

# Interacciones hongo-bacteria. La sinergia detrás de la ruta oxalato-carbonato<sup>1</sup>

## Fungus-bacteria interactions. Synergy behind oxalate-carbonate route

Daniel Bravo<sup>2</sup>

Recepción: Mayo 2 de 2013

Aceptación: Agosto 21 de 2013

Cómo citar este artículo:

Bravo Daniel (2013). Interacciones hongo-bacteria. La sinergia detrás de la ruta oxalato-carbonato. *UGCiencia*, Vol. (19), 108 - 127.

### Resumen

El calentamiento global es una realidad. A partir de la Revolución Industrial y durante los últimos 150 años, los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico se han incrementado en 600 ppms, valor que no había sido superado hace 630 mil años. Como consecuencia de ello, un incremento en 1.6 grados centígrados se ha registrado en los últimos 7 años a nivel global y 2.1 grados en regiones tropicales. En vista de ello, la comunidad científica ha intentado buscar estrategias para mitigar el impacto por aumento del gas de invernadero. Entre las posibles soluciones, se ha planteado la activación a gran escala del ciclo biogeoquímico poco estudiado, denominado la ruta oxalato-carbonato (OCP, de sus siglas en inglés, oxalate-carbonate pathway). En dicho proceso natural, la regulación de niveles elevados de CO<sub>2</sub> atmosférico puede ser generada mediante la conversión y acumulación de dicha fuente carbonada en rocas de carbonato de calcio (calcita). Para ello, tres sistemas vivos juegan un rol fundamental, los árboles y hongos oxalogénicos, y las bacterias oxalotróficas. Estas últimas parecen ser las más importantes para activar la vía química a gran escala debido a su capacidad energética y metabólica. Sin embargo, poco se sabe sobre su real estatus metabólico en interacción con socios estratégicos, tales como los hongos oxalogénicos. Esta investigación demuestra que detrás de la ruta OCP, la sinergia hongo-bacteria es fundamental para alcalinizar el medio local (p.e. pH 8.5), inducir la precipitación de calcita secundaria y acumular carbono ciclado directamente del CO<sub>2</sub>. Para ello, se realizó un estudio termodinámico microbiano mediante microcalorimetría isotérmica analizando cuatro bacterias oxalotróficas y un hongo oxalogénico, provenientes de suelo subtropical colectado en Camerún. *Lysobacter gummosus* mostró una mayor actividad oxalotrófica cuando fue inoculada con *Trichoderma* sp. (0.221  $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ). La modelización termodinámica muestra una reducción de 27.5% de CO<sub>2</sub> en un sistema cerrado OCP.

- 1 Artículo derivado del proyecto: Evaluación de la diversidad y metabolismo de bacterias oxalotróficas en ambientes tropicales. LAMUN, Laboratorio de Microbiología, Universidad de Neuchâtel, Suiza.
- 2 PhD. en Microbiología. Colaborador científico, Universidad de Neuchâtel. LAMUN, Laboratorio de Microbiología. E-mail: daniel.bravo@unine.ch Rue Emile-Argand-11 Neuchâtel. CH-2000, Neuchâtel, Switzerland.

## Palabras clave

Bacterias oxalotróficas, interacción hongo-bacteria, microcalorimetría isotérmica, ruta oxalato-carbonato, sinergia.

## Abstract

Global warming is a fact. From the industrial revolution and throughout the last 150 years, the levels of atmospheric CO<sub>2</sub> have increased in 600 ppms, value that had never been exceeded during the past six hundred and thirty thousand years. As a consequence, a 1.6 degrees Celsius increase has been reported during the last 7 years worldwide and 2.1 degrees in tropical regions. Considering this, the scientific community has attempted searching for strategies to mitigate the impact due to the Increase of gas emissions. Among the possible solutions, it has been stated the great scale activation of the biogeochemical cycle poorly studied named the oxalate-carbonate route (OCP). In the so called natural process, the regulation of high levels of atmospheric CO<sub>2</sub> can be generated through the conversion and accumulation of such a carbonate source in carbonate of calcium rocks (calcite). For this purpose, three living systems play an important role: trees, oxalogenic fungus and oxalotrophic bacteria. These last seem to be the most important ones to activate the chemical via at great scale due to its energetic and metabolic capacity. Nevertheless little is known about its real metabolic status in interaction with strategic associates such as oxalogenic fungus. This research shows that behind the OCP route, the synergy fungus – bacteria is fundamental to alkalize the local environment (p.e.pH8.5), to induce the precipitation of secondary calcite and accumulate cyclized carbon from CO<sub>2</sub>. For this purpose, a microbial thermodynamic study was made through the isothermal microcalorimetry analyzing four oxalotrophic bacteria and one oxalogenic fungus coming from a tropical soil collected in cameron. *Lysobacter gummosus* showed higher oxalotrophic activity when inoculated with *Trichoderma* sp. (0.221 μM.h<sup>-1</sup>). The thermodynamic modelization shows a reduction in 27.5% of CO<sub>2</sub> in a closed OCP system.

## Key words

Oxalotrophic bacteria, fungus-bacteria interaction, isothermal microcalorimetry, oxalate-carbonate synergy route.

## Introducción

El calentamiento global, como consecuencia de un vertiginoso incremento del CO<sub>2</sub> atmosférico, es un fenómeno que es real y debe preocupar a toda la sociedad humana (Kerr, 2013). Los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico se han disparado como consecuencia de la actividad antropogénica por explotación inadecuada de recursos no renovables en menos de dos siglos y un 230% más veloz de lo que se esperaría. De acuerdo con los registros, en el periodo 2009-2012, los niveles han aumentado en menos de tres años de 1.3 a 3.3% (Kintisch, 2013). Los modelos más optimistas, sugerían dicha tasa de incremento de CO<sub>2</sub> para el año 2042

(Wei & Fang, 2013), lo cual debería llevar a toda la sociedad a buscar pronto una solución real que mitigue el grave daño que la acumulación de dicho gas invernadero produce.

Entre las soluciones plausibles, desde la interface de la geología y la ecología microbiana, se ha propuesto hace unos 30 años el estudio y análisis de un ciclo biogeoquímico conocido como la vía oxalato-carbonato (OCP) (Verrecchia, Braissant, & Cailleau, 2006). Este es importante porque, literalmente, permite la acumulación en la corteza terrestre de toneladas de carbono provenientes del CO<sub>2</sub> atmosférico, en geomorfos estables de roca calcita (CaCO<sub>3</sub>). En otras palabras, la ruta OCP puede definirse en una frase, como la conversión de CO<sub>2</sub> en rocas (Cailleau, Braissant, & Verrecchia, 2011). No obstante, para que este proceso llegue a feliz término, se ha observado que es indispensable la intervención de un componente biótico importante. Tres sistemas biológicos deben participar en el proceso. Ellos son i) las plantas oxalogénicas, ii) los hongos oxalogénicos, y iii) las bacterias oxalotróficas. Los dos primeros, en el caso de los árboles, son responsables de la síntesis de ácido oxálico o C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (fracción metabólica denominada oxalogenia) a partir de procesos fotosintéticos, capturando CO<sub>2</sub> de la atmósfera; o por saprofitismo en la litera, en el caso de los hongos (Cromack, *et al.*, 1977). Sin embargo, el paso crucial hacia la precipitación de carbonatos de calcio en bosques tropicales, es debido a la acción del tercer actor, las bacterias oxalotróficas (Braissant, Verrecchia, & Aragno, 2002).

Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas para estudiar el metabolismo de bacterias oxalotróficas (Bravo, *et al.*, 2011), así como también otras metodologías para estudiar la fracción activa de la comunidad bacteriana oxalotrófica en suelos tropicales (Bravo *et al.*, 2013b), y se ha destacado la importancia de la relación hongo-bacteria que incrementa el pH en suelo y de esta manera generar las condiciones para una precipitación bioinducida de calcita secundaria (whewelita) en microcosmos (Martin, *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta este punto de la investigación, se desconocía cuál es el efecto energético de la interacción hongo-bacteria y por tanto su real estatus o participación sobre la vía oxalato-carbonato, como pieza fundamental en el rendimiento del flujo de carbono desde CO<sub>2</sub> hacia carbonato de calcio.

Esta investigación propone determinar el efecto energético de la interacción hongo-bacteria y su impacto sobre la vía oxalato-carbonato, mediante el uso de una de las técnicas más sensibles para medir

metabolismo oxalotrófico, la microcalorimetría isotérmica (IMC), que propone una nueva perspectiva de las interacciones microbiológicas. Debido a que todo proceso en el mundo físico implica liberación de calor, los procesos biológicos y el calor producido por los mismos pueden ser caracterizados. Por esta razón, la interacción hongo-bacteria debe ser medida a través de la IMC. La técnica se basa en la medición de calor producido como consecuencia del crecimiento exponencial tanto por bacterias como por hongos. Este tipo de procesos pueden llegar a ser medido con un alto nivel de detección en un amplio rango de tiempo (las medidas por IMC pueden ir desde nanowatts por segundo, hasta watts por mes) (Braissant, Wirz, Gopfert, & Daniels, 2010). Más información sobre la técnica es presentada en métodos y discusión (el lector también puede dirigirse a la completa revisión de (Braissant, Bonkat, Wirz, & Bachmann, 2013). La versatilidad de la técnica implicada, permitió desarrollar mediciones precisas del fenómeno observado durante todo el proceso de reconocimiento hongo-bacteria y la respectiva oxidación de oxalato. Además, mediante los datos obtenidos se desarrolló un modelo para determinar el rango de CO<sub>2</sub> controlado por consumo de oxalato (en moles por año proyectado), versus el porcentaje de carbono transferido del CO<sub>2</sub> proveniente de una atmósfera controlada, hasta la precipitación teórica de carbonato de calcio.

### **Materiales y métodos**

El objetivo de esta investigación fue determinar si la interacción hongo-bacteria favorece la actividad de oxidación de oxalato como única fuente de carbono, y por tanto acelerar el proceso de precipitación de carbonato de calcio mediante un aumento en el pH del medio circundante. El experimento fue llevado a cabo en un sistema de columnas diseñado en jeringas estériles de 10 mL (Figura 1). El sistema permite generar un gradiente heterogéneo similar a un perfil pedológico en suelo *in situ* (Wick, *et al.*, 2007). Este se compuso de un tapón-filtro en la parte inferior (filtros swinnex de 0.4 μm de espesor, VWR, Fontenay-sous-Bois, France). De abajo hacia arriba, el sistema consistió en 1mL de agar malta 4% (w/v) con paja estéril (*Miscanthus* sp.), para dar soporte al crecimiento del hongo oxalotrófico estudiado. Este se denominó 'medio matriz base'. Se creó un espacio de separación entre el matriz base y el medio objetivo con la fuente de carbono de oxalato de calcio (CaOx). El espacio semejó el ambiente poroso heterogéneo del suelo, y se obtuvo mediante la adición de esferas estériles de sílica gel (Sigma Aldrich, München, Germany).

El medio objetivo se denomina Schlegel AB suplementado con  $4 \text{ g.L}^{-1}$  de la fuente de carbono, que en este caso es Caox. Este medio ha sido usado para aislamiento efectivo *in vitro* de bacterias oxalotróficas (Tamer & Aragno, 1980, Braissant, et al., 2002). Cuando se presenta crecimiento de colonias de estas bacterias en este medio de cultivo, un halo de disolución alrededor del crecimiento es observado, como consecuencia de la oxidación de Caox (Bravo *et al.*, 2013c). Tanto el agar malta, como el medio oxalotrófico, fueron preparados estérilmente en cajas de Petri. El pH inicial fue ajustado a 7.2. Una vez solidificado, fragmentos cilíndricos de agar de dimensión similar al espacio interno de la jeringa fueron cortados y depositados de manera aséptica en el montaje columnar. En la siguiente figura se observa la distribución de los contenidos:

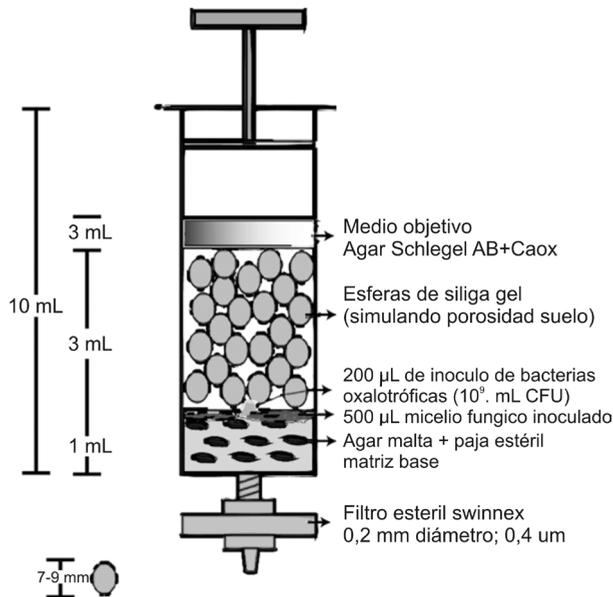


Figura 1. Esquema representando el sistema columnar diseñado para determinar el nivel de migración de bacterias oxalotróficas mediante el sistema de "autopistas fúngicas" (Kohlmeier, et al., 2005). El sistema parte de una matriz base, hasta un medio objetivo, separados ambos por sílica gel con una considerable distancia para una bacteria (3 cm), guardando las proporciones de dimensión en el mundo microbiano.

En esta investigación se utilizaron cuatro cepas oxalotróficas aisladas de suelo a 1 m de distancia del árbol oxalotrófico *Milicia excelsa*, (Moraceae), caracterizado en Bertoua, Camerún. Mediante el método de caja invertida (Bravo et al. 2013a), fue posible obtener una pareja de hongo oxalotrófico identificado como *Trichoderma* sp. y una bacteria oxalotrófica adherida

al hongo, *Lysobacter gummosus*. Además de esta, se evaluaron otras tres aisladas en el mismo perfil pedológico efectuado en Camerún, las cuales fueron *Variovorax soli*, *Agrobacterium* sp., y *Streptomyces* sp. Los sistemas columnares de jeringa fueron diseñados para cada cepa bacteriana inoculada cada una con el mismo hongo oxalogénico y por duplicado (Tabla 1). Por tanto, los resultados de migración y de microcalorimetría se presentan como desviación estándar de las réplicas.

Pareja	Bacteria	Hongo
1a – 1b	<i>Lysobacter gummosus</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
2a – 2b	<i>Variovorax soli</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
3a – 3b	<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.
4a – 4b	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.

Tabla 1. Parejas de “bacteria oxalotrófica – hongo oxalogénico”, obtenidas en previo estudio mediante asilamiento de bacterias y hongos que participan en la ruta oxalato-carbonato (Bravo et al., 2013a).

Las columnas fueron incubadas a temperatura ambiente ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 11 días. Después de este período, se sacrificaron las réplicas, para i) confirmación del test de migración por cada pareja bacteria-hongo evaluada, mediante tinción de Gram y observación directa de halos de degradación en el agar Schlegel AB+Ca<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, y ii) para tomar muestras y reinocularlas para análisis con microcalorimetría isotérmica. La tinción se realizó tomando de manera estéril una muestra de agar en la superficie de contacto con las esferas de sílica gel, realizando una rehidratación con una gota de agua nanopura estéril, y siguiendo el protocolo tradicional de tinción de Gram (Madigan, et al., 2000).

La actividad metabólica en la interacción bacteria-hongo fue analizada por microcalorimetría isotérmica. Las muestras de cada sistema columnar fueron repicadas en ampollas de 4mL suplementadas con 2mL de medio sólido Angle inclinado con  $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de oxalato de potasio (Kox) (Angle, 1991). Este medio se sugiere en reemplazo de Schlegel AB+Ca<sub>2</sub>O<sub>7</sub> debido a previa estandarización de la técnica para bacterias oxalotróficas, usando IMC (Bravo et al., 2011). La inoculación se realizó con una ansa

calibrada (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), asegurándose que el inóculo bacteria - hongo creciera en toda la superficie inclinada.

Las medidas de actividad oxalotrófica fueron realizadas en un microcalorímetro o conductor de calor en condiciones isotérmicas (TAM III, Waters/TA Instruments, Delaware, USA) equipado con 48 canales. La configuración del experimento se llevó a cabo de acuerdo con previos estudios en IMC (Bravo, et al., 2011). Brevemente, la temperatura del termostato fue ajustada para crecimiento de microorganismos ambientales a 25°C. Tras obtener condiciones estables de temperatura, cada canal fue calibrado usando un detector de calor eléctrico, conocido como poder-termal. Todos los detectores tienen un bloque de aluminio de referencia con una capacidad y conductividad de calor igual a la detectada en las ampollas de vidrio conteniendo 3 mL de agua nanopura estéril. La línea base se obtuvo a partir de ampollas conteniendo medio Angle estéril control. Por tanto, cualquier producción de calor debida al polímero del medio de cultivo (p.e. calor químico) pudo ser sustraído de la señal en las ampollas inoculadas con las parejas bacteria-hongo. Adicionalmente, como controles, se inocularon separadamente las cepas bacterianas puras sin el hongo oxalogénico, el cual a su vez, fue inoculado en una ampolla independiente.

### Análisis de datos IMC

Un análisis de flujo de calor (termograma) fue usado para calcular los parámetros cinéticos de crecimiento. Debido a que  $1\mu\text{W} = 1\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ , el máximo flujo de calor (Figura 2a) fue usado para calcular la actividad máxima oxalotrófica, asumiendo la reacción termodinámica  $2\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 \rightarrow 4\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$  con una reacción entálpica de  $\Delta H^\circ = -499\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . La entalpía estándar o formación de reactantes fue obtenida en reportes previos (Dean, 1999). Este cálculo asume que el calor producido por formación de biomasa es ignorado debido a que el rendimiento de biomasa en oxalato es muy bajo. La curva de calor como función del tiempo se obtuvo mediante integración de los datos de flujo de calor (Figura 2b). La tasa de crecimiento neto en las bacterias oxalotróficas fue calculada mediante ajuste a un modelo exponencial ( $Q_t = Q_0 \cdot e^{ut}$ , donde Q representa el calor) sobre la fase exponencial de la curva (Ver figura suplementaria 1). Igualmente, la tasa máxima de crecimiento se calculó mediante el uso de la ecuación modificada de Richards, no la de Gompertz (ver Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van 'T Riet,

1990). Para cada cepa bacteriana, estos valores fueron calculados en cada réplica, permitiendo obtener la media y la desviación estándar. Los termogramas de cada pareja bacteria-hongo fueron analizados en términos de consumo termodinámico de oxalato en función de la actividad oxalotrófica.

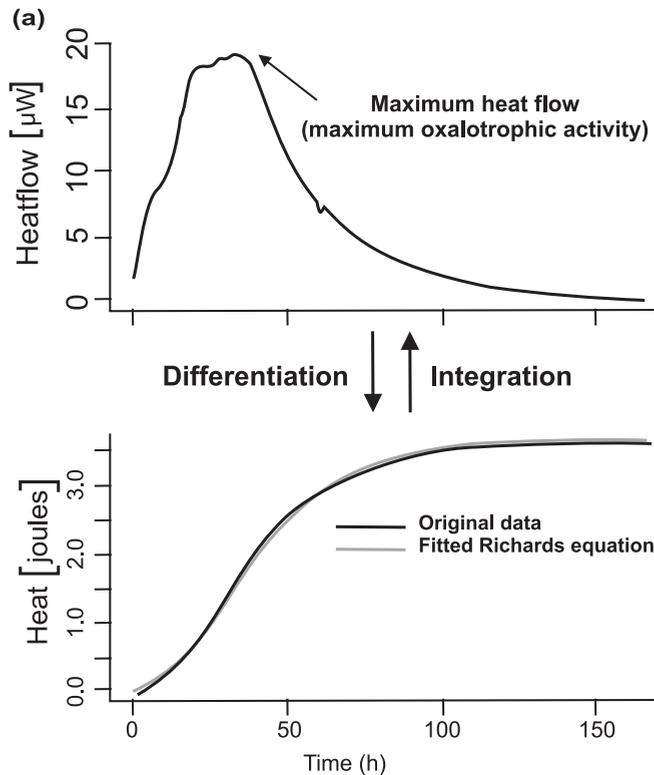


Figura 2. Sketch mostrando la relación entre mediciones calorimétricas expresadas como flujo de calor (a), el cual corresponde a la actividad microbiana derivada del consumo de oxalato, y la evolución del calor expresado en Julios (b), la cual es una aproximación de los productos resultantes de la actividad oxalotrófica (p.e. biomasa o  $\text{CO}_2$ ). El máximo flujo de calor (indicado en la flecha arriba) es directamente proporcional a la actividad máxima oxalotrófica de las cepas seleccionadas en este estudio.

## Resultados

En las cuatro parejas bacteria-hongo evaluadas (tabla 1) se observó migración bacteriana hasta el medio objetivo Schlegel AB+Ca<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Sin embargo, mediante observación directa, solo se presentaron halos de degradación en dos de las parejas evaluadas. Estas fueron *Lysobacter gummosus* - *Trichoderma* sp y *Variovorax soli* - *Trichoderma* sp. (figura 3).

Mediante las tinciones de Gram, se pudo observar presencia de ambos, bacterias y hongos ubicados en el medio objetivo, en donde la fuente de carbono es aprovechada mayoritariamente por las bacterias oxalotróficas.

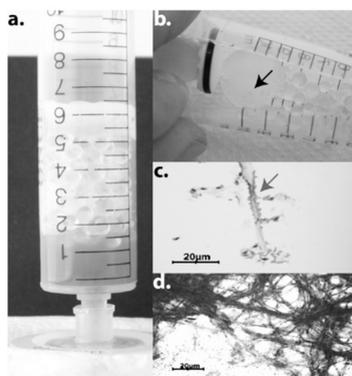


Figura 3. Experimento en columnas para evaluar la sintrofia en las parejas seleccionadas de bacteria-hongo. Este se llevó a cabo de manera que *Trichoderma* sp. migrase de manera vertical ascendente hacia la fuente de carbono en la columna diseñada (a). Después de 11 días de incubación se observó colonias de *Lysobacter gummosus* degradando oxalato de calcio (b), como se indica con la flecha negra. Mediante microscopía óptica, se observó la adhesión sobre *Trichoderma* sp. de células bacterianas como se indica para *Variovorax soli* con la flecha roja (c), y para *Agrobacterium* sp. (d), confirmando en ambos casos, migración bacteriana por autopistas fúngicas para acceder al sustrato de oxalato. En cada uno de los puntos colectados para observación por microscopía y para análisis IMC, se midió el pH disuelto (tabla 2). Los resultados indican un aumento de pH cuando las bacterias lograron hacer contacto con la superficie del medio objetivo.

Pareja	Muestra	Media pH H <sub>2</sub> O
1	Agar malta	7.2
	Esferas	7.6
	Agar Schlegel	8.5
2	Agar malta	7.3
	Esferas	8.3
	Agar Schlegel	8.4
3	Agar malta	7.5
	Esferas	7.9
	Agar Schlegel	8.0
4	Agar malta	7.2
	Esferas	7.5
	Agar Schlegel	7.8

Tabla 2. Mediciones de pH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> en cada punto donde se obtuvo muestra para realizar tinciones de Gram y muestras para reinocular en el microcalorímetro. Los valores de pH son mostrados como media entre los valores obtenidos a partir de las réplicas de cada pareja bacteria-hongo estudiada.

Para confirmar la presencia de bacterias oxalotróficas en el medio suplementado con Caox como única fuente de carbono, las muestras obtenidas en dicho medio fueron reinoculadas en medio Angle y monitoreadas en microcalorimetría isotérmica. Los termogramas de actividad oxalotrófica son presentados en la figura 4.

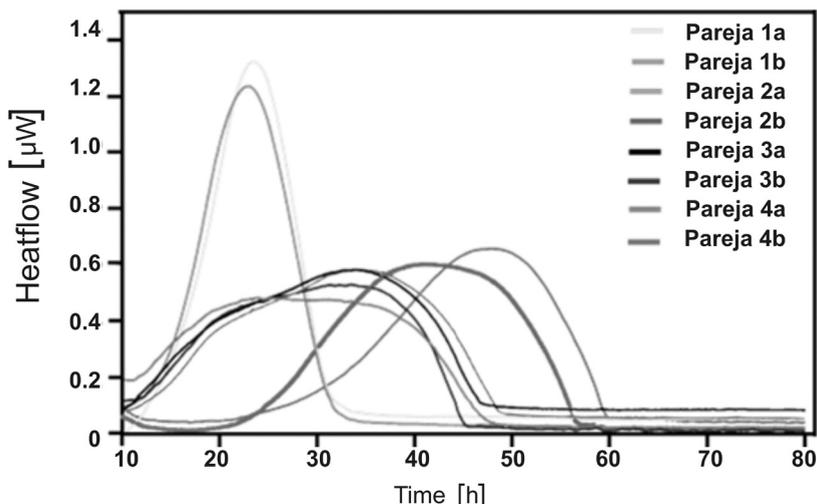


Figura 4. Termograma de IMC obtenido a partir de las parejas bacteria-hongo evaluadas en esta investigación. Se resalta la especificidad de actividad oxalotrófica para cada una de las parejas bacteria-hongo seleccionadas, después de todo, un termograma de actividad metabólica representa un *fingerprint* único de la identidad metabólica de un microorganismo. Estas variaciones en actividad máxima metabólica de bacterias oxalotróficas en función del hongo *Trichoderma* sp., confirman las observaciones realizadas a simple vista por halos de disolución de Caox en el medio objetivo, así como en las tinciones de Gram (Figura 3).

En el análisis calorimétrico, se observan dos situaciones particularmente llamativas. La primera, que no todas las bacterias seleccionadas responden igual ni al mismo tiempo de incubación, ni al estímulo que representa crecer junto con un hongo oxalogénico. Segunda, que los tiempos de generación, así como las tasas de crecimiento (tanto netas como máximas), se ajustan al perfil ecológico reportado en previos estudios sobre dichas cepas ambientales.

Los parámetros cinéticos de crecimiento se presentan en la tabla 3. La pareja 1 de bacteria-hongo correspondiente a *Lysobacter gummosus* – *Trichoderma* sp., con sus respectivas réplicas (a y b, en figura 4), presentó un máximo flujo de calor de 1.3  $\mu\text{W}$  a 23 horas de incubación. Es entre todas las parejas evaluadas, la que presenta una máxima tasa metabólica de actividad oxalotrófica registrada con un rango de consumación de oxalato de 0.221  $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ . Las parejas 2 y 3 correspondientes a *Variovorax soli* y *Agrobacterium* sp., con *Trichoderma* sp., respectivamente, mostraron una gran disminución de actividad oxalotrófica con respecto a la primera pareja evaluada. Estas presentaron una consumación total

de oxalato de 0.124 y 0.109  $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Por otro lado, un desplazamiento en su tasa de crecimiento es observado con respecto a la primera pareja. Estas dos parejas tienen una tasa máxima de crecimiento 10 horas después de lo monitoreado por la pareja 1. La actinobacteria *Streptomyces* sp., que hace parte de la pareja 4, no obstante, es la más afectada tanto en la consumación de oxalato como en el tiempo de crecimiento cuando cohabita con *Trichoderma* sp. Presenta una máxima tasa de crecimiento 20 horas después, en comparación con *Lysobacter gummosus* ( $\mu_{\text{max}} = 0.065 [\text{h}^{-1}]$ ). Sin embargo, implicaciones ecológicas sobre estas estrategias de crecimiento frente a un socio oxalogénico como *Trichoderma* sp, son discutidas a continuación.

Cepa	Flujo-calor máximo [ $\mu\text{W}$ ]	Kox cons. [ $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	$\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$\mu_{\text{max}}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]
<i>L. gummosus</i>	1.30	0.221	0.228	0.065
<i>V. soli</i>	0.50	0.124	0.155	0.027
<i>Agrobacterium</i> sp.	0.58	0.109	0.085	0.023
<i>Streptomyces</i> sp.	0.60	0.148	0.171	0.031

Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos por IMC. Los valores representan la media de las réplicas. Los cálculos se aproximan tanto a los valores termodinámicos de calor, provistos en literatura, como a lo reportado en previas investigaciones en dichas cepas. Nótese que los valores representan el crecimiento sinérgico entre la bacteria y el hongo (*Trichoderma* sp.) evaluados. Kox cons. = Oxalato de potasio consumido.

## Discusión de resultados

Los parámetros cinéticos fueron calculados para cada una de las cepas bacterianas evaluadas tras culminar incubación en el sistema columnar, y reinoculadas mediante microcalorimetría isotérmica. Dichos cálculos se realizaron teniendo en cuenta la señal grabada de crecimiento independiente de *Trichoderma* sp, sustrayendo este valor, de la cepa bacteriana, cuando es inoculada de manera independiente (Figura 5). Los valores de flujo máximo de calor, rango de consumación de oxalato, tasas de crecimiento neto, y de crecimiento máxima se presentan en la tabla 3.

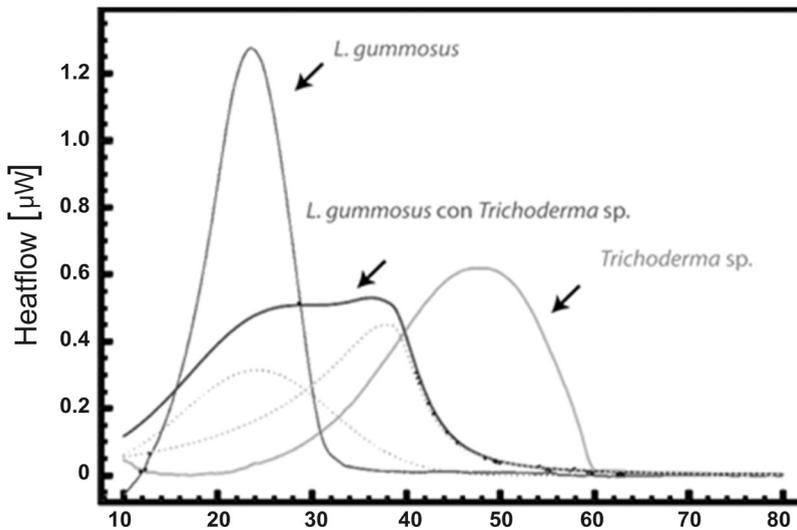


Figura 5. Representación de un termograma obtenido por análisis IMC. Este representa las curvas de flujo de calor obtenidas para cada uno de los microorganismos (bacteria y hongo). Las curvas representan el crecimiento monitoreado de manera independiente (líneas continuas) y cuando ambos organismos fueron inoculados en la misma ampolla del calorímetro (líneas punteadas y línea azul). Nótese que la adición de un hongo oxalotrófico, disminuye la máxima actividad oxalotrófica en la bacteria, pero compensa termodinámicamente el flujo de carbono a partir del sustrato de oxalato a través del tiempo; puesto que si se compara el tiempo de actividad en el termograma cuando la bacteria crece con el hongo, su rango metabólico aumenta en el tiempo, y por ende su expectativa de vida (compárese tasas de crecimiento neto para este efecto). Las líneas punteadas roja y verde representan el aporte sinérgico que cada organismo cumple en el proceso de crecimiento cuando ambos son inoculados en el mismo tiempo-espacio.

En la figura 5 se puede observar, que los rangos máximos de flujo de calor tanto para el hongo *Trichoderma sp.*, como para la actinobacteria *Streptomyces sp.* (Presentada en la figura 4), son muy similares ( $0.6 \mu\text{W}\cdot 50\text{h}^{-1}$ ). Este patrón de crecimiento se ha observado en previos estudios en los cuales se demostró que las actinobacterias presentan un patrón diferente de consumo de oxalato con respecto a bacterias Gram negativas u otros microorganismos diferentes de la clase Actinobacteria (Bravo *et al.*, 2011). Por tanto, el hecho de observar un microorganismo lento de crecimiento que no altera su ritmo cuando es inoculado con un hongo oxalotrófico, representa un interesante suceso a discutir. Se pensaría que por ser filamentosos, ambos organismos (*Streptomyces*

y *Trichoderma*) entrarían en competencia por otros sustratos, que probablemente puedan derivarse de los fosfatos y otros metales en el medio de cultivo (Goodfellow & Williams, 1983). Sin embargo, lo que se ha apreciado en estudios de microcosmos con muestras tomadas del suelo de Camerún, es que poblaciones actinobacterianas se ven favorecidas cuando se encuentran en presencia de hongos oxalogénicos (Martin, *et al.*, 2012, Bravo *et al.*, 2013a), aumentando así la eficacia del proceso geoquímico.

En la figura 5 se puede observar también que la cooperación entre bacterias y hongo en la vía oxalato-carbonato tiene fundamentales implicaciones con respecto a cómo ambos organismos modifican su estilo de vida o estrategia de crecimiento. Mientras para bacterias oxalotróficas crecer junto al hongo oxalogénico representa una menor actividad oxalotrófica inmediata, puede también representar una importante fuente de nutrientes a largo plazo. Por otro lado, el hongo oxalogénico, al crecer junto con las bacterias oxalotróficas, acelera su crecimiento, con respecto a su actividad normal sin la presencia de las mismas. Este hecho implica que la asociación en ambos casos es positiva. Porque el beneficio es expresado no solo en funciones fisiológicas, sino también en función del tiempo y las condiciones externas del ambiente (lo cual significa *per se* sinergia). Como bien se comprende el concepto, esta es más que la suma de dos fuerzas. En este caso, la sinergia estudiada entre bacterias oxalotróficas y un hongo oxalogénico, muestra el efecto positivo a largo plazo que conlleva la asociación para explotar mejor los beneficios de activar el ciclo biogeoquímico.

Este último suceso es fundamental para analizar, porque la vía oxalato-carbonato es un proceso natural que implica tiempo. A pesar que existen microorganismos eficientes en la oxidación de diferentes fuentes de oxalato en suelos tropicales, el proceso de liberación, transformación en iones carbonato, alcalinización y concomitante precipitación de calcita, en términos de toneladas de carbono, puede llevar escalas de tiempo geológico. Sin embargo, aunque el proceso es lento, no significa que no sea eficiente en el "sink" o secuestro de carbono derivado de las emisiones de CO<sub>2</sub> atmosférico.

Tomando como modelo la ampolla de microcalorimetría, donde dos de los actores importantes de la ruta OCP interactúan (bacterias y hongos), es posible calcular la cantidad de CO<sub>2</sub> transformado en función de los rangos de oxalato consumido. Estos cálculos se derivan del cambio de

entalpía en favor de la conversión de energía en calor liberado durante la cinética de cada microorganismo. La figura 6 ilustra un modelo basado en las apreciaciones de Braissant y Cailleau (comunicación personal) en cuanto a la edad de los árboles oxalogénicos, que implica el tiempo que tarda el proceso de fotosíntesis en generar una mol de oxalato, acumularse en los idioblastos y luego ser liberada en la litera por hongos saprófitos (Domergue, Helms, Prusky, & Browse, 2000), el rango metabólico de consumación de oxalato, que implica el tiempo que tarda una cepa oxalotrófica bacteriana en crecer en oxalato como única fuente de carbono y liberar iones carbonato y calcio (Bravo, et al., 2011), y la tasa de acumulación de calcita secundaria en suelos tropicales. El porcentaje de reducción de CO<sub>2</sub> atmosférico bajo el modelo presentado en la figura 6 es del 27.5% utilizando el ciclo biogeoquímico explicado en esta investigación.

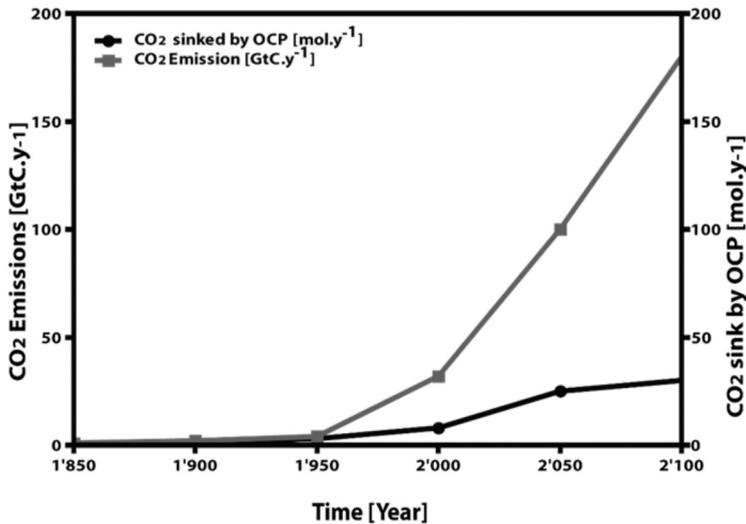


Figura 6. Modelo de predicción entre secuestro de carbono mediante la vía oxalato-carbonato (línea negra) y la predicción de emisión de CO<sub>2</sub> atmosférico (línea roja).

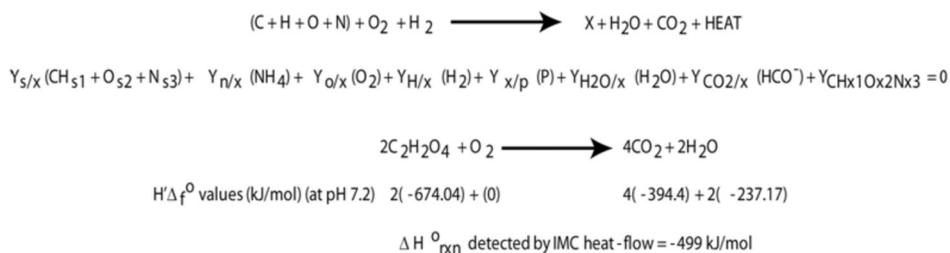
El modelo se basa en previos estudios que demuestran que es posible calcular el porcentaje de secuestro de CO<sub>2</sub> a partir de valores cinéticos de crecimiento bacteriano asociados a la transformación termodinámica del flujo de carbono. (Más detalles en (Anderson, et al. 2005). En este caso, el modelo explica en un 93% una reducción del 27.5% de emisión de CO<sub>2</sub>. Convenciones GtC.y<sup>-1</sup> = Gigatoneladas de carbono por año.

CO<sub>2</sub> sink = CO<sub>2</sub> secuestrado (mol por año).

El modelo presentado en la figura 6 se basa en dos conceptos, ambos termodinámicos. El primero de ellos, la asimilación oxidativa de oxalato como fuente de electrones y de carbono en las bacterias seleccionadas,

las cuales han demostrado presentar preferencias metabólicas sobre el oxalato que sobre otras fuentes de carbono, incluso sobre glucosa (Bravo *et al.*, 2013c). Esto se debe a que energéticamente pese a tener menos átomos de carbono que la glucosa, el oxalato es más rentable como donador de e-. Cuando se hace la comparación del cambio entálpico de energía por mol de cada molécula, por cada par de e-, el oxalato libera -328 kJ de energía; en tanto que la glucosa tan solo -239 kJ (Quayle, Keech, & Taylor, 1961). El segundo concepto está relacionado con la técnica empleada para medir la dinámica individual y en pareja de las bacterias oxalotróficas. Los datos de rendimiento de rangos de consumación de oxalato en moles por hora obtenidos por microcalorimetría isotérmica, son de precisión estequiométrica, permitiendo realizar cálculos en modelos ajustados a la conversión del flujo de carbono proveniente del CO<sub>2</sub> atmosférico transformado en carbonato, al rendimiento expresado en calor (Julios) obtenidos de la energía total debido a la asimilación del oxalato durante la cinética de crecimiento. Por tanto, la diferencia entre el carbono total transformado a carbonato y el asimilado por la bacteria por oxidación de oxalato, refleja la misma energía estándar libre. Teóricamente, debido a la segunda ley de la termodinámica, que es la entropía, la energía libre conservada es proporcional a la energía libre liberada. En este estudio, la energía liberada (calor) ha sido medida con precisión del flujo de calor por dinámicas de crecimiento microbiano, con una estabilidad isotérmica de ±20 micro-Kelvins durante 80 horas.

La estimación del CO<sub>2</sub> secuestrado como producto de un OCP activo en un sistema cerrado como la ampolla del microcalorímetro, se logró mediante cálculos de entalpía entre la cantidad de CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera de la ampolla, más la cantidad de sustrato oxalato y la cantidad de carbono atrapado como resultado de la tasa de crecimiento neto definido por el calor disipado. Para ello, se tuvo en cuenta la siguiente reacción:



La ecuación describe el cambio de entalpía en el sistema evaluado bacteria-hongo, el cual fue medido por IMC. Bajo la segunda ley de la termodinámica, los rendimientos en la transformación de las fuentes de nutrientes, corresponden a los mismos valores de la generación de biomasa, respiración ( $\text{CO}_2$ ), producción de agua y calor. Tomando en cuenta que el calor liberado corresponde al valor medido por IMC, los parámetros cinéticos obtenidos en la ampolla representan el flujo de carbono entre el  $\text{CO}_2$  emitido y el carbono secuestrado. Para determinar el porcentaje total de este en el sistema, se toma como base el cálculo termodinámico. Sin embargo, para conocer valores experimentales, futuros estudios con difracción de rayos X -MS serán necesarios, y de esta manera, cuantificar las moles de calcita encontradas en el medio tras medir la actividad biológica bacteria-hongo.

La estimación de las emisiones de  $\text{CO}_2$  durante los próximos 87 años, fueron ajustadas al reporte oficial del IPCC (Intergovernmental panel on climatic change) en 2007, mediante un estudio de varios modelos sobre los factores reales que aceleran las emisiones globales y locales de este gas de invernadero. Investigaciones anteriores han desarrollado algunos patrones que fueron tenidos en cuenta con respecto a las emisiones de  $\text{CO}_2$  (Raupach, *et al.*, 2007). La aplicación de la vía oxalato-carbonato y el favorecimiento de poblaciones bacterianas oxalotróficas con altos valores ecológicos con relación a hongos que participan en el ciclo, contribuirían en un 27.5% a reducir las emisiones de  $\text{CO}_2$  en ambientes tropicales. Este es un dato a tener en cuenta.

## Conclusiones

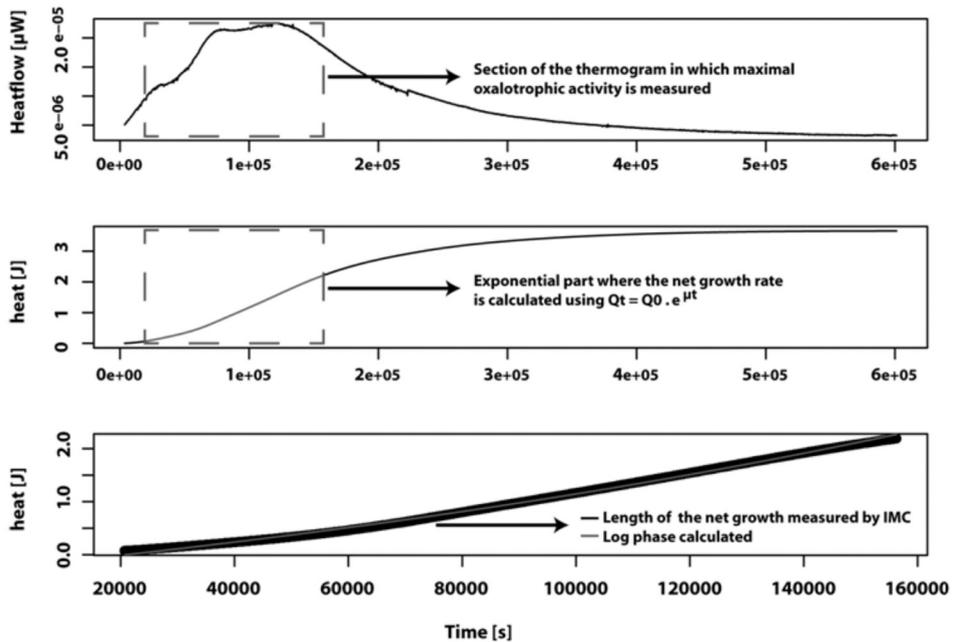
Esta investigación tuvo como objetivo el dar a conocer el verdadero rol que juegan las interacciones bacteria-hongo sobre una ruta biogeoquímica poco estudiada, como lo es la vía oxalato-carbonato. Esta ha demostrado tener un enorme potencial de regulación natural en ambientes terrestres frente a los desbalances de  $\text{CO}_2$ . También, se demostró que bacterias como *Lysobacter gummosus* o *Agrobacterium* sp, presentan una alta tasa metabólica relacionada con la degradación de fuentes de oxalato. Sin embargo, se ha destacado otra estrategia de aprovechamiento de nutrientes por otro tipo de bacterias clasificadas como “de lento crecimiento”, como lo son los actinomicetos, que pese a tener una tasa máxima de crecimiento menor a las dos bacterias mencionadas, puede desarrollarse en largos periodos usando el oxalato como única fuente

de carbono, y por tanto, podrían fácilmente ser reconocidos como “oxalótrofos obligados”. En ambos casos, se determinó que la influencia de *Trichoderma* sp, sobre su crecimiento fue favorable y permitió aprovechar el recurso oxalato de manera “sostenible” o autorregulando las tasas de crecimiento, frente a condiciones de escasas de otros nutrientes; condición que fácilmente puede observarse en el hiperespacio del nicho microbiano *in situ*. La aplicación del sistema columnar en bosques tropicales, mostró que la matriz de suelo, provee numerosos ejes de nicho en la denominada teoría de hiperespacio microbiano de Hutchinson. En estos, la sinergia hongo-bacteria en la vía OCP ha sido caracterizada termodinámicamente. La sinergia implicó en este caso, un consumo de oxalato a largo plazo, lo que conlleva a una precipitación continua de calcita. El modelo final aplicado demostró que la sinergia estudiada entre bacterias oxalotróficas y hongos oxalogénicos, puede contribuir en un 27.5% a disminuir las emisiones de CO<sub>2</sub>. La reflexión en este punto, debería entonces conducirnos a tomar acción sobre los graves efectos que conlleva no hacer nada, frente a la polución de origen antrópico y el cambio climático. Dicha reflexión debería despertar nuestra conciencia y compromiso con el planeta tierra. Porque, aun si llegase a comprobarse teorías como la del “Multiverso” (Tegmark, 2007), en la cual existen más planetas Tierra, por lo pronto somos conscientes solo de uno, el nuestro, y todos los sistemas vivos en este planeta, empezando por las bacterias de suelos tropicales, demandan nuestra atención sobre nuestras acciones (Kerr, 2013).

## Agradecimientos

Quiero agradecer a la profesora Pilar Junier, directora del grupo LAMUN de la Universidad de Neuchâtel, por su continuo seguimiento y tutoría durante estos últimos años. Al Dr. Head researcher, Olivier Braissant, director del grupo de biomicrocalorimetría y biomecánica de Basel Universität LOB2 (Biozentrum/Pharmazentrum), por su amistad, su asesoramiento, completa colaboración y seguimiento profesional en mi camino por estudiar mediante la microcalorimetría isotérmica el metabolismo bacteriano. Este estudio fue financiado parcialmente por el proyecto FP7 de la Comunidad Europea - CO2SolStock - Project, Grant Agreement No 226306. Finalmente, un gran “Merci” por apoyo y logística, al grupo de laboratorio de microbiología LAMUN de la Universidad de Neuchâtel, Suiza.

Figura suplementaria 1:



Sketch explicando cómo fue calculada la tasa de crecimiento neto usando los termogramas obtenidos mediante IMC. El parámetro cinético de crecimiento neto fue calculado aplicando un modelo exponencial usando el calor liberado como respuesta termodinámica al crecimiento bacteriano. La ecuación de Richards fue usada como modelo de crecimiento exponencial microbiano y el calor como parámetro de crecimiento (ver Zwietering, *et al.*, 1991).

## Referencias bibliográficas

- Anderson TR, Hessen DO, Elser JJ & Urabe J (2005). Metabolic stoichiometry and the fate of excess carbon and nutrients in consumers. *The American naturalist* 165 (1): 1-15.
- Angle JS, McGrath S.P., and Chaney R.L (1991). New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Appl Environ Microbiol.* 1991 December; 57(12): 3674-3676.
- 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 microbiology letters* 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 A.U, Verrecchia E, & Junier P (2011). Use of an isothermal microcalorimetry assay to characterize microbial oxalotrophic activity. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 266-274.
- Bravo D, Cailleau G, Bindschedler S, Simon A, Job D, Verrecchia E, & Junier P (2013a). Isolation of oxalotrophic bacteria able to disperse on fungal mycelium. *FEMS Microbiology Letters*. In Press.
- Bravo D, Martin G, Cailleau G, Verrecchia E, & Junier P (2013b). Identification of active oxalotrophic bacteria by BrdU-DNA labeling assay in a microcosm study. *FEMS Microbiology Letters*. 89 (55): 247-253.
- Bravo D, Braissant O, Cailleau G, Verrecchia E, & Junier P (2013c). Isolation and characterization of oxalotrophic bacteria from tropical soils. *Geobiology*. Submitted.
- Cailleau G, Braissant O, & Verrecchia E (2011). Turning sunlight into stone: the oxalate-carbonate pathway in a tropical tree ecosystem. *Biogeosciences* 8: 1755-1767.
- Cromack K Jr., Sollins P, Todd RL, Fogel R, Todd AW, Fender WM, Crossley ME, Crossley DA Jr. (1977). The role of oxalic acid and bicarbonate in calcium cycling by fungi and bacteria: some possible implications for soil animals. *Ecological Bulletin, Stockholm*, 25: 246-252.
- Dean JA (1999). *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill, New York.
- Domergue F, Helms GL, Prusky D, & Browse J (2000). Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry* 54: 183-189.
- Goodfellow M & Williams ST (1983) Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37: 189-216.
- Kerr RA (2013). Soot is warming the world even more than thought. *Science* 339 (6118): 382.
- Kintisch E (2013). Climate study highlights wedge issue. *Science* 339 (6116): 127-129.

- Kohlmeier S, Smits TH, Ford RM, Keel C, Harms H, & Wick LY (2005) Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environmental science & technology* 39 (12): 4640-4646.
- Madigan M, Martinko J, & Parker J (2000). Brock biology of microorganisms. Prentice Hall.
- 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. *Environmental microbiology* 14: 2960-2970.
- Quayle JR, Keech DB, & Taylor GA (1961). Carbon assimilation by *Pseudomonas oxalaticus* (OXI). 4. Metabolism of oxalate in cell-free extracts of the organism grown on oxalate. *The Biochemical journal* 78 (2): 225-236.
- Raupach MR, Marland G, Ciais P, Le Quere C, Canadell JG, Klepper G, & Field CB (2007). Global and regional drivers of accelerating CO<sub>2</sub> emissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (24): 10288-10293.
- Tamer A & Aragno M (1980). Isolement, caractérisation et essai d'identification de bactéries capables d'utiliser l'oxalate comme seule source de carbon et d'énergie. *Bulletin de la Société Neuchâteloises de Sciences Naturelles* 103: 91-104.
- Tegmark M (2007). Many lives in many worlds. *Nature* 448: 23-24.
- Verrecchia E, Braissant O, & Cailleau G (2006). The oxalate-carbonate pathway in soil carbon storage: the role of fungi and oxalotrophic bacteria. In G. Gadd (Ed.), *Fungi in Biogeochemical Cycles* (p. 289-310). United Kingdom: Cambridge University Press.
- Wei Y & Fang Y (2013). Spatio-Temporal Characteristics of Global Warming in the Tibetan Plateau during the Last 50 Years Based on a Generalised Temperature Zone - Elevation Model. *PloS one* 8 (4).
- Wick LY, Remer R, Würz B, Reichenbach J, Braun S, Schäfer F, & Harms H (2007). Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. *Environmental science & technology* 41: 500-505.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, & van 'T Riet K (1990). Modelling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56 (6): 1875-1881.
- Zwietering MH, de Koos JT, Hasenack BE, de Witt JC, & van 'T Riet K (1991) Modelling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl Environ Microbiol* 57: 1094-1101.