivia	India	Camerún	$\mu \text{ h}^{-1}$	Con. [KOx]	Halo [cm]
<i>Agrobacterium</i> sp.				0.18	0.209	1.1
<i>Bacillus</i> sp.				0.01	0.024	0.6
<i>Lysobacter</i> sp.				0.13	0.221	0.9
<i>Paenibacillus</i> sp.				0.07	0.117	0.4
<i>Cupriavidus</i> sp.				0.14	0.195	0.8
<i>Sphingomonas</i> sp.				0.19	0.220	0.6
<i>Stenotrophomonas</i> sp.				0.10	0.074	0.5
<i>Terrabacter</i> sp.				0.13	0.150	0.7
<i>Variovorax soli</i>				0.26	0.240	1.3
<i>Xanthomonas</i> sp.				0.09	0.164	0.7

Los valores IMC representan medias de las réplicas. La desviación estándar se omitió, puesto que la variación fue baja ($P < 0.05$). Convenciones: $\mu \text{ h}^{-1}$ = velocidad de crecimiento; Con. [KOx] = velocidad de consumo de oxalato de potasio, expresada en $\mu\text{mol h}^{-1}$. Halo = Halo de consumo de oxalato de calcio en medio sólido Schlegel AB+Caox.

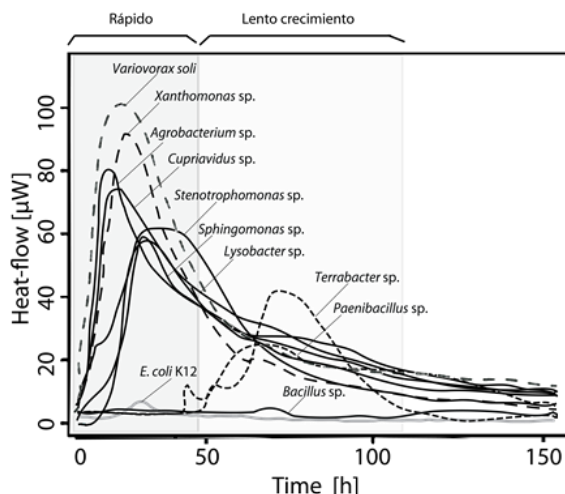


Figura 1. Esquema representativo de curvas de flujo de calor, o termogramas en 10 bacterias oxalotróficas. Nótese los dos grupos de rápido y lento crecimiento utilizando el mismo sustrato (oxalato de potasio). Morfológicamente *Stenotrophomonas* sp. y *Terrabacter* sp., en líneas punteadas, tienen similar formación de colonias pulverulentas y son de crecimiento lento; en tanto que *Variovorax soli* y *Xanthomonas* sp., en líneas punteadas largas, después de 7 días de incubación se tornan mucilaginosas y son de crecimiento rápido.

Los termogramas obtenidos para el caso del suelo analizado de Camerún, muestran una relación directa entre la comunidad total oxalotrófica y su actividad cuando oxalato es suplementado como evento de activación metabólica en dicho suelo. Los datos de qPCR fueron correlacionados con la liberación de calor en el suelo (Fig. 2), como resultado del metabolismo oxalotrófico. La correlación aplicada, muestra que la estimulación que implica la adición de oxalato en suelo estimula al metabolismo de oxalótrofos autóctonos capaces de consumir oxalato y a partir de éste obtener energía de activación (ciclo de Krebs) o sintetizar moléculas *de novo*, como es el caso de los aminoácidos serina y treonina vía formato-sintasa (Blackmore & Quayle, 1968, Dijkhuizen, *et al.*, 1977).

DISCUSIÓN

En este manuscrito, se describe una técnica poco conocida en el campo de la microbiología del suelo en Colombia, como es la microcalorimetría isotérmica. Esta técnica, ha demostrado ser importante para detectar procesos metabólicos a muy bajos rangos, hasta 10 nanowatts de calor producido (Braissant, *et al.*, 2010). La técnica fue introducida en el estudio de

la oxalotrofia tan solo hace un par de años (Bravo, *et al.*, 2011), sin embargo, es necesario explorar más en detalle su utilidad en otro tipo de estudios como las simbiosis o procesos ecológicos entre los sistemas biológicos que contribuyan al ciclaje del CO₂ (Bravo, 2013c), así como en estudios de suelos tropicales donde la ruta OCP pueda ser identificada en nuevas regiones del mundo para aplicación en cultivos sustentables.

En la figura 1 se muestra que es posible determinar el flujo oxalotrófico de bacterias de suelo en bosques tropicales de Bolivia, India y Camerún. La repercusión de este tipo de medida de flujos de calor producidos por crecimiento y consumo de oxalato, permite inferir su potencial capacidad metabólica *in situ*, así como también, permite determinar los grupos taxonómicos cultivables con mayor capacidad para degradar oxalato y en qué tipos de bosque. La técnica IMC permitió en este caso, determinar que *Variovorax soli* aislado de suelos de Camerún, es el más importante ecotipo en dichos suelos para el proceso biogeoquímico en lo que respecta a la fracción cultivable de microorganismos presentes. Esto corrobora que ecotipos de la clase alfa-Proteobacteria son importantes en cortos períodos de tiempo para la degradación de ácidos dicarboxílicos como el oxalato, presentes en suelos forestales (Zhou, *et al.*, 2011). Sin embargo, desde un punto de vista termodinámico, el grado de entalpía en el flujo de nutrientes como el oxalato en la litera, es tan heterogéneo como la arquitectura misma del suelo tropical. Este hecho es importante a tener en cuenta cuando se observa el aprovechamiento de oxalato por bacterias de las clases Actinobacteria y Firmicutes. Representantes de estas dos clases, como lo son *Terrabacter* sp. y *Bacillus* sp., aisladas de India y Bolivia, respectivamente, suponen un panorama más realista de la conversión de oxalato en carbonato vía metabolismo oxalotrófico. En el suelo, los procesos de bioconversión son cuantificables en largos períodos de tiempo (incluso en tiempo geológico), por lo cual, es lógico suponer que varias entidades microbianas en el suelo, actúan más lentamente, pero con buenos rendimientos de degradación, como ocurre con *Terrabacter* sp. El caso de *Bacillus* sp. se puede comprender desde la entalpía del proceso mismo en su hábitat natural. Este tipo de microorganismos genera mayores rendimientos de biomasa y de potencial de energía libre de Gibbs estándar (ΔG°) en condiciones micro-aerofílicas (Vor,

et al., 2002, von Stockar, *et al.*, 2006), que en cualquier otra condición, permitiéndole sobrevivir óptimamente (p.e. liberando -328 kJ de energía por mol de oxalato y par de e⁻) bajo un sistema saturado de oxalato (4 g.L⁻¹).

En la figura 2, se muestra la alta correlación que existe entre la actividad oxalotrófica en suelos analizados por IMC y el aumento en la comunidad oxalotrófica *in situ* por qPCR. Más allá que la matriz de suelo sea más compleja para analizar debido a sus numerosos nichos dentro del hiperespacio microbiano de Hutchinson (Wimpenny, 1992), la IMC permitió en este estudio, diferenciar flujo oxalotrófico entre un suelo con adición de KOx y otro control. El hecho de poder demostrar mayores niveles entálpicos en la liberación de calor producida por actividad oxalotrófica total *in situ* cuando se adiciona oxalato, es un gran aporte para la microbiología, como lo ha

sido el uso de otros sustratos en suelo, como el caso de la glucosa (Wadsö, 2009). También demuestra que la IMC es compatible con otras técnicas de biología molecular (como la qPCR), para incrementar el poder analítico de metabolismo y riqueza de la microbiota oxalotrófica asociada a un suelo en particular.

En suelos ferralíticos, como los muestreados en la zona subtropical de Camerún, en la región de Bertoua, ocurren diversos procesos metabólicos con varios productos y transferencia energética entre sistemas biológicos (Martin *et al.*, 2012). Sin embargo, lo interesante de haber usado la microcalorimetría isotérmica es que se pudo sobre-expresar el metabolismo oxalotrófico que en ese nicho ocurre, sobre cualquier otro, con sus repercusiones en la formación de productos a largo plazo, como por ejemplo, la precipitación de carbonato inducida por degradación biológica del oxalato (Figura 3).

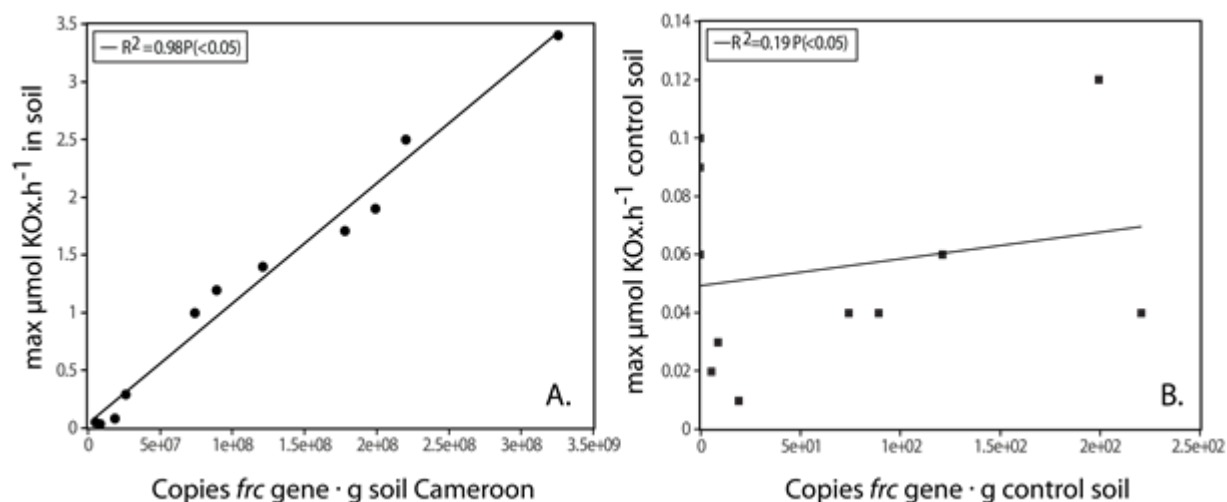


Figura 2. Scatterplots de la regresión lineal entre **A.** los termogramas correspondientes a la muestra compuesta de suelos vs. el número de copias del gen *frc* obtenido por qPCR de la comunidad bacteriana oxalotrófica; y **B.** los termogramas del suelo control (*a priori* sin influencia oxalotrófica) y la comunidad oxalotrófica también por qPCR. Nótese que existe una correlación positiva entre la adición/estimulación del suelo con oxalato de potasio, con la actividad metabólica (máximo punto de consumo en μmoles de KOx h⁻¹ por acción oxalotrófica) y la proliferación de comunidad oxalotrófica *in situ*.

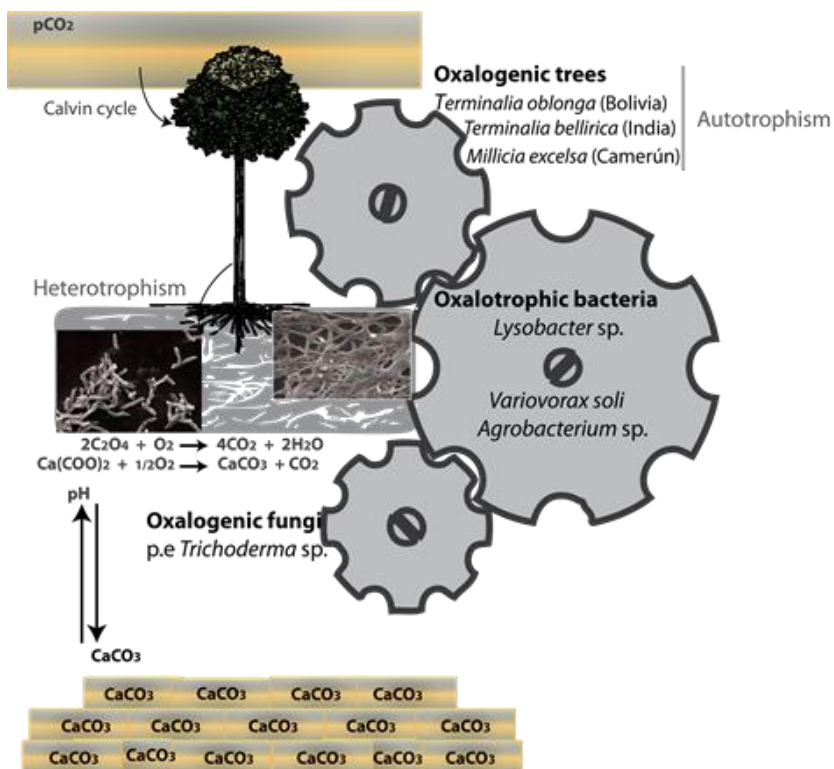


Figura. 3. Ruta biogeoquímica oxalato-carbonato con potencial acumulación de CO₂ en carbonato de calcio (CaCO₃), en el cual, la microcalorimetría isotérmica permite indagar el rol y función metabólica de individuos o comunidad bacteriana de suelo, quienes conforman el gran engranaje central que activa la ruta a nivel global.

Es tanto así, que la formación de carbonatos a partir de la biotransformación del oxalato se ha descrito como una contribución natural significativa al secuestro de CO₂ atmosférico global (Gadd, 2008), y que en este manuscrito se cuantifica en su primera etapa, la oxalotrofia. De hecho, en la segunda etapa, un análisis del porcentaje de carbonatos obtenidos en las mismas muestras de suelos (datos no mostrados) reveló un patrón de abundancia similar a los observados tanto en el suelo con influencia oxalogénica, como en el suelo control.

De esta manera, la microcalorimetría, se destaca en la ruta OCP, porque es una técnica que cuantifica el núcleo del proceso (engranaje central, Fig. 3), no es una técnica destructiva, y por tanto no modifica el sistema suelo objeto de estudio sino que al contrario, permite inferir flujos metabólicos a partir de la termodinámica en la formación de calor a una escala muy pequeña, con repercusiones en un sistema geoquímico con gran repercusión en el cambio climático.

La oxalotrofia es un fenómeno no relacionado filogenéticamente y por tanto ubicuo e independiente

de la formación de suelo; es más dependiente de la interacción bacteria oxalotrófica-planta oxalogénica. Independiente a ello, la técnica de microcalorimetría es general y puede medir cualquier actividad biológica o química, con cualquier tipo de microorganismo, de tipo de suelo, de composición fisicoquímica. La premisa para usar IMC es: si el objeto de estudio posee materia, es decir átomos en interacción, es medible por su calor. Esa es la única condición para poder medir cualquier proceso termodinámico.

No tiene que ver con que el suelo de Bolivia, India o Camerún sea idéntico o no en su neogénesis entre sí o con respecto al suelo de Colombia para futuras aplicaciones en el país. En este estudio, el objetivo no fue comparar los suelos estudiados con los colombianos; sino más bien fue medir parcialmente mediante IMC la transformación de un compuesto como pCO₂ en un producto como CaCO₃ a través de una ruta biogeoquímica que tiene como núcleo la actividad oxalotrófica microbiana. La aproximación es parcial pues no se describen las concentraciones de pCO₂ en cada sitio muestreado, aunque precisa, pues mide valores termodinámicos de dicha transformación in situ.

El calor para la actividad de cada bacteria o del suelo medido, presentado como el cambio de entalpía en cada proceso, es una aproximación termodinámica para saber cuántas moles de pCO_2 han sido transformadas a $CaCO_3$ por vía oxalotrófica microbiana en cada suelo tropical aquí muestreado. Este proceso es independiente al tipo de suelo en cualquier país que se desee evaluar y la medida es particular en el resultado que se obtenga de actividad microbiana como consecuencia del potencial de cambio entálpico que posea cada población microbiana en cada suelo de los países de la zona intertropical. En ese sentido, la IMC es un fingerprint de la actividad microbiana en un proceso particular, como en este caso la oxalotrofia.

La perspectiva de implementación de la microcalorimetría en estudios de suelos de Colombia, trasciende la neogénesis o tipo de suelo, el uso del suelo y los factores abióticos o bióticos que en él se presenten. La IMC permite ampliar el conocimiento o incluso explorar nuevos conceptos en las relaciones

ecológicas que puedan presentarse en los suelos, mediante diferentes disciplinas que lo estudien.

En este sentido, los valores de calor, por acción biológica o por procesos fisicoquímicos pueden ser caracterizados por su flujo de calor a través del tiempo. La agricultura (Fig. 4c,d) es uno de los campos donde mayor repercusiones puede generar, por la incorporación de cálculos termodinámicos (Fig. 4a) de poblaciones conocidas (Fig. 4b) con técnicas complementarias (p.e. por qPCR, GC-MS, HPLC-MS, FTIR-MS, MALDITOF-MS) en cultivos agrícolas controlados (Fig. 4c) con prospección hacia cultivos reguladores de CO_2 atmosférico local.

Así se podrían explorar varios conceptos, como la transferencia de energía del suelo al producto agrícola, la capacidad de intercambio catiónico, o de absorción y retención de agua de cualquier suelo, o el nivel energético de transformación y secuestro de carbono, o retención de cualquier otro elemento en el ciclo de nutrientes.

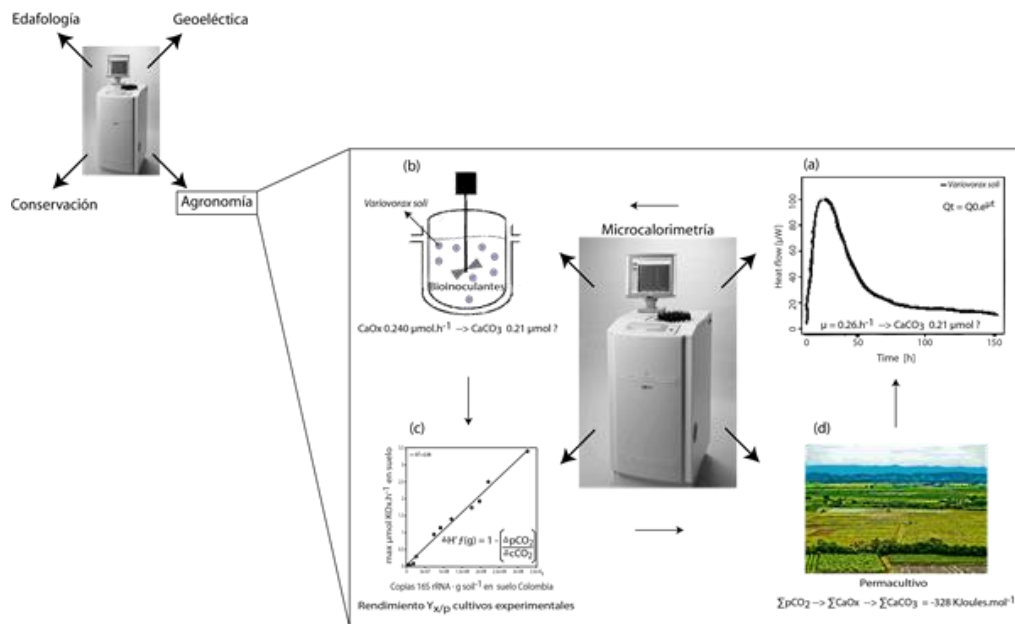


Figura 4. Esquema incorporación de la microcalorimetría en estudios de suelos en Colombia. En el caso de la agricultura ecológica, al utilizar la técnica IMC se determina el efecto termodinámico del secuestro de carbono en ambientes que usen bacterias oxalotróficas. (a). Determinación de actividad oxalotrófica en cualquier tipo de suelos por IMC mediante la curva exponencial modificada de Gompertz $Q_t=Q_0 \cdot e^{g \cdot t}$ (Braissant *et al.*, 2013). (b). Uso de poblaciones bacterianas en producción industrial de bioinoculantes, teniendo en cuenta la velocidad de consumo o de producción de metabolitos mediante IMC, calculando las moles de carbonato producido por el uso la población seleccionada. (c). Determinación de rendimientos de producción ($Y_{x/p}$) de los inoculantes microbianos seleccionados por IMC en cultivos agrícolas controlados. En este caso, se cuantificará el CO_2 transformado como función del cambio de entalpía por actividad microbiana del inoculante. “g” representa la función modificada de Friedlingstein *et al.* (2003) para calcular la ganancia de carbono a partir de CO_2 . $\Delta H'$ = Cambio de entalpía por actividad microbiana medida por IMC; ΔpCO_2 y ΔcCO_2 representan los cambios de CO_2 atmosférico a calcular en el cultivo agrícola, en la transferencia de carbono hasta el carbonato en función del tiempo. Un valor positivo de “g” representa un feedback positivo en el ciclo del carbono por secuestro a partir del CO_2 atmosférico. (d). Diseño de permacultivos en los cuales la sumatoria de rendimientos en la transformación de CO_2 a carbonato es medido y evaluado como estrategia local contra el cambio climático.

CONCLUSIONES

Gracias a la microcalorimetría isotérmica, se pudo determinar la velocidad de consumo de oxalato, la velocidad de crecimiento y parámetros cinéticos en aislamientos autóctonos de suelos tropicales muestreados en Bolivia, India y Camerún. Además se pudo valorar por comparación con otra técnica molecular la abundancia y actividad de oxalótrofos en suelo. Se pudo establecer, que el sistema OCP de Camerún es el más activo dado su alto flujo oxalotrófico mediante la población *Variovorax soli*. La IMC permitió establecer tanto en las 10 cepas evaluadas, como en suelo, actividad oxalotrófica con precisión a nivel de 100 microwatts de calor, nivel de detección que permitiría incluso cuantificar calor producido por virus presentes en suelo. El interés radica en que esta herramienta analítica sea parte de los métodos diagnósticos en los grupos de investigación en Colombia que trabajen con microbiología de suelos.

La discusión en este manuscrito, se enfocó en los parámetros experimentales que se pueden obtener y cómo se pueden asociar con otras técnicas de laboratorio, aplicando aspectos termodinámicos en la determinación de eficiencia metabólica de procesos complejos como la ruta OCP en bosques tropicales que contribuya al secuestro de CO₂. Futuras investigaciones deberán enfocarse en determinar la ruta OCP, la capacidad oxalotrófica en suelos de Colombia, el porcentaje transformado en calcita y el rendimiento de transformación de CO₂, todos analizados por microcalorimetría isotérmica.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Pilar Junier, por la supervisión en la Universidad de Neuchâtel, en Suiza. También un agradecimiento especial al Dr. Olivier Braissant, director del centro de investigación en biomecánica y biocalorimetría en Basel, en el hospital universitario de Basel, Suiza, quien permitió realizar este estudio en su laboratorio usando sus microcalorímetros. Finalmente al programa FP7- CO₂SolStock, de la comunidad Europea, mediante acuerdo No., 226306, así como al Fondo Nacional Suizo para la investigación FNS por la financiación regional. De igual manera, quiero agradecer al (la) revisor(a) anónimo(a).

REFERENCIAS

- ANGLE JS., MCGRATH SP., CHANEY RL. (1991). New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Appl Environ Microbiol* 57: 3674-3676.
- ARAGNO M., VERRECCHIA E. (2012). The oxalate-carbonate pathway: A reliable sink for atmospheric CO₂ through calcium carbonate biomineralization in ferralitic tropical soils. Eds: *Microorganisms in environmental management*, Springer Verlag, Netherlands.
- BARROS N., FEIJOO S., FERNANDEZ S. (2003). Microcalorimetric determination of the cell specific heat rate in soils: relationship with the soil microbial population and biophysical significance. *Thermochim Acta* 406: 161-170.
- BLACKMORE MA., QUAYLE JR. (1968). Choice between autotrophy and heterotrophy in *Pseudomonas oxalaticus*. Growth in mixed substrates. *Biochem J* 107: 705-713.
- BLAMEY J., ANTHONY EJ., WANG J., FENNELL PS. (2010). The calcium looping cycle for large-scale CO₂ capture. *Prog Energ Combust* 36: 260-279.
- BRAISSANT O., VERRECCHIA EP., ARAGNO M. (2002). Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated? *Naturwissenschaften* 89: 366-370.
- BRAISSANT O., WIRZ D., GOPFERT B., DANIELS AU. (2010). Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol Lett* 303: 1-8.
- BRAISSANT O., BONKAT G., WIRZ D., BACHMANN A. (2013). Microbial growth and isothermal microcalorimetry: Growth models and their application to microcalorimetric data. *Thermochim Acta* 555: 64-71.
- BRAVO D, BRAISSANT O., SOLOKHINA A., CLERC M., DANIELS AU., VERRECCHIA E., JUNIER P. (2011). Use of an isothermal microcalorimetry assay to characterize microbial oxalotrophic activity. *FEMS Microbiol Ecol* 78: 266-274.
- BRAVO D., MARTIN G., DAVID MM., CAILLEAU G., VERRECCHIA E., JUNIER P. (2013a). Identification of active oxalotrophic bacteria by Bromodeoxyuridine DNA labeling in a

- microcosm soil experiment. *FEMS Microbiol Lett* 348: 103-111.
- BRAVO D., CAILLEAU G., BINDSCHEDLER S., SIMON A., JOB D., VERRECCHIA E., JUNIER P. (2013b). Isolation of oxalotrophic bacteria able to disperse on fungal mycelium. *FEMS Microbiol Lett* 348: 157-166.
- BRAVO D. (2013c). Interacciones hongo-bacteria. La sinergia detrás de la ruta oxalato-carbonato. *UGCiencia* 19: 25-32.
- BRAISSANT O., BONKAT G., WIRZ D., BACHMANN A. (2013). Microbial growth and isothermal microcalorimetry: Growth models and their application to microcalorimetric data. *Thermochim Acta* 555: 64-71
- CAILLEAU G., MOTA M., BINDSCHEDLER S., JUNIER P., VERRECCHIA EP. (2014). Detection of active oxalate-carbonate pathway ecosystems in the Amazon Basin: Global implications of a natural potential C sink. *Catena* 116: 132-141.
- DIJKHUIZEN L., WIERSMA M., HARDER W. (1977). Energy production and growth of *Pseudomonas oxalaticus* OX1 on oxalate and formate. *Arch Microbiol* 115: 229-236.
- FRANCESCHI VR., NAKATA PA. (2005). Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annu Rev Plant Ecol* 56: 41-71.
- FRIEDLINGSTEIN P., DRUFESNE JL., COX PM., RAYNER P. (2003). How positive is the feedback between climate change and the carbon cycle?. *Tellus B* 55: 692-700
- GADD GM. (2008). Bacterial and fungal geomicrobiology: a problem with communities? *Geobiology* 6: 278-284.
- HANSEN J., SATO M., KHARECHA P. (2012). Target atmospheric CO₂: Where should humanity aim? *Op Atm Scie J* 2: 217--231.
- IVANOCHKO TS., GANESHRAM RS., BRUMMER GJ., GANSSEN G., JUNG SJ., MORETON SG., KROON D. (2005). Variations in tropical convection as an amplifier of global climate change at the millennial scale. *Earth Planet Sc Lett* 235: 302-314.
- KHAMMAR N., MARTIN G., FERRO K., JOB D., ARAGNO M., VERRECCHIA E. (2009). Use of the *frc* gene as a molecular marker to characterize oxalate-oxidizing bacterial abundance and diversity structure in soil. *J Microbiol Meth* 76: 120-127.
- MARTIN G., GUGGIARI M., BRAVO D., ZOPFI J., CAILLEAU G., ARAGNO M., JOB D., VERRECCHIA E., JUNIER P. (2012). Fungi, bacteria and soil pH: the oxalate-carbonate pathway as a model for metabolic interaction. *Environ Microbiol* 14: 2960-2970
- MASKOW T., KEMP R., BUCHHOLZ F., SCHUBERT T., KIESEL B., HARMS H. (2010). What heat is telling us about microbial conversions in nature and technology: from chip-to megacalorimetry. *Microb Biotech* 3: 269-284.
- MORALES F., PASCUAL I., SÁNCHEZ-DÍAZ M. (2014). Methodological advances: using greenhouses to simulate climate change scenarios. *Plant Sci* 3: 1-11.
- RAUPACH MR., MARLAND G., CIAIS P., LE QUERE C., CANADELL JG., KLEPPER G., FIELD CB. (2007). Global and regional drivers of accelerating CO₂ emissions. *Pnas* 104: 10288-10293.
- SAHIN N. (2003). Oxalotrophic bacteria. *Res Microbiol* 154: 399-407.
- SCHILLING J., JELLISON J. (2004). High-performance liquid chromatographic analysis of soluble and total oxalate in Ca- and Mg-amended liquid cultures of three wood decay fungi. *Holzforschung* 58: 682-687
- SVEDRUZIĆ D., JONSSON S., TOYOTA CG., REINHARDT LA., RICAGNO S., LINDQVIST Y., RICHARDS NG. (2005). The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 433: 176-192.
- VERRECCHIA EP., BRAISSANT O., CAILLEAU G. (2006). The oxalate-carbonate pathway in soil carbon storage: the role of fungi and oxalotrophic bacteria in biogeochemical cycles. Eds: *Fungi in biogeochemical cycles*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- VON STOCKAR U., MASKOW T., LIU J., MARISON IW., PATIÑO R. (2006). Thermodynamics of microbial growth and metabolism: An analysis of the current situation. *J Biotechnol* 121: 517-533
- VOR T., DYCKMANS J., FLESSA H., BEESE F. (2002). Use of microcalorimetry to study

- microbial activity during the transition from oxic to anoxic conditions. *Biol Fert Soils* 36: 66-71.
- WADSÖ I. (2002). Isothermal microcalorimetry in applied biology. *Thermochim Acta* 394: 305-311.
- WADSÖ I. (2009). Characterization of microbial activity in soil by use of isothermal microcalorimetry. *J Therm Anal Calorim* 95: 843-850.
- WIMPENNY JT. (1992). Microbial systems. *Advances in microbial ecology*, Eds: Marshall KC., Springer Verlag, US.
- ZHOU J., DENG Y., LUO F., HE Z., YANG Y. (2011). Phylogenetic molecular ecological network of soil microbial communities in response to elevated CO₂. *mBio* 4: 1-8.