



ESTUDIO COMPARATIVO DE BACTERIAS OXALOTRÓFICAS EN BOSQUES TROPICALES DE COLOMBIA, BOLIVIA, CAMERÚN Y LA INDIA

Daniel Bravo^{1,2}, Pablo Fernández²✉

¹Laboratoire de Microbiologie, Université de Neuchâtel, Suiza.

²Laboratorio de biotecnología microbiana, Universidad de Nariño, Colombia

✉
dabravob@gmail.com

Palabras clave:
Oxalotrofia, plantas oxalogénicas, gen 16S rRNA, oxalato de calcio, suelos ferralíticos.

RESUMEN

La oxalotrofia es un tipo de metabolismo bacteriano en suelos que ha tomado interés ambiental, desde que fue incorporada a la ruta oxalato carbonato. Por ello, el objetivo de esta investigación fue caracterizar y comparar bacterias oxalotróficas entre los suelos ferralíticos de Colombia, con los de Bolivia, Camerún e India.

Pese a la importancia del grupo funcional, hasta la fecha se desconocía sobre la diversidad de oxalótrofos en suelos tropicales de Colombia. En este estudio, mediante técnicas de cultivo, pruebas bioquímicas (BIOLOG) y moleculares, como la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, se hizo un screening de bacterias oxalotróficas viables de suelos en Colombia, comparándolas con la diversidad en los otros mencionados.

Se identificaron 16 bacterias oxalotróficas en los cuatro suelos. Cuatro de ellas fueron analizadas por su actividad oxalotrófica al consumir oxalato de calcio en medio líquido. Por otro lado, se determinó el pH final del medio como indicador de carbonatogénesis. En Colombia se identificó Bacillus sp. y Serratia sp., siendo Bacilli más predominante (4 de 5) y con mayor degradación (20 mg CaOx.h⁻¹). Entre los otros bosques solo Bolivia presentó cepas Bacilli. El ecotipo Serratia sp. no se identificó en ningún otro bosque. El pH más básico se determinó en Variovorax soli (pH 7.9) de Camerún. Se concluyó que el ecotipo Bacillus sp. es predominante sobre otros oxalótrofos en suelos de Colombia y Bolivia, mientras que las actinobacterias (p.e. Streptomyces) lo son para India. Finalmente, se concluye que Camerún es el ambiente más diverso entre los oxalótrofos comparados.

A COMPARATIVE STUDY OF OXALOTROPHIC BACTERIA IN TROPICAL FOREST FROM COLOMBIA, BOLIVIA, CAMEROON AND INDIA

Key words:
Oxalotrophy, oxalogenic plants, 16S rRNA gene, calcium oxalate, ferralitic soils

ABSTRACT

The oxalotrophy is one of the bacterial metabolisms occurring in soils that have been highlighted in environmental processes since it has been taken into account in the oxalate-carbonate pathway. Thus, this study aims to compare oxalotrophic bacteria characterized in ferralitic soils from Colombia with those from Bolivia, Cameroon, and India.

Although this functional group is relevant, at this point it has been remained unknown the diversity of oxalotrophs in tropical soil from Colombia. In this study, using culturing oxalotrophic isolates, biochemical (BIOLOG) and molecular tools, such as 16S rRNA partial sequentiation, it has been carried out a screening of viable oxalotrophic bacteria from Colombian soils comparing those with diversity found in others.

Sixteen oxalotrophic bacteria belonging to four forest soils studied were identified. Four of them comparing oxalotrophic activity due to calcium oxalate consumption in liquid cultures. Moreover, it has been determined the final pH of the medium, as indicator of carbonatogenesis.

In Colombia it was identified Bacillus sp. and Serratia sp., where Bacilli were the most predominant (4 over 5) and best oxalate degraders (20 mg CaOx.h⁻¹). Within the forest compared, only Bolivia was shown Bacilli strains. The ecotype Serratia sp. was not identified in other forest. The pH was most alkaline in Variovorax soli (pH 7.9) from Cameroon.

It has been concluded, that ecotype Bacillus sp. is more abundant over other oxalotrophs in soils from Colombia and Bolivia, whereas Actinobacteria (i.e. Streptomyces) it was to India. Finally, it was confirmed to Cameroon as the diverse environment to oxalotrophs.

SUELOS
ECUATORIALES
44 (2): 96-105

ISSN 0562-5351

INTRODUCCIÓN

El oxalato es un ácido dicarboxílico producido por plantas y algunos hongos saprofitos (Cromack, *et al.*, 1977, Franceschi & Nakata, 2005) a los cuales se les denomina oxalogénicos. El trofismo es casi exclusivo de microorganismos del suelo, los cuales pueden usarlo como fuente de carbono y energía, por lo cual se les denomina oxalótrofos (Aragno & Verrecchia, 2012). Este es un grupo funcional filogenéticamente no relacionado (Sahin, 2003), constituido por microorganismos quimiorganótrofos aerobios, micro-aerófilos o incluso anaerobios obligados, de las clases Proteobacteria, Bacilli, y Actinobacteria presentes en suelos (Bravo, *et al.*, 2013a, Bravo, *et al.*, 2013b).

Este grupo funcional ha cobrado mucha importancia en los últimos años, tras el descubrimiento de la ruta terrestre biogeoquímica oxalato-carbonato (OCP) (Verrecchia, *et al.*, 2006). En ella, los oxalótrofos catabolizan p.e. oxalato de calcio liberando aniones de $(\text{COO})_2^{2-}$ que son transformados gracias a la enzima oxalil-CoA transferasa. El subproducto de dicha catálisis es reactante para la enzima oxalil-CoA, descarboxilando la molécula y generando formil-CoA e hidrogeniones (Quayle & Keech, 1960). El producto final de dicho metabolismo es, por un lado, formato, para generación de energía y poder reductor; o por otro, CO_2 y agua, cuando el oxalato es totalmente reducido, permitiendo así la formación de carbonato en medio acuoso (Blackmore & Quayle, 1968).

Este metabolismo es observado mediante dos evidencias de la ruta OCP en cultivos líquidos: *i.* la disolución completa del oxalato de calcio y consecuente cambio de color del medio (de blanco a transparente), y *ii.* el cambio de pH de ácido a básico, el cual permite la precipitación de carbonato de calcio a pH 8,5 tanto *in vitro*, como *in situ* (Braissant, *et al.*, 2002, Martin, *et al.*, 2012).

Pese a que se ha avanzado recientemente en el estudio de la diversidad de bacterias oxalótrofas en ambientes tropicales, es incipiente el conocimiento

sobre este grupo funcional en Colombia. Por lo tanto este manuscrito es el primero en publicar resultados de diversidad oxalotrófica en el país. En el presente estudio se identifican bacterias oxalotróficas asociadas a plantas del género *Oxalis* spp en Nariño. Además, se hace una comparación entre la diversidad y actividad oxalotrófica encontrada en Colombia, en la región Andina del departamento de Nariño, con otros suelos tropicales ferralíticos en bosques de Bolivia en el departamento de Saperoco, en Camerún en la provincia de Bertohua y en la India, distrito de Pradesh, así como su plasticidad metabólica por la producción de compuestos de reserva de carbono/energía del metabolismo anaplerótico de polihidroxialcanoatos (PHAs). Finalmente el rol ecológico y la importancia de cada ecotipo estudiado son abordadas en la discusión.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Zona de muestreo

La localización espacial de muestreo en los suelos estudiados, así como características edafoclimáticas de la zona se presentan en la tabla 1. Brevemente, en Colombia el estudio se realizó en 4 bosques pertenecientes a la zona alto-andina de Nariño. En estos, las muestras de suelos se colectaron al lado de las plantas oxalogénicas *Oxalis spiralis* y *O. tuberosa*. En Bolivia las muestras de suelo se colectaron al lado del árbol oxalogénico Verdolago amarillo (*Terminalia oblonga*), en Camerún en el árbol Irokó (*Millicia excelsa*) y en India en el árbol del mismo género Bahera (*Terminalia bellirica*). Las localidades correspondieron en todos los casos a suelos ácidos ferrosos, ubicación geográfica que se presenta en la figura 1.

En cada caso, se realizaron perfiles de suelo a 20 cm al lado de la planta con 1 m de profundidad, tomando muestra de suelo cada 5 cm. Este protocolo se ajustó a lo realizado en los bosques de Bolivia, Camerún e India (Braissant, *et al.*, 2004, Cailleau, *et al.*, 2014).

Tabla 1. Localización espacial de las muestras de suelo utilizadas para el aislamiento y comparación de bacterias oxalotróficas cultivables.

Pais	Provincia	Coordenadas	Tipo de suelo	T [°C]	Clas. clima Köppen's
Bolivia	Saperoco	15°23'S, 67°20'W	Inceptisol	25	Aw: Tropical savannah
Camerun	Yahoundé	4°25'N, 13°36'E	Oxisol	24	Am: Monsoon
Colombia	Nariño	1°18'N, 77°28'W	Andisol	18	Cwa: Humid subtropical
India	Pradesh	24°43'N, 80°00'E	Inceptisol	23	Cwa: Humid subtropical

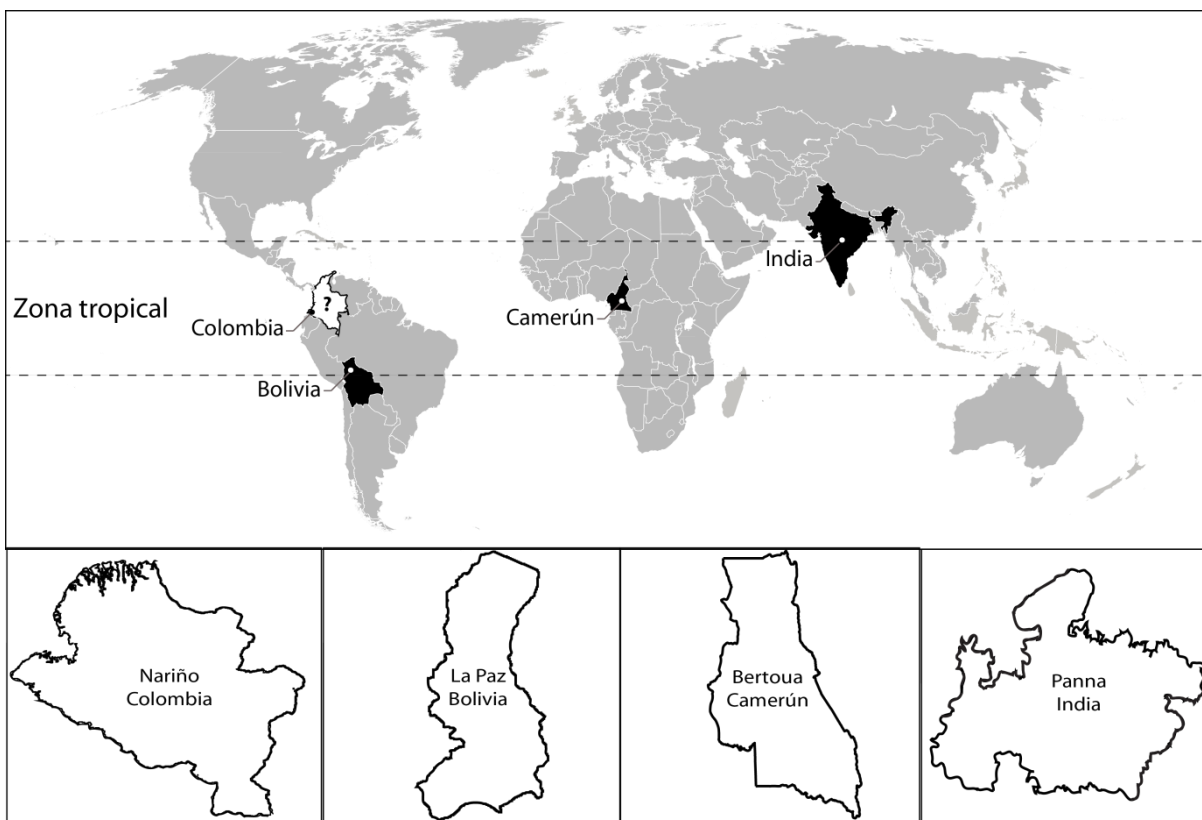


Fig. 1. Localidades en la zona tropical en las cuales se han realizado estudios de diversidad y metabolismo de bacterias oxalotróficas implicadas en la ruta oxalato-carbonato detectada en tres continentes. En Colombia, el estudio tuvo lugar en el departamento de Nariño ($1^{\circ} 15' 43.13''$ N; $77^{\circ} 18' 15.86''$ O). Las otras tres regiones (Bolivia, Camerún e India) se han reportado en estudios recientes (Aragno & Verrecchia, 2012, Bravo, *et al.*, 2013a, Cailleau, *et al.*, 2014).

Selección de cepas bacterianas y de caracterización bioquímica

A partir de las muestras de suelo, se realizaron diluciones seriadas en 9 mL de solución fisiológica (0.9% v/v). La dilución 10^{-7} fue inoculada en cajas de Petri que contenían medio sólido Angle suplementado con oxalato de calcio ($\text{CaOx } 4\text{g.L}^{-1}$) como única fuente de carbono y energía (Braissant, *et al.*, 2002, Bravo, *et al.*, 2013b). Las colonias que presentaron halos de disolución total de oxalato (medio transparente) fueron aisladas y purificadas en cajas con el mismo medio de cultivo.

Se seleccionaron 16 aislamientos (4 de cada suelo colectado), debido a su capacidad de disolución, para ser identificados. En cuatro cepas con mayor disolución, se determinó parámetros cinéticos de crecimiento. Dichas cepas se inocularon en souvireles de vidrio Schott con 20 mL de medio líquido Angle suplementado con CaOx como única fuente de

carbono/energía, a igual concentración que en medio sólido. La caracterización bioquímica se realizó mediante pruebas de microplaca (BIOLOG, CA, US) para lectura en espectro visible UV (600 nm de longitud de onda). Para ello, 10 μL de cada cepa a una concentración de 0.2 Abs en UV fueron inoculados en cada pozo de la microplaca. Las cepas se incubaron a 20°C durante dos semanas y se realizaron las lecturas correspondientes. La diferencia entre la lectura inicial ($\text{OD}_{\text{inicial}}$) y la final (OD_{final}) en cada pozo, permitió determinar cualitativamente la plasticidad metabólica de cada aislamiento. La capacidad de reserva de carbono y energía mediante producción de polihidroxialcanoatos se consideró como el mayor criterio de plasticidad metabólica. Esta capacidad de reserva de carbono se ha determinado como un criterio de selección de rizobacterias cultivables viables para recomendar en estudios biotecnológicos (Bravo & Fernández, 2012) después de comparar su actividad oxalotrófica.

Identificación parcial mediante el gen 16S Rrna

Mediante extracciones de ADN (Kit Analytik Jena AG, Jena, Alemania), a partir de 1 g de biomasa recuperada en cultivo líquido, se realizaron PCRs para amplificar el gen 16S rRNA en cada cepa mediante primers universales recomendados para la identificación de procariotas (Muyzer, *et al.*, 1993). Las condiciones de amplificación y purificación de los productos PCR se realizaron de acuerdo con estudios anteriores (Bravo, *et al.*, 2013a). La secuenciación Sanger se realizó en cada caso (GATC GmbH, Konstanz, Alemania), para identificar las cepas estudiadas por comparación con secuencias registradas en la base de datos NCBI GenBank. A partir de las secuencias molde y las obtenidas a partir de los aislamientos, se realizó un árbol filogenético usando la topología para el gen 16S rRNA (Altschul, *et al.*, 1997, Head, *et al.*, 1998). El árbol se construyó mediante el software Phylip versión 3.695 (Kuhner & Felsenstein, 1994).

Análisis de datos

Los valores de crecimiento y degradación de CaOx en medio líquido fueron realizados en triplicado. Los valores fueron comparados mediante biomasa,

velocidad de consumo CaOx y pH mediante la desviación estándar de sus réplicas y los rendimientos de biomasa-sustrato. Se determinó la cepa oxalotrófica más importante seleccionando la que presentara mayor velocidad de consumo de oxalato en $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ de CaOx por gramo de biomasa; la cual puede sugerirse como modelo para la oxalotrofia en suelos de la franja de países tropicales muestreados en esta investigación.

RESULTADOS

Plantas oxalogénicas

En Colombia, las dos especies de *Oxalis* (*spiralis* y *tuberosa*, respectivamente), correspondieron a plantas herbáceas trifolioladas (Fig 2A), con capacidad menor de producción de oxalato por g de hoja (peso fresco), en comparación con las otras plantas estudiadas, debido principalmente a su estrategia de crecimiento. En cada caso, el suelo correspondió a ferralítico con pH ácido en las zonas no influenciadas por la planta (prom. 5.3 - 6.2), y básico al lado de la planta (pH 7.8), con topografía plana y humedad relativa alta (< 92%). En el caso de los otros suelos, el pH al lado del árbol fue superior (pH prom. 8.4).



Fig. 2. Plantas oxalogénicas estudiadas en Colombia, **A1.** *Oxalis spiralis* y **A2.** *O.tuberosa.*, **B.** en Bolivia, *Terminalia oblonga*, **C.** en Camerún, *Millicia excelsa*, y **D.** en India, *Terminalia bellirica*. El pH al lado de cada planta fue alcalino (8 a 9) en tanto que el pH en suelo fuera de influencia oxalogénica fue ácido (prom. 5.7)

Con respecto a la diferencia de plantas oxalogénicas, debido a que es un estudio comparativo sobre bacterias oxalotróficas, la planta oxalogénica es un segundo recurso; si el estudio se enfocara en la ruta oxalato-carbonato, sería más interesante la comparación de sistemas OCP similares (p.e. mismo género oxalogénico,

o misma estrategia de crecimiento vegetal). Pese a ello, la comparación es válida entre tipos de suelo, puesto que se busca medir es el tipo de oxalotrofia y no determinar si existe una ruta OCP activa. En la tabla 2 se especifica el origen de las cepas bacterianas aisladas en cada suelo muestreado.

Tabla 2. Bacterias oxalotróficas seleccionadas de acuerdo a su capacidad de disolución de oxalato (≥ 0.4 cm) en cajas de Petri con medio sólido Angle suplementado con CaOx. Cuatro cepas fueron seleccionadas por suelo tropical ferralítico.

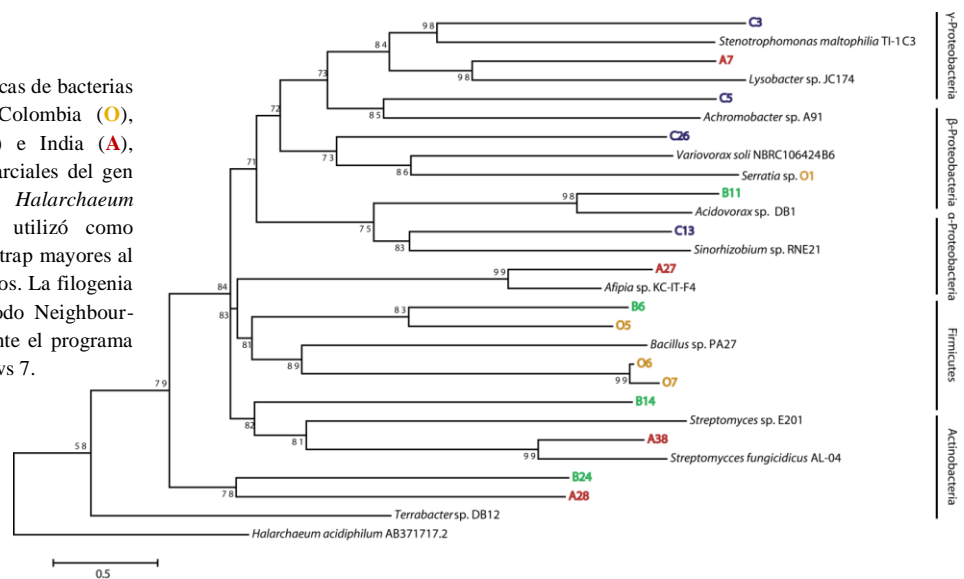
Cepa	Planta	Origen	Suelo	Halo [cm]	Gram
<i>Serratia</i> sp. O1	<i>O. spiralis</i>	Colombia	Andisol	0.4	-
<i>Bacillus</i> sp. O5				0.5	+
<i>Bacillus</i> sp. O6	0.5			+	
<i>Bacillus</i> sp. O7	0.4			+	
<i>Bacillus</i> sp. B6	<i>T. oblonga</i>	Bolivia	Inceptisol	0.5	+
<i>Acidovorax</i> sp. B11				0.4	-
<i>Streptomyces</i> sp. B14				0.6	+
<i>Streptomyces</i> sp. B24				0.7	+
<i>Stenotrophomonas</i> sp. C3	<i>T. bellirica</i>	Camerún	Oxisol	0.4	-
<i>Achromobacter</i> sp. C5				0.6	-
<i>Sinorhizobium</i> sp. C13				0.7	-
<i>Variovorax soli</i> C26				0.9	-
<i>Lysobacter</i> sp. A7	<i>M. excelsa</i>	India	Inceptisol	0.6	-
<i>Afipia</i> sp. A27				0.5	-
<i>Streptomyces</i> sp. A28				0.7	+
<i>Streptomyces</i> sp. A38				0.8	+

Estas cepas presentaron características morfofisiológicas particulares para cada zona (mediante pruebas BIOLOG y microscopia, respectivamente), sin embargo, filogenéticamente, algunas se encontraron relacionadas, como el caso de las cepas *Bacillus* sp. o *Streptomyces* sp.

Las relaciones filogenéticas entre las cepas comparadas (Fig.3) permiten mostrar que existe una cercanía entre las *Bacillus* spp. encontradas en Colombia y Bolivia. Igualmente ocurre con las cepas

del género *Streptomyces*, encontradas en Bolivia y Camerún. En el caso de Bolivia e India, podría haber una relación entre el tipo de suelo y la preferencia de bacterias Gram positivas, puesto que en ambos lugares la proporción de éstas fue mayor que el de las Gram negativas. Además el hecho de pertenecer a un mismo partner oxalotrófico (género *Terminalia*) podría influir en la especificidad dentro del sistema oxalato-carbonato; sin embargo es una hipótesis que se debería abordar en futuros estudios.

Fig. 3. Relaciones filogenéticas de bacterias oxalotróficas aisladas de Colombia (O), Bolivia (B), Camerún (C) e India (A), basada en las secuencias parciales del gen 16S rRNA. La secuencia *Halarchaeum acidiphilum* (Archaea) se utilizó como outgroup. Los valores Bootstrap mayores al 50% se muestran en los nodos. La filogenia se diseñó a partir del método Neighbour-joining, y se graficó mediante el programa Phylip v. 3.695 para Windows 7.



Las dos clases bacterianas más frecuentes en todos los bosques estudiados corresponden a Bacilli (Firmicutes) y a Actinobacteria (particularmente en los suelos tropicales de India), con representantes de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, respectivamente. Ambos géneros bacterianos son representativos de la microbiota de suelos en bosques naturales sin intervención antrópica. Los géneros bacterianos menos comunes fueron *Serratia* (encontrado en *Oxalis spiralis* de Colombia) y *Afipia* (encontrado en *Terminalia bellirica* de India) del phylum Proteobacteria. *Serratia* es una enterobacteria que puede encontrarse en condiciones micro-aerofílicas, y que al igual que *Bacillus* presenta bajos rendimientos de consumo de CaOx en condiciones aerobias. Esto concuerda con una baja plasticidad metabólica (BIOLOG), predominando su uso de sustratos simples que ecológicamente corresponden a una gran dependencia por sustratos co-metabolizados, como ocurre cuando se encuentran en asocio en el suelo con actinobacterias y hongos endomicorrizas, que proveen dichos compuestos simples (Gaskins, *et al.*, 1985, Daniel, *et al.*, 2007). Pese a ello, entre las cepas encontradas en Colombia, *Bacillus* sp. O7 fue la que

mayor consumo de CaOx presentó (2 mg CaOx.h⁻¹ y un pH final en medio líquido de 6.7). Por otro lado, géneros como *Streptomyces* y *Variovorax* (Fig. 4B, C y D), mostraron una alta plasticidad metabólica, reflejada también en sus tasas de crecimiento (μ.h⁻¹ 0.6 y 0.8, respectivamente) y velocidad de consumo de CaOx en medio líquido (26 y 27 μmol CaOx.h⁻¹). Comparados con las otras cepas estudiadas, sus rangos reflejan un consumo alto, (particularmente la de *V. soli* con 41 mg CaOx.h⁻¹ y un pH final en medio líquido de 7.9) que puede reflejar una importancia ecológica alta, como se ha confirmado mediante métodos moleculares en la fracción no cultivable activa de bacterias oxalotróficas en estudios recientes (Bravo, *et al.*, 2013a).

El caso de la cepa *Bacillus* sp. O7 es interesante (Fig.4A), porque pese a que tiene poca producción de biomasa, tiene un nivel de oxidación de oxalato medio (17 μmol CaOx.h⁻¹) de forma comparativa (biomasa-CaOx) pese a que el pH cambió ligeramente, indicando un muy lento proceso de carbonatogénesis. Sin embargo, dentro de la fracción cultivable *Bacillus* es representativo tanto en abundancia, como en velocidad de consumo de oxalato de calcio.

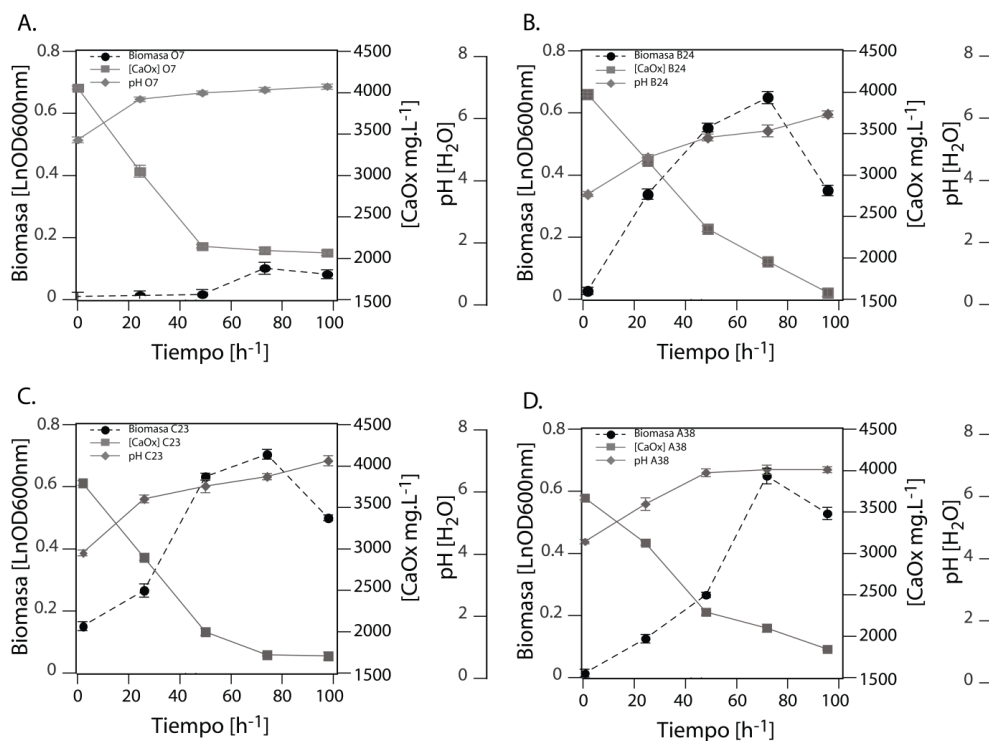


Fig. 4. Comparación de parámetros cinéticos de crecimiento y pH final en medio líquido Angle suplementado con CaOx entre **A.** *Bacillus* sp. O7 (Colombia), **B.** *Streptomyces* sp. B24 (Bolivia), **C.** *V. soli* C23 (Camerún), y **D.** *Streptomyces* sp. A38 (India).

En las cepas comparadas, la versatilidad metabólica fue muy diferente. Por ejemplo, la producción de polihidroxialcanoatos, un sustrato de activación de energía para procesos de biosíntesis, fue particular en cada caso. La cepa *Bacillus* O7 de Colombia presentó capacidad de sintetizar PHB, en tanto que las cepas *Streptomyces* B24 y A38 de Bolivia e India, respectivamente, presentaron picos cromatográficos muy bajos de PHB; siendo *V. soli* C23 la más versátil en la síntesis de este metabolito, presentando fracciones butirato y hexanoato (datos no mostrados).

La versatilidad en cuanto a consumo de otros polímeros y carbohidratos fue también variada en cada cepa bacteriana estudiada. El test bioquímico empleado (BIOLOG), sugiere una alta plasticidad metabólica de la cepa *Streptomyces* sp. A38 (India), la cual fue capaz de asimilar sustancias poliméricas (p.e. dextrina, glucógeno, Tween 20, 40 y 80) y carbohidratos (p.e. succinato, galactosa, sorbitol, N-acetil-glucosamina y D trehalosas). La que menos plasticidad presentó fue *Serratia* sp. O1 con tan solo cuatro carbohidratos a degradar (glucosa, sacarosa, fructosa y maltosa). La cepa *Bacillus* sp. B6 fue la única con capacidad de degradar ácido acético polihidroxifenílico; y en comparación con *Bacillus* sp. O7 (Colombia), ambas fueron capaces de degradar glucosa, xilosa y arabinosa.

DISCUSIÓN

La oxalotrofia se estudió desde inicios del siglo pasado (década de los 20's), principalmente en actinobacterias aisladas de suelos en bosques templados de Alemania (Müller, 1950). A medida que fue evolucionando la microbiología tradicional, se fue estudiando a mayor escala la diversidad oxalotrófica cultivable (Knutson, *et al.*, 1980, Sahin, 2003), particularmente estudiando bacterias de suelos no tropicales.

Pese a que muy recientes estudios han descrito la diversidad de bacterias oxalotróficas en suelos ferralíticos tropicales de Bolivia, India y Camerún (Bravo 2013c), este es el primer reporte que se tiene de bacterias oxalotróficas en Colombia. El hecho de poder comparar la capacidad de crecer y consumir oxalato entre suelos tropicales de tres continentes es importante, porque refleja la capacidad de conversión entre los productos metabólicos de los vegetales

asociados (Schlegel, 1986, Zech, *et al.*, 1997), y su conversión en compuestos que secuestran carbono del CO₂ durante miles de años y de forma geoestable. Además, enriquece la comprensión de la interacción entre la estructura de dichos suelos con el componente microbiológico de los mismos. La mayoría de suelos ferralíticos en la zona intertropical del nuevo mundo son ácidos y no contienen depósitos de carbonatos de forma significativa (Aragno & Verrecchia, 2012). Sin embargo estudios recientes han demostrado que en ciertos árboles y plantas oxalogénicas es posible encontrar carbonato secundario adherido al tronco o en las estructuras aéreas de dichas plantas en bosques tropicales; así como en sus raíces y litera, como es el caso de los árboles irokó y verdolago estudiados en Camerún y Bolivia (Cailleau, *et al.*, 2011, Cailleau, *et al.*, 2014). En dichos suelos, el pH bajo el árbol es paradójicamente alcalino, obteniéndose valores entre 8 y 8.4 y en tronco hasta 9.7, mientras que suelos sin influencia oxalogénica a algunos metros del árbol oxalogénico (entre 15 a 20 m) presentan valores pH promedios de 5.5. En los casos de las plantas evaluadas en esta investigación la síntesis de oxalato es mayor que en cualquier otra en un transecto de 50 m, por lo cual la hipótesis es que en dichas plantas oxalogénicas se presenta un sistema oxalato-carbonato activo. Sin embargo, la eficacia de dicho sistema depende de varios factores.

Es ahí donde esta comparación sirve para mostrar que mediante métodos microbiológicos de cultivo convencional es posible recuperar una diversidad viable de bacterias oxalotróficas que habitan en la rizosfera y que predominan en bosques tropicales de los países estudiados. Estas bacterias activan cada posible sistema OCP en dichos suelos y permiten solubilizar fósforo inorgánico y reducir hierro, como parte de su interacción con minerales característicos de esos suelos ferralíticos.

En este trabajo 16 ecotipos fueron identificados mediante la secuenciación parcial del gen 16S rRNA herramienta molecular fundamental para caracterizar la diversidad de oxalotrofos cultivables. En futuros estudios se recomienda comparar los microorganismos obtenidos en la presente investigación, usando el marcador molecular *frc*, relacionado con la oxalotrofia, y utilizar el mismo para explorar la fracción no cultivable de oxalotrofos presentes en suelos de Colombia, como se ha hecho en el caso de Camerún (Bravo, *et al.*, 2013a), donde se ha

determinado al sistema OCP como un modelo de secuestro de CO₂ a largo plazo (Cailleau, *et al.*, 2011 ; Bravo 2013d).

El oxalato es un compuesto orgánico que presenta altos rangos de metabolización en suelos (Brant, *et al.*, 2006). El hecho que cepas como *V. soli* C23 de Camerún tengan altos niveles de degradación del compuesto, refleja su potencial capacidad metabólica *in situ*, como se ha observado en otros estudios, donde se destaca al género *Variovorax* como uno de los más importantes grupos en suelo rizosférico (Jamieson, *et al.*, 2009), por lo cual se sugiere al ecotipo *Variovorax soli* como la cepa oxalotrófica modelo en este estudio comparativo en suelos tropicales de tres continentes.

En el mismo sentido, el hecho de que existan bacterias oxalotróficas como *Bacillus* sp. O7, *Serratia* sp. O1 en Colombia o los *Bacillus* encontrados en Bolivia, que degradan niveles medios de oxalato pese a su baja tasa de crecimiento, podría explicarse bajo el argumento que algunas bacterias usan el oxalato solamente como fuente de energía, más no como fuente de carbono (Quayle & Keech, 1960, Blackmore & Quayle, 1968). Por tanto el crecimiento sub-óptimo de esta cepa, no se relaciona directamente con su capacidad energética bajo crecimiento en oxalato, pues es eficiente en obtener energía para degradarlo. Además, por el hecho de que una mol de oxalato es más energética que una de glucosa en términos de cambio entálpico de energía por par de electrones (Bravo, *et al.*, 2011), cabe la posibilidad de que el oxalato genere un excelente mecanismo de activación de energía en este tipo de bacterias micro-aerofílicas.

La ecología de estos microorganismos en suelo es compleja, puesto que en los suelos tropicales confluyen diferentes fuentes minerales de oxalato a parte del calcio. Sin embargo, se ha confirmado en estudios previos, que el Ca y K son los minerales de oxalato que más preferencia metabólica generan entre oxalótrofos *in situ* (Bravo, *et al.*, 2011). Además, en el complejo hiperespacio del nicho suelo, las interacciones hongo-bacteria pueden reflejar aportes significativos de oxalato en el proceso saprófito-mineralización (Bravo, 2013d) cambiando la perspectiva de flujos metabólicos para dicho sustrato.

Las actinobacterias por ejemplo, predominantes en India, muestran un tipo de metabolismo oxalotrófico muy particular, puesto que aunque son más lentas en crecer usando oxalato como fuente carbono y energía, son eficientes en el proceso de degradación con

velocidades de consumo altas en función del tiempo, lo cual es más ajustado a lo que ocurre en suelos donde la accesibilidad al sustrato depende de la estrategia de crecimiento mismas de la bacteria, que en el caso de los actinomicetos es predominantemente filamentosa (Goodfellow & Williams, 1983), así como del bajo nivel de solubilidad del oxalato de calcio (Graustein, *et al.*, 1977) que induce a un tiempo de reducción *in situ*. El analizar todas estas relaciones contribuye a comprender mejor las diferencias observadas entre los parámetros de crecimiento y velocidad de consumo de oxalato en las cepas evaluadas en esta investigación.

CONCLUSIONES

Este estudio permitió comparar la oxalotrofia en suelos rizosféricos de plantas oxalotróficas encontradas en bosques naturales tropicales de Colombia (por primera vez reportada) con suelos de Bolivia, Camerún e India (explorados en su diversidad recientemente). El esfuerzo de muestreo y de trabajo de laboratorio permitió destacar que la cepa *V. soli* C23 de Camerún es la más versátil metabólicamente con una producción de biomasa y velocidad de consumo de CaOx importante, con respecto a otras bacterias oxalotróficas evaluadas. El estudio permitió también conocer novedosos ecotipos como *Bacillus* O7 y *Serratia* O1 de Colombia, o *Achromobacter* sp. C5 y *Afipia* sp. A27 de Camerún e India, respectivamente, que quizá tienen un rol importante como sumidero de carbono en suelos ferralíticos tropicales a largo plazo, participando en la conversión geoestable de carbono proveniente de CO₂ atmosférico y activando la ruta oxalato-carbonato. Más estudios deberán enfocarse a la fracción no cultivable y su repercusión en la carbonatogenesis *in situ* en los nichos tropicales en diferentes partes de Colombia, con el fin de determinar su rol en la fijación de CO₂ a nivel de la región.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al laboratorio de ecología microbiana de la Université de Neuchâtel encabezado por la Dra. Pilar Junier, en el estudio de oxalotrofia en suelos de Bolivia, Camerún e India. Agradecimientos, al sponsor principal de esta investigación, el programa FP7- CO₂SolStock, de la comunidad Europea, acuerdo

No. 226306. A nivel local agradecemos a la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño por financiación del proyecto “Bacterias oxalotróficas productoras de polihidroxicarbonatos”. De igual manera, manifestamos nuestro agradecimiento a los revisores anónimos de este manuscrito.

REFERENCIAS

- ALTSCHUL SF., MADDEN TL., SCHAFFER AA., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- 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*, Delf, Holanda.
- BLACKMORE MA., QUAYLE JR. (1968) Choice between autotrophy and heterotrophy in *Pseudomonas oxalaticus*. Growth in mixed substrates. *Biochem J* 107: 705-713.
- BRAISSANT O., VERRECCHIA EP., ARAGNO M. (2002) Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated? *Naturwissenschaften* 89: 366-370.
- BRAISSANT O., CAILLEAU G., ARAGNO M., VERRECCHIA EP. (2004) Biologically induced mineralization in the tree *Milicia excelsa* (Moraceae): its causes and consequences to the environment. *Geobiology* 2: 59-66.
- BRANT JB., SULZMAN EW., MYROLD DD. (2006) Microbial community utilization of added carbon substrates in response to long-term carbon input manipulation. *Soil Biol Biochem* 38: 2219-2232.
- 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., FERNÁNDEZ P. (2012) Síntesis de PHAs en bacterias diazotrofas en leguminosas de Colombia - Diversidad microbiana funcional: La última frontera entre ecología microbiana y biotecnología microbiana. Editorial Akademischer Verlag, Saarbrücke, Alemania, 116 p.
- 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 experiments. *FEMS microbiology letters* 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 microbiology letters* 348: 157-166.
- BRAVO D. (2013c) Understanding the diversity and metabolism of oxalotrophic bacteria in tropical habitats. Doctoral thesis. pp. 1-186. University of Neuchâtel. Switzerland
- BRAVO D. (2013d) Interacciones hongo-bacteria. La sinergia detrás de la ruta oxalato-carbonato. *UGCiencia* 19: 25-32.
- CAILLEAU G., BRAISSANT O., VERRECCHIA E. (2011) Turning sunlight into stone: the oxalate-carbonate pathway in a tropical tree ecosystem. *Biogeosciences* 8: 1755-1767.
- 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.
- CROMACK K, JR.; SOLLINS P., TODD RL. (1977) The role of oxalic acid and bicarbonate in calcium cycling by fungi and bacteria: some possible implications for soil animals. *Ecol Bull.* 1: 17-29.
- DANIEL SL., PILSL C., DRAKE HL. (2007) Anaerobic oxalate consumption by microorganisms in forest soils. *Res Microbiol* 158: 303-309.

- FRANCESCHI VR., NAKATA PA. (2005) Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Ecol* 56: 41-71.
- GASKINS MH., ALBRECHT SL., HUBBELL DH. (1985) Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: a review. *Agr Ecosyst Environ* 12: 99-116.
- GOODFELLOW M., WILLIAMS ST. (1983) Ecology of Actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 37: 189-216.
- GRAUSTEIN WC., CROMACK K., SOLLINS P. (1977) Calcium oxalate: occurrence in soils and effect on nutrient and geochemical cycles. *Science* 198: 1252-1254.
- HEAD IM., SAUNDERS JR., PICKUP RW. (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol* 35: 1-21.
- JAMIESON WD., PEHL M., GREGORY G., ORWIN P. (2009) Coordinated surface activities in *Variovorax paradoxus* EPS. *BMC Microbiol* 9: 124.
- KNUTSON D., HUTCHINS A., CROMACK K, Jr. (1980) The association of calcium oxalate-utilizing *Streptomyces* with conifer ectomycorrhizae. *A Van Leeuw J Microb* 46: 611-619.
- KUHNER MK., FELSENSTEIN J. (1994) A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Mol Biol Evol* 11: 459-468.
- MARTIN G., GUGGIARI M., BRAVO D., JUNIER P., ARAGNO M. (2012) Fungi, bacteria and soil pH: the oxalate-carbonate pathway as a model for metabolic interaction. *Environ Microbiol* 14: 2960-2970.
- MÜLLER H. (1950) Oxalsäure als Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen. *Arch Mikrobiol* 15: 137-148.
- MUYZER G., DE WAAL EC., UITTERLINDEN AG. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- QUAYLE JR., KEECH DB. (1960) Carbon assimilation by *Pseudomonas oxalaticus* (OX1). 343. Oxalate utilization during growth on oxalate. *Biochem J* 75: 515-523.
- SAHIN N. (2003) Oxalotrophic bacteria. *Res Microbiol* 154: 399-407.
- SCHLEGEL HG. (1986) Global Impacts of Prokaryotes and Eukaryotes. (Eds) *The Microbe Part II: Prokaryotes and Eukaryotes*, Göttingen, Alemania.
- VERRECCHIA EP., BRAISSANT O., CAILLEAU G. (2006) 12. The oxalate-carbonate pathway in soil carbon storage: the role of fungi and oxalotrophic bacteria in biogeochemical cycles. (Eds) *Fungi in biogeochemical cycles*, Cambridge, Reino Unido.
- ZECH W., SENESI N., GUGGENBERGER G. (1997) Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma* 79: 117-161.