



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y  
MATERIALES

**DESARROLLO DE UN MODELO METABÓLICO A ESCALA GENÓMICA  
PARA BACTERIAS ASOCIADAS CON EL ALGA PARDA *MACROCYSTIS*  
*PYRIFERA* Y SU INTEGRACIÓN EN EL HOLOBIONTE**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

**FAINA CRISTINA VALLE DONOSO**

PROFESORA GUÍA:

Ziomara Gerdtzen Hakim

PROFESORA CO-GUÍA:

Natalia Jiménez Tapia

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

Carolina Camus Torres

Álvaro Olivera Nappa

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por:

Núcleo Milenio MASH

SANTIAGO DE CHILE

2024

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: FAINA CRISTINA VALLE DONOSO  
FECHA: 2024  
PROF. GUÍA: ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

## **DESARROLLO DE UN MODELO METABÓLICO A ESCALA GENÓMICA PARA BACTERIAS ASOCIADAS CON EL ALGA PARDA *MACROCYSTIS PYRIFERA* Y SU INTEGRACIÓN EN EL HOLOBIONTE**

El alga parda *Macrocystis pyrifera*, conocida como huiro, es un organismo de gran relevancia para los ecosistemas marinos, donde actúa como base trófica de las redes alimentarias marinas. Existe un creciente interés en el uso de algas pardas como fuente de biomasa para la producción de una amplia gama de productos, como farmacéuticos, alimenticios y biocombustibles, intensificando la recolección de sus lechos naturales. Esto ha generado interés en estudiar prácticas de cultivo efectivas que favorezcan la producción sostenible del alga y evitar su sobreexplotación.

En la superficie de esta macroalga habitan comunidades bacterianas que benefician su crecimiento mediante el intercambio de nutrientes, sistema de codependencia que se define como holobionte. El objetivo de este trabajo es estudiar la complementariedad metabólica entre *Macrocystis pyrifera* y las bacterias que conforman este sistema mediante el uso de modelos metabólicos a escala genómica (GEM), que describen las reacciones metabólicas de los organismos provenientes de su información genómica.

Se dispone de un GEM borrador de *M. pyrifera* y de genomas de las bacterias asociadas. La propuesta metodológica de este trabajo consiste en anotar estructural y funcionalmente estos genomas bacterianos, para luego reconstruir sus GEMs. Estos GEMs construidos son integrados con el del alga para predecir la capacidad metabólica total del holobionte y seleccionar el subconjunto de bacterias mínimo que complementa el metabolismo de *M. pyrifera* para alcanzar la producción de un conjunto de metabolitos de interés.

Los resultados obtenidos de este análisis muestran que el alga en presencia de esta comunidad bacteriana aumenta su capacidad de producir metabolitos en un 44 % (308), entre los que se encuentran compuestos necesarios para la producción de biomasa, como el manitol, lisina e histidina. Sin embargo, existen compuestos fundamentales en algas pardas que no son producibles, como alginato, fucoxantina y tocoferoles, evidenciando redes incompletas en los modelos del holobionte que no permiten considerar funcional la red del alga.

Gracias al estudio de estas interacciones metabólicas en el holobionte, se logra conocer las potenciales interacciones beneficiosas y seleccionar consorcios bacterianos para alcanzar el máximo potencial metabólico, siendo un primer acercamiento para propuestas de cultivo efectivas y que promuevan el crecimiento de *Macrocystis pyrifera* en un cultivo *in vivo*.

*Para mi familia.*

# Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia por todo el apoyo, cariño y enseñanzas que me han brindado, en particular en esta etapa universitaria, por darme ánimos las veces que me quise rendir y por confiar siempre en mis decisiones. A mi papá, Francisco, por fomentar mi curiosidad en la ciencia e intentar siempre dar respuesta a las cosas que no entendía. A mi mamá, Dafne, por ser una buena compañera, estar ahí para todas mis tonteras y por ser el alma de la fiesta cada vez que invito amigos a mi casa. A mi gato Kobito, por llegar a nuestra vida en el momento justo, entregarnos mucho cariño y acompañarnos en los días de pandemia.

A mi abuelo Emilio, ya que en él vi una persona apasionada al estudio y me enseñó la importancia de la dedicación para alcanzar metas. A mi abuela Bernardita por los consejos, enseñanzas y gran apoyo, y a mis abuelos Nelson y Carmen por su enorme cariño, risas y comidas ricas .

A Vicente, mi mejor amigo y pareja, por saludarme ese día en la biblioteca que permitió conocernos y tener una amistad llena de risas, consejos y conversaciones largas. Por su apoyo y amor incondicional en mis buenos y malos momentos, por los lindos viajes, tardes de juego y series. Por enseñarme tanto y ayudarme siempre con mis problemas computines.

A mi profesora guía Ziomara Gerdtzen y mi profesora co-guía Natalia Jiménez por la disposición y paciencia durante el desarrollo de este trabajo. Agradezco mucho haber sido parte de este equipo, los aprendizajes adquiridos y la buena onda presente en cada reunión acompañada de tecitos.

Finalmente, a los cabros de la u, por estar apañando desde el primer semestre, por las largas tardes de “estudio” en biblio 3, por las risas, los carretes y los viajes. Agradezco haberlos conocido y verlos crecer en los distintos aspectos de sus vidas.

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Objetivos . . . . .	6
<b>2. Marco teórico y estado del arte</b>	<b>7</b>
2.1. Marco teórico . . . . .	7
2.1.1. Metagenómica . . . . .	10
2.1.2. Anotación de genomas . . . . .	12
2.1.3. Modelos metabólicos a escala genómica (GEMs) . . . . .	12
2.2. Estado del arte . . . . .	15
<b>3. Metodología</b>	<b>18</b>
3.1. Anotación de genomas bacterianos . . . . .	21
3.2. Generación de modelos metabólicos a escala genómica bacterianos . . . . .	21
3.3. Predicción de capacidades metabólicas del holobionte . . . . .	22
3.4. Selección de consorcios mínimos . . . . .	24
3.5. Comparación con comunidad bacteriana de <i>Ectocarpus siliculosus</i> . . . . .	25
<b>4. Resultados</b>	<b>26</b>
4.1. Construcción de modelos metabólicos a escala genómica . . . . .	26
4.2. Capacidad metabólica del holobionte . . . . .	27
4.3. Inspección de redes metabólicas asociadas a la producción de metabolitos de-seados . . . . .	33
4.3.1. Redes metabólicas de producción de metabolitos de la biomasa de <i>M. pyrifera</i> . . . . .	33
4.3.1.1. Metabolitos de biomasa producibles por <i>M. pyrifera</i> en presencia de la comunidad bacteriana . . . . .	33
4.3.1.2. Metabolitos de biomasa no producibles por <i>M. pyrifera</i> en el holobionte . . . . .	35
4.3.2. Redes metabólicas de producción de metabolitos del metaboloma de alga parda . . . . .	39
4.3.2.1. Vitaminas del metaboloma producibles por <i>M. pyrifera</i> en presencia de la comunidad bacteriana . . . . .	39
4.3.2.2. Vitaminas del metaboloma no producibles por <i>M. pyrifera</i> en presencia de la comunidad bacteriana . . . . .	41
4.4. Consorcios mínimos . . . . .	42
4.5. Comparación con comunidad microbiana de <i>Ectocarpus siliculosus</i> . . . . .	44
<b>5. Discusiones</b>	<b>46</b>

5.1.	Modelos metabólicos a escala genómica . . . . .	46
5.1.1.	GEM de <i>Macrocystis pyrifera</i> . . . . .	46
5.1.2.	GEMs de la comunidad bacteriana . . . . .	47
5.1.3.	Herramientas computacionales . . . . .	50
5.1.3.1.	Prokka para la anotación de los genomas bacterianos . . . . .	50
5.1.3.2.	Pathway Tools para la generación de GEMs . . . . .	51
5.2.	Capacidad metabólica del holobionte . . . . .	52
5.2.1.	Producción de metabolitos encargados de crecimiento de biomasa de <i>M. pyrifera</i> . . . . .	54
5.2.1.1.	Metabolitos de biomasa que se vuelven producibles por el alga en el holobionte . . . . .	55
5.2.1.2.	Metabolitos de biomasa no producidos por el alga en el holobionte . . . . .	58
5.2.2.	Producción de metabolitos que conforman el metaboloma de alga parda . . . . .	61
5.2.3.	Producción de vitaminas por el alga en el holobionte . . . . .	63
5.3.	Comunidad bacteriana y selección de consorcios mínimos . . . . .	66
5.3.1.	Selección de consorcios mínimos . . . . .	68
5.4.	Comparación entre la comunidad bacteriana de <i>Macrocystis pyrifera</i> y <i>Ectocarpus siliculosus</i> . . . . .	70
5.4.1.	MiSCoTo como predictor de capacidad metabólica del sistema simbiótico y consorcios mínimos . . . . .	72
<b>6.</b>	<b>Conclusión</b> . . . . .	<b>75</b>
6.1.	Trabajo futuro . . . . .	76
<b>7.</b>	<b>Glosario</b> . . . . .	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>Material suplementario</b> . . . . .	<b>79</b>
	<b>Bibliografía</b> . . . . .	<b>80</b>
	<b>Anexos</b> . . . . .	<b>91</b>
A.	Especies bacterianas identificadas asociadas a <i>Macrocystis Pырifera</i> . . . . .	91
B.	Objetivos metabólicos . . . . .	92
B.1.	Metabolitos encargados del crecimiento de biomasa de <i>Macrocystis pyrifera</i> . . . . .	92
B.2.	Metabolitos del metaboloma de algas pardas . . . . .	93
B.3.	Metabolitos totales producibles por <i>Macrocystis pyrifera</i> en presencia de la comunidad bacteriana . . . . .	96
C.	Generación de archivo <i>target</i> a partir de una lista de metabolitos . . . . .	100
D.	Instalación de herramientas . . . . .	101
D.1.	Prokka . . . . .	101
D.2.	Pathway Tools . . . . .	101
E.	Documentación de problema en el uso de herramienta Memote . . . . .	102
F.	Reparación de archivos GenBank . . . . .	102
G.	Generación de PGDB con PathoLogic . . . . .	105
H.	Composición del medio de cultivo . . . . .	109
I.	Comparación en el número de genes en GEMs bacterianos . . . . .	110

J.	Presencia de metabolitos no producibles en los GEMs . . . . .	111
J.1.	Metabolitos de biomasa de <i>M. pyrifer</i> a . . . . .	111
J.2.	Metabolitos que forman parte del metaboloma de algas pardas . . . . .	112
J.3.	Vitaminas totales . . . . .	115
K.	Vías metabólicas de interés . . . . .	116

# Índice de Tablas

4.1.	Genes codificantes, reacciones y metabolitos de GEMs bacterianos . . . . .	27
4.2.	Consortios mínimos . . . . .	42
4.3.	Metabolitos totales que produce el alga asociada a los consorcios mínimos . . .	43
4.4.	Comunidad bacteriana de <i>E. siliculosus</i> . . . . .	44
A.1.	Especies del holobionte . . . . .	91
B.1.	Metabolitos de biomasa de <i>M. pyrifer</i> . . . . .	92
B.2.	Metabolitos que conforman el metaboloma de algas pardas . . . . .	93
B.3.	Metabolitos que se vuelven producibles por el alga en el holobionte . . . . .	96
H.1.	Medio de cultivo . . . . .	109
J.1.	Mapeo de metabolitos de biomasa . . . . .	111
J.2.	Mapeo de metabolitos del metaboloma . . . . .	112
J.3.	Mapeo de vitaminas totales . . . . .	115

# Índice de Ilustraciones

1.1.	Bosques marinos de <i>Macrocystis pyrifera</i> . . . . .	2
1.2.	Representación del holobionte de alga parda . . . . .	3
1.3.	Generación de GEMs para el estudio metabólico del holobionte algal . . . . .	4
2.1.	Redes metabólicas . . . . .	8
2.2.	Representación de función de biomasa . . . . .	9
2.3.	Reconstrucción de MAGs . . . . .	11
2.4.	Reconstrucción de GEMs . . . . .	13
2.5.	Predicción de interacciones metabólicas entre GEMs . . . . .	14
3.1.	Propuesta metodológica . . . . .	20
4.1.	Producción de metabolitos totales por el alga y el holobionte . . . . .	28
4.2.	Metabolitos de biomasa y metaboloma que produce el alga en el holobionte . . . . .	29
4.3.	Producción de metabolitos de biomasa y metaboloma por categoría . . . . .	30
4.4.	Vitaminas que produce el alga en el holobionte . . . . .	31
4.5.	Mapeo de metabolitos de biomasa y metaboloma no producibles . . . . .	32
4.6.	Metabolitos de biomasa y metaboloma que producen las comunidades bacterianas de <i>M. pyrifera</i> y <i>E. siliculosus</i> . . . . .	45
4.7.	Producción de metabolitos de comunidad de <i>M. pyrifera</i> y <i>E. siliculosus</i> con respecto al objetivo . . . . .	45
I.1.	Genes codificantes y no codificantes en GEMs de bacterias. . . . .	110
K.1.	Biosíntesis de ácido oleico . . . . .	116
K.2.	Biosíntesis de histidina . . . . .	117
K.3.	Biosíntesis de lisina . . . . .	118
K.4.	Ciclo del manitol . . . . .	119
K.5.	Biosíntesis de $\beta$ -caroteno . . . . .	120
K.6.	Reacciones presentes en los GEMs que permiten la para producción de $\beta$ -caroteno . . . . .	121
K.7.	Hidrólisis de acetil-CoA . . . . .	121
K.8.	Biosíntesis de cisteína a partir de homocisteína . . . . .	122
K.9.	Biosíntesis de cisteína en mycobacterias . . . . .	122
K.10.	Biosíntesis de cisteína . . . . .	123
K.11.	Biosíntesis de metionina . . . . .	124
K.12.	Biosíntesis de metionina . . . . .	125
K.13.	Asimilación de sulfato . . . . .	125
K.14.	Regla del extremo Ac/N . . . . .	126
K.15.	Biosíntesis de tocoferoles . . . . .	126
K.16.	Biosíntesis de tocotrienoles . . . . .	127
K.17.	Recuperación de NAD . . . . .	128
K.18.	Recuperación de piridoxal-5-P . . . . .	129
K.19.	Biosíntesis de flavina . . . . .	130

K.20.	Biosíntesis de tiamina difosfato . . . . .	131
K.21.	Biosíntesis de carnitina . . . . .	132
K.22.	Biosíntesis de fosfopantotenato . . . . .	133
K.23.	Recuperación de adenosilcobalamina . . . . .	134

# Capítulo 1

## Introducción

Las algas pardas (clase *Phaeophyceae*) son los organismos dominantes en muchas de las regiones costeras del mundo y son esenciales para los ecosistemas marinos, donde actúan como base trófica de las redes alimentarias marinas [1]. A menudo forman extensos bosques submarinos que albergan un alto nivel de biodiversidad, puesto que proporcionan refugio y lugar de reproducción para muchos organismos [2]. Existe un creciente interés en el uso de algas pardas como fuente de biomasa para la producción de una amplia gama de productos, incluidos alimentos, nutracéuticos, farmacéuticos, químicos, fertilizantes, alimenticios y bio-combustible [3, 4], esto debido a que poseen la característica de producir grandes cantidades de biomasa y que su cultivo no compite con los cultivos alimentarios por el uso de la tierra cultivable ni agua dulce [1, 3].

El alga gigante *Macrocystis pyrifera*, conocida en Chile como huiro, está presente en el Océano Pacífico y es muy abundante en las zonas costeras de Chile y Perú [5]. Es una de las macroalgas pardas más grandes, alcanzando longitudes de hasta 60 metros [1] y forma grandes bosques marinos, como se muestra en la Figura 1.1. Sus principales usos son: como alimento para moluscos de alto valor (como el abalón), aditivo alimentario y como fuente para la extracción de alginato con el fin de producir hidrocoloides, que sirven como agentes gelificantes y estabilizadores de productos en la industria alimentaria y cosmética [5, 6]. También ha crecido su interés en la industria farmacéutica como agente coagulante de sangre para heridas o en forma de perlas de alginato para la liberación controlada de medicamentos y otras sustancias [6, 7]. Por otro lado, la industria de las energías renovables se ha interesado en utilizar biomasa de macroalgas como materia prima para biocombustibles [8] y *M. pyrifera* ha sido considerada una de las macroalgas más prometedoras como especie de cultivo debido a sus altas tasas de crecimiento [9], contenido de polisacáridos [10] y oportunidad de alcanzar cultivos a gran escala gracias a su vasta extensión en los océanos [9].

En 2016 la recolección silvestre mundial de *M. pyrifera* alcanzó una producción cercana a las 30.000 toneladas, sin embargo, sólo se produjo una tonelada mediante la acuicultura [4]. La intensa recolección sobre los lechos naturales de algas ha provocado daños por sobre-explotación [12] y sumado al calentamiento de los océanos y la contaminación, los bosques de algas marinas están disminuyendo su población [10, 13]. La acuicultura puede ayudar a reducir el impacto de la recolección silvestre de algas [4], promoviendo el mantenimiento, restauración y preservación de los ecosistemas marinos [10], donde *M. pyrifera* ha mostrado muchas ventajas sobre otras macroalgas pardas en términos de productividad, rendimiento,



Figura 1.1: Fotografía de grandes bosques marinos formados por el alga gigante *Macrocystis pyrifera* [11].

distribución geográfica y facilidad de reproducción y cultivo [8]. Si bien se han realizado estudios de cultivo agrícola de *M. pyrifera* en Chile [12, 14, 15], la información disponible sobre las condiciones de cultivo del alga es escasa [10] y los resultados de producción de biomasa son variables en cuanto a métodos de cultivo [12, 15], dificultando establecer prácticas de cultivo sólidas y confiables que permitan llevar a cabo una actividad productiva y comercial exitosa [10].

La mayoría de los eucariontes, si no todos, viven en asociación con bacterias y han desarrollado interacciones complejas con ellas [16, 17]. Esta estrecha relación de dependencia entre comunidades microbianas y un organismo huésped se define como holobionte, que consiste en un metaorganismo que coopera metabólicamente y evolutivamente [16]. Los estudios de los holobiontes han proporcionado importantes conocimientos funcionales sobre la biología de estos organismos [17], como sucede en el intestino humano, cuyas bacterias se relacionan con la estimulación del sistema inmunológico [18], o los sistemas de raíces de las plantas, donde el microbioma vegetal se relaciona con la absorción de nutrientes y productividad de las plantas [19].

Con respecto a las macroalgas, su superficie es un sustrato muy atractivo para el asentamiento de microorganismos marinos, debido a que excretan activamente carbohidratos y otras sustancias orgánicas o promotoras del crecimiento que pueden ser rápidamente utilizadas por las bacterias, formando biopelículas que confieren al alga una mayor tolerancia al estrés ambiental [20, 21]. La comunidad microbiana asociada con las algas marinas tiende a ser específica de cada especie, compleja, dinámica y constituida por una variedad de especies [22, 23]. En la Figura 1.2 se puede apreciar una representación del holobionte en un conjunto de algas.

Varios estudios demostraron efectos beneficiosos de las bacterias sobre las algas, principalmente a través de la producción de hormonas de crecimiento [25], vitaminas [25–27], asimilación del nitrógeno [27–29] y degradación de polisacáridos [27]. Se han identificado comunidades microbianas en diversas algas pardas, como *Fucus vesiculosus* [30], *Nereocystis luetkeana* [27] y *Ectocarpus subulatus* [31–33], además, se ha demostrado una dependencia

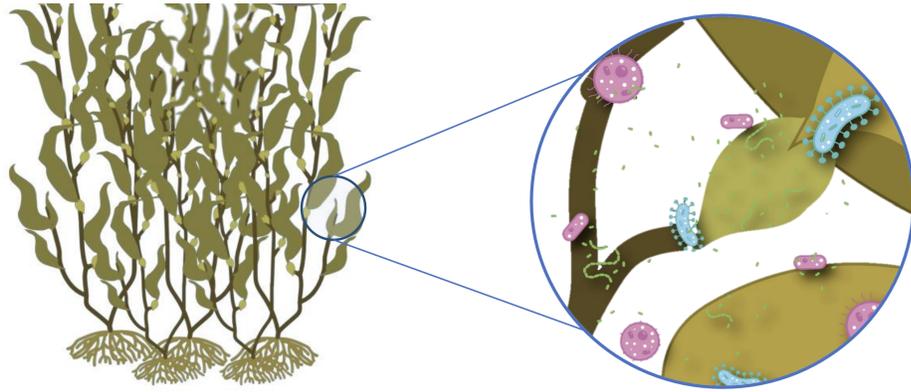


Figura 1.2: Representación del holobionte compuesto por un alga parda y la comunidad bacteriana que habita en su superficie. Esta comunidad se compone de diversas especies, representadas con distintos colores y formas, que interactúan física y metabólicamente con el alga [24].

absoluta de bacterias en el crecimiento del alga *Ectocarpus fasciculatus*, ya que no se desarrollan adecuadamente en condiciones axénicas en medios artificiales debido a la falta de citoquinina [25, 34].

En general, se realizan cultivos axénicos o tratados con antibióticos, ya que el componente bacteriano de los cultivos de algas es difícil de evaluar el efecto de las interacciones con el microbioma [35]. Por lo tanto, el estudio de las posibles interacciones entre especies e intercambios metabólicos que podrían ocurrir entre los organismos asociados al holobionte es de gran importancia, no sólo para la comprensión del comportamiento de las macroalgas en los ecosistemas marinos, sino también para mejorar el cultivo de estas [32, 33].

Una forma de analizar estas interacciones potencialmente beneficiosas entre comunidades microbianas y el huésped (alga) es mediante experimentos *in vivo* de cocultivo dirigidos utilizando bacterias cultivables y monitoreando las interacciones [22, 34], pero a medida que aumenta el número de organismos el estudio se vuelve una tarea compleja [32]. Como la mayoría de las funciones biológicas, incluidas las interacciones entre organismos, pueden expresarse en función de diferentes procesos metabólicos [35], los modelos metabólicos son una buena alternativa para estudiar el comportamiento de un sistema compuesto por más de una especie, proporcionando una herramienta útil para abordar *in silico* su complejidad y comprender su funcionamiento [17, 35]. Los modelos metabólicos pueden derivarse de la información genómica de los organismos, llamados modelos metabólicos a escala genómica, conocidos en inglés como Genome-scale Models (GEMs por sus siglas en inglés), que describen un conjunto completo de reacciones químicas de un organismo [36], permitiendo simular parcialmente el comportamiento metabólico de sistemas biológicos e investigar sus propiedades funcionales [37].

Para abordar la complejidad del holobionte algal se ha propuesto un enfoque centrado en el metabolismo que utiliza GEMs del alga y las bacterias asociadas de forma combinada, que permite explorar a fondo la capacidad metabólica del holobionte en base a la complementariedad de las redes que lo componen [17, 38–40]. Para conseguir esto, se ha propuesto una metodología que inicia con la obtención de la secuencia genómica de los organismos a partir

de la extracción de ADN, la que puede realizarse a los organismos de manera individual mediante el aislamiento de cultivos de microbianos o a un conjunto mediante metagenómica, que permite considerar organismos no cultivables (Figura 1.3 A-B).

A partir de las secuencias genómicas se construyen las redes metabólicas individuales, cuya generación manual no es factible para aplicarse a conjuntos de varios organismos debido a la gran cantidad de información y el tiempo que se requiere para manipularla [41]. Sin embargo, los avances en bioinformática han logrado obtener automáticamente predicciones sólidas de las capacidades metabólicas, lo que permite la generación de borradores de los modelos metabólicos de los diferentes organismos del holobionte.

Estos GEMs construidos se fusionan para constituir un borrador de red del holobionte (Figura 1.3 C), que finalmente se puede refinar con curación manual o con herramientas de “llenado de espacios” (*gap-filling*) para agregar reacciones hipotéticas faltantes que son indispensables para la correcta simulación del modelo metabólico. El modelo resultante es una aproximación de la red metabólica del holobionte que puede resaltar posibles puntos de comunicación entre las redes de los organismos del holobionte [35], brindando la oportunidad de vislumbrar las posibles funciones biológicas del microbioma con la ventaja de que este enfoque no se limita a organismos cultivables [17].

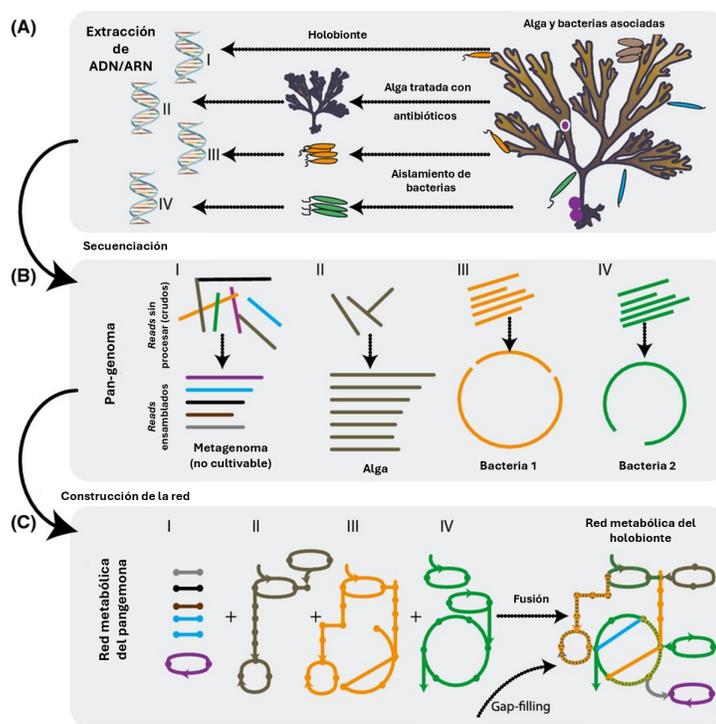


Figura 1.3: Pasos para la generación de un modelo metabólico a escala genómica (GEM) de un holobionte conformado por un alga y sus bacterias asociadas. (A) El aislamiento de los diferentes organismos del holobionte y de su ADN, (B) la secuenciación genómica, (C) la reconstrucción de redes metabólicas individuales y su combinación. (Modificado de [35])

Otra función que posee la integración de GEMs de organismos pertenecientes a una comu-

nidad asociada a un huésped es la selección de consorcios, que consiste en identificar especies de interés entre toda la comunidad microbiana para cumplir criterios que representen un beneficio al huésped, lo que permite diseñar una comunidad con un comportamiento deseado en torno a un objetivo metabólico, como la producción de metabolitos de interés, por ejemplo, producción de biomasa de alguna especie del sistema [38, 42, 43]. Esto puede favorecer la comprensión de dependencias metabólicas entre organismos y el control de producción y/o funcionalidad metabólica del holobionte en cultivos *in vivo* [38].

Existen algoritmos para optimizar las comunidades microbianas a partir de sus redes metabólicas bajo criterios como minimizar el tamaño de la comunidad que cumple un objetivo específico [42] o minimizar los intercambios metabólicos entre organismos [43]. La herramienta MiSCoTo combina ambos criterios de optimización y añade la posibilidad de conocer todas las comunidades viables equivalentes desde el punto de vista metabólico, lo que proporciona información sobre la redundancia en la comunidad con respecto a una función objetivo [38]. Esta herramienta se puede utilizar para facilitar la selección de varias comunidades posibles que optimizan una función deseada *in silico* en términos de su producibilidad metabólica considerando el uso de los sustratos disponibles en el medio [38].

El presente trabajo se enmarca en el proyecto *Núcleo Milenio Marine Agronomy of Seaweed Holobionts* (MASH) [24], un proyecto de investigación dedicado a la generación de conocimiento para futuras innovaciones en la producción de macroalgas a través de un cultivo sustentable, integrando el concepto de holobionte. Uno de los tópicos de investigación corresponde al estudio del fenotipo del holobionte algal de *Macrocystis pyrifera*, en donde se busca estudiar la composición genética de sus microorganismos asociados e investigar los efectos de comunidades microbianas sobre rasgos de interés para la acuicultura de macroalgas. Para ello, se plantea utilizar datos metagenómicos obtenidos de comunidades microbianas asociadas al alga para construir modelos metabólicos a escala genómica y, con ello, explorar vías específicas para la expresión de rasgos de interés.

En particular, en este trabajo se busca investigar el comportamiento del holobionte de *M. pyrifera* con el fin de obtener información relevante acerca del efecto de la complementariedad metabólica en su desarrollo y crecimiento que impulsen la búsqueda de prácticas de cultivo en efectivas y sostenibles en Chile. Para llevar a cabo esto, se dispone de un borrador del modelo metabólico a escala genómica (GEM) de *M. pyrifera* y de genomas de las bacterias asociadas a esta alga, reconstruidos a partir de datos del metagenoma (MAGs). Estos genomas son anotados estructural y funcionalmente con Prokka [44], para luego construir los GEMs bacterianos con Pathway Tools [45]. Los GEMs del alga y de la comunidad bacteriana son integrados con MiSCoTo [38] para calcular la capacidad metabólica del holobionte, estudiar las interacciones entre los organismos que favorecen la producción de compuestos de interés y obtener una selección de consorcios compuesta por la mínima cantidad de especies que complementen el metabolismo del alga con respecto a la producción de metabolitos para la síntesis de biomasa y del metaboloma de algas pardas.

Los resultados muestran que *M. pyrifera* en presencia de esta comunidad bacteriana aumenta su capacidad de producir metabolitos, entre los que se encuentran compuestos necesarios para la síntesis de biomasa y que forman parte del metaboloma de algas pardas. Sin embargo, existen compuestos fundamentales en algas pardas que están ausentes en las

redes metabólicas, como alginato y tocoferoles, evidenciando que el modelo metabólico del holobionte no es funcional y hay redes que podrían estar incompletas. Por otro lado, se logra seleccionar consorcios bacterianos mínimos para alcanzar el máximo potencial metabólico con respecto a las funciones objetivo, donde se muestran redundancias entre bacterias del holobionte. Este resultado corresponde a un primer acercamiento de las especies que podrían ser fundamentales para generar propuestas de cultivo y que promuevan el crecimiento de *M. pyrifera* en un cultivo *in vivo* considerando la presencia de bacterias.

## 1.1. Objetivos

El objetivo general de este Trabajo de Título es estudiar la complementariedad metabólica entre el alga parda *Macrocystis pyrifera* y las bacterias que conforman el holobionte. Para ello, se establece el cumplimiento de los siguientes objetivos específicos:

- Representar las capacidades metabólicas de las bacterias asociadas a *Macrocystis pyrifera* por medio de modelos basados en su información genómica.
- Estudiar las interacciones metabólicas entre los organismos que conforman el holobionte mediante la integración de modelos.
- Seleccionar consorcios bacterianos del holobionte mínimos para permitir el crecimiento de *Macrocystis pyrifera* desde el punto de vista metabólico.

# Capítulo 2

## Marco teórico y estado del arte

### 2.1. Marco teórico

Los metabolitos son los sustratos y productos del metabolismo que impulsan funciones celulares esenciales, como la producción y almacenamiento de energía, la transducción de señales y la apoptosis [46]. Además de ser producidos directamente por el organismo huésped, los metabolitos pueden derivar de microorganismos, así como de fuentes dietéticas y otras fuentes exógenas [46]. El metabolismo celular es la interconversión integrada de miles de metabolitos a través de reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas, contruyendo una red compleja de interacciones moleculares [47, 48]. La naturaleza secuencial de las reacciones en las vías metabólicas significa que pueden modelarse en forma de red de enzimas y transformaciones químicas, y la teoría de grafos puede usarse para representar y comprender el metabolismo, tal como se representa en la Figura 2.1. A través de estas redes es posible comprender los procesos que generan masa, energía, transferencia de información y especificación del destino celular dentro de un microorganismo a través de los componentes y reacciones celulares que componen la componen [49].

En general, las redes metabólicas pueden proporcionar información importante no sólo sobre la capacidad metabólica de las especies, sino también sobre los entornos en los que habitan, debido a que interactúan con estos entornos absorbiendo o secretando diversos compuestos orgánicos e inorgánicos [50]. Estudios previos también han abordado el efecto que estas interacciones ambientales tienen en procesos metabólicos, como en la distribución de los flujos metabólicos dentro de la red [48] o la tasa de crecimiento del organismo [51]. El conjunto de compuestos que no pueden sintetizarse internamente pero que deben adquirirse exógenamente para activar el funcionamiento de las redes metabólicas se denomina medio de cultivo o conjunto semilla, los que se representan en la Figura 2.1 (C) como círculos rojos. Los metabolitos semillas forman la interfaz entre el medio ambiente y el sistema metabólico y vinculan los hábitats metabólicos de un organismo con sus procesos metabólicos centrales, aproximando el entorno bioquímico efectivo de cada especie [47, 50]. La composición de los conjuntos de semillas se correlaciona significativamente con varias propiedades básicas que caracterizan los entornos de las especies y concuerda con observaciones biológicas relativas a adaptaciones importantes [50].

Dentro de una célula puede ocurrir una gran cantidad de reacciones químicas y muchas vías pueden vincular una molécula inicial a un producto determinado. Sin embargo, los

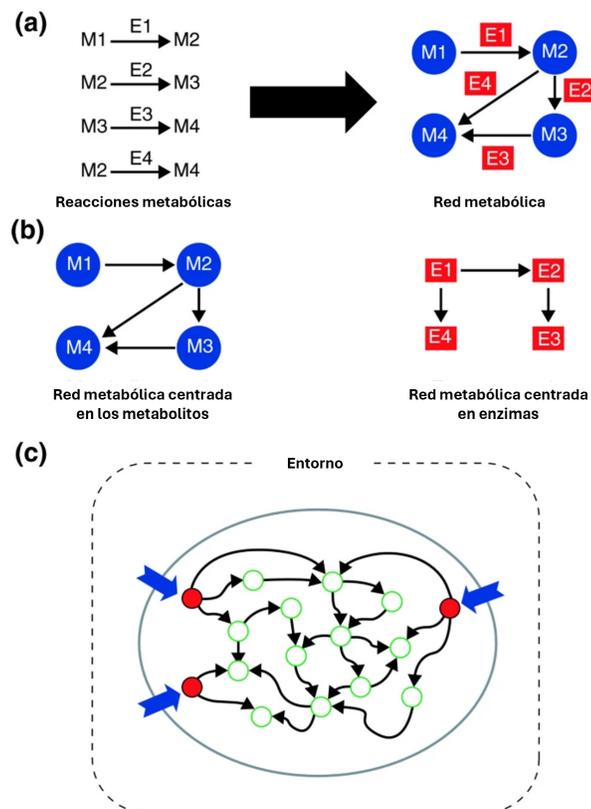


Figura 2.1: Redes metabólicas. (a) Conjunto de reacciones metabólicas en base a metabolitos (M) y enzimas que las catalizan (E). (b) Formas de representar los nodos de una red metabólica, que puede ser en base a sus metabolitos o a sus enzimas. (c) Representación del enlace de redes metabólicas, considerando que posee un límite metabólico (óvalo gris) y compuestos del medio de cultivo que provienen del ambiente (rojo) [47].

mecanismos reguladores han evolucionado para seleccionar cuándo y dónde se utilizarán las vías en un organismo bajo un conjunto determinado de condiciones [52]. Por lo tanto, si se comprenden o se pueden inferir los objetivos celulares que impulsan la evolución, se pueden predecir los estados de flujo metabólicos óptimos de las redes de reacciones bioquímicas [52]. Muchos objetivos celulares se pueden definir en el contexto del metabolismo, como la función de biomasa, que describe el crecimiento celular, y las demandas metabólicas para sintetizar los componentes celulares asociados al crecimiento (por ejemplo, aminoácidos para proteínas y ácidos nucleicos específicos) [52, 53], lo que se ve representado en la Figura 2.2.

Por su parte, los metabolitos pueden tener una amplia gama de funciones en la célula y el organismo, como regulando las modificaciones postraduccionales que afectan la actividad de las proteínas, facilitando las respuestas celulares por señalización o respuesta a cambios en el entorno, por lo que existe una motivación cada vez mayor para determinar mejor sus funciones específicas, así como para comprender sus funciones fisiológicas [54]. La metabolómica es la elaboración de perfiles de metabolitos en biofluidos, células y tejidos, y es un campo que captura la información biológica generada por la actividad genómica y transcriptómica [55]. Se pueden implementar varios enfoques metabolómicos para identificar metabolitos y vías metabólicas asociadas con fenotipos particulares y luego integrar este conocimiento con estudios biológicos funcionales [54].

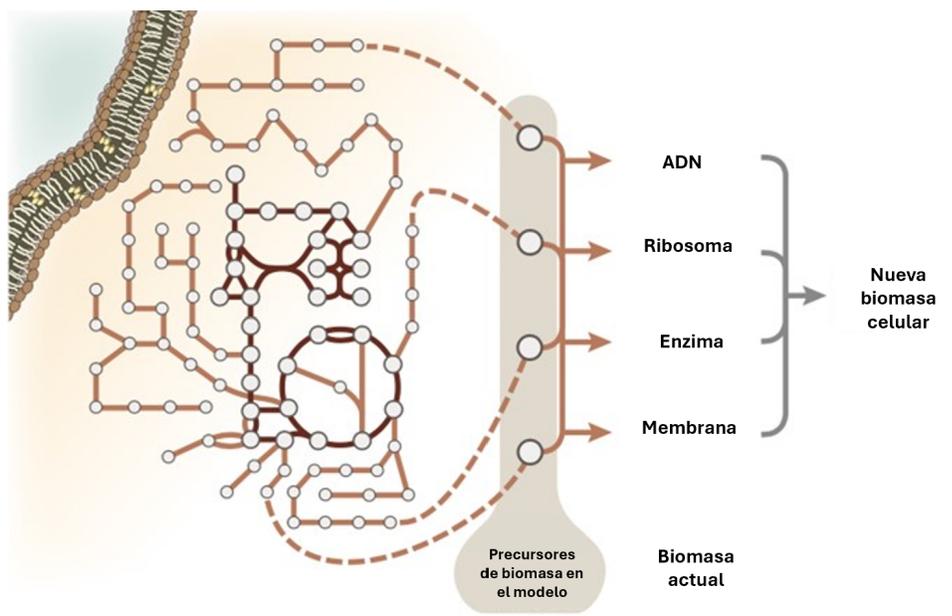


Figura 2.2: Representación de la función de biomasa, que describe el crecimiento celular mediante la producción de metabolitos. (Modificado de [52]).

El análisis de sistemas metabólicos es posible mediante la reconstrucción de las redes de reacciones bioquímicas en base a una secuencia genómica, siendo un proceso específico del organismo [56]. La secuenciación y anotación del genoma han permitido generar reconstrucciones de redes metabólicas a escala genómica (GEMs), incluso para organismos para los cuales hay poca información bioquímica directa disponible en la literatura publicada, y han demostrado ser valiosos para predecir fenotipos de organismos a partir de genotipos utilizando una variedad de métodos computacionales [52, 56, 57]. Las redes metabólicas reconstruidas suelen ser incompletas, sin embargo, la integración de análisis a nivel fenotípicos con simulaciones de modelos puede proporcionar un enfoque sistemático para refinar los modelos y descubrir nuevas funciones metabólicas en un organismo [52].

La reconstrucción de un modelo metabólico a escala genómica implica la recopilación y el análisis de información genómica y bioquímica para identificar y caracterizar las reacciones metabólicas presentes en un organismo. Para ello, se debe secuenciar el genoma, que consiste en la obtención de la secuencia completa del ADN del organismo de interés [41]. Esta secuencia es anotada para identificar y asignar funciones a los genes presentes en el genoma. Esta etapa implica predecir la función de cada gen, identificar posibles productos génicos y mapear estas funciones a bases de datos de anotación. Finalmente, se construye un modelo preliminar, que integra la información genómica y bioquímica para construir un modelo metabólico [41]. Para mejorar la calidad de este modelo preliminar, o borrador, se puede realizar una etapa de curación manual, en la que se incorporan al modelo las reacciones metabólicas conocidas faltantes.

En el contexto de las interacciones microbianas, las redes metabólicas pueden revelar cómo los metabolitos producidos por un microorganismo pueden ser utilizados por otro, estableciendo relaciones de simbiosis o competencia. Además, estas redes también permiten identificar

posibles sinergias o antagonismos metabólicos entre diferentes especies microbianas [39]. El análisis de las redes metabólicas puede proporcionar información valiosa sobre la dinámica de las comunidades microbianas, su adaptación a diferentes condiciones ambientales y su papel en procesos biogeoquímicos [38, 39]. Esto contribuye a una comprensión más completa de la ecología microbiana y puede tener aplicaciones en la ingeniería de comunidades microbianas para mejorar la eficiencia de procesos biotecnológicos o la restauración de ecosistemas [38]. Los avances recientes en la tecnología de secuenciación han generado nuevas oportunidades para la obtención del genoma y los análisis genómicos de poblaciones microbianas [58]. Los genomas ensamblados a partir de metagenoma (MAG) ayudan a comprender mejor las poblaciones microbianas y sus interacciones con el entorno donde viven [59].

### 2.1.1. Metagenómica

La metagenómica es una disciplina que se centra en el estudio de material genético colectado directamente de muestras ambientales, como suelos, agua, aire o comunidades microbianas en el cuerpo humano [59]. A diferencia de la genómica convencional, que analiza el material genético de organismos individuales o cultivos puros, la metagenómica permite la investigación de comunidades microbianas en su conjunto, sin necesidad de aislar y cultivar cada organismo por separado [59, 60]. La metagenómica tiene aplicaciones en diversas áreas, como la ecología microbiana, la biotecnología, la medicina y la investigación ambiental. Permite explorar la diversidad microbiana en entornos naturales y artificiales, así como descubrir nuevas funciones y adaptaciones genéticas [59].

Los microorganismos son esenciales para el ciclo de nutrientes y los procesos metabólicos en los seres vivos y el medio ambiente y se pueden caracterizar utilizando enfoques tradicionales dependientes o independientes del cultivo, como se muestra en la Figura 2.3. El método dependiente de cultivo que implica el aislamiento y secuenciación de microbios individuales a partir de cultivos de laboratorio [60]. Sin embargo, algunos microbioorganismos no pueden aislarse y cultivarse fácilmente *in vitro* debido a sus complejos hábitats naturales, complejidades ambientales, temporales, físicas, bioquímicas y genéticas no reproducibles [61, 62]. Estos microbios pueden identificarse mediante el procesamiento de datos metagenómicos, que permite la recuperación de secuencias genómicas de una mezcla de ADN microbiano de una muestra ambiental (o asociada al huésped) mediante secuenciación, obteniendo fragmentos de secuencias genómicas, llamados *reads*, pertenecientes a los distintos organismos que conforman la comunidad microbiana obtenida en la muestra [63].

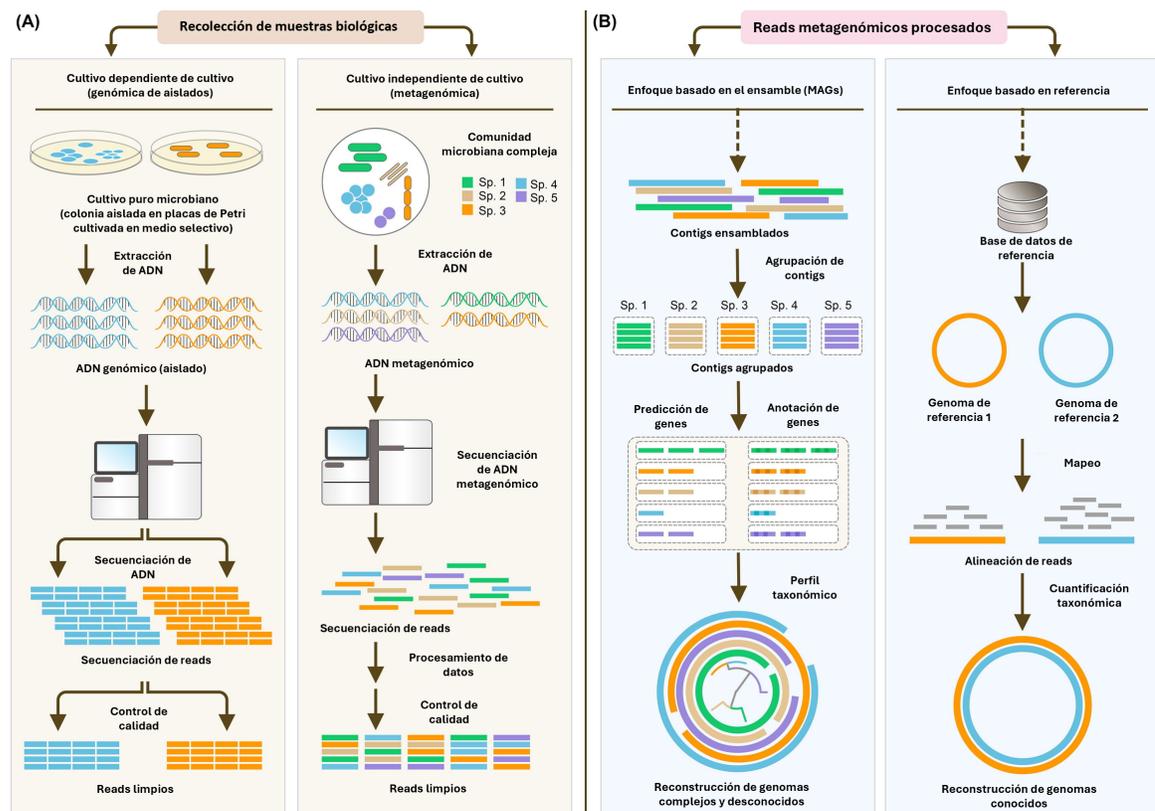


Figura 2.3: Representación esquemática de los diferentes enfoques utilizados en el campo de la investigación metagenómica. (A) Un contraste esquemático entre los métodos independientes del cultivo (metagenómica) y los métodos dependientes del cultivo (aislación genómica). (B) Un contraste esquemático entre los enfoques basados en ensamblaje y basados en referencia en datos de secuenciación metagenómica. [60]

Luego, estos *reads* deben ser agrupados para obtener finalmente una secuencia que represente el genoma de un organismo individual de la comunidad. La mayoría de los estudios sobre el microbioma se han basado en gran medida en la disponibilidad de genomas de referencia para las asignaciones taxonómicas mediante la alineación de secuencias [60]. Sin embargo, como los genomas de referencia están generalmente incompletos, actualmente sólo es posible explorar asociaciones de microbios con genomas de referencia de alta calidad. Con los avances recientes en las tecnologías de secuenciación y las herramientas computacionales, se ha intentado abordar este desafío mediante la construcción de genomas ensamblados en metagenomas (MAG). Un MAG representa un genoma microbiano mediante un grupo de secuencias procedentes del ensamblaje que son agrupados según características similares, los que forman una aproximación de un genoma [60].

Brevemente, los MAGs son obtenidos a partir del ensamblado de *reads*, que son agrupados para generar *contigs*, que son fragmentos genómicos contiguos de mayor longitud. Se determinan patrones que puedan indicar si dos *contigs* pertenecen al mismo genoma o no. Luego se usan estos patrones para agrupar los *contigs*, formando conjuntos mayores que corresponden a la secuencia de un MAG [59]. Los análisis posteriores están diseñados para anotar MAG e incluyen predicción de genes, anotación funcional de genes, clasificación taxonómica y elaboración de perfiles [60].

Esta avalancha de MAGs ha creado la necesidad de establecer algunos estándares de calidad. Los borradores de MAG de alta calidad, por ejemplo, deben ser aquellos que estén completos en más del 90 %, es decir, que contengan una gran cantidad de *reads* pertenecientes al organismo de interés o similares, y tengan menos del 5 % de contaminación, que corresponde a *reads* de genomas procedentes de organismos no relacionados con el esperado [59]. Sin embargo, una secuencia MAG es poco probable que esté libre de contaminación, como una secuencia genómica de un aislado, pero por otro lado, dependiendo de su calidad, aún puede ser una aproximación válida de los genomas de los microorganismos de la muestra [59]. Por lo tanto, un MAG presenta un ADN heterogéneo derivado de genomas de diferentes cepas de la misma especie, cuando dichas cepas están presentes en la muestra a partir de la cual se reconstruyó el MAG. En los últimos años, se han informado en la literatura miles de MAGs para una variedad de entornos y microbiotas asociadas al huésped, incluidos los humanos. Los MAGs han ayudado a comprender mejor las poblaciones microbianas y sus interacciones con el entorno donde viven [59].

### 2.1.2. Anotación de genomas

La anotación de genomas es un proceso que implica la identificación y caracterización de elementos genéticos en una secuencia de ADN. Este proceso se divide en dos aspectos clave: la anotación estructural, que se centra en la identificación de genes y elementos genéticos, tales como ARNts o ARNrs, y la anotación funcional, que busca asignar funciones específicas a estos genes y elementos. En el contexto de comunidades microbianas, la anotación genómica es fundamental para comprender, la función de los microorganismos presentes en un ecosistema [64, 65]. Como mínimo, esto debería incluir las coordenadas de las regiones codificantes previstas y sus supuestos productos, pero es deseable ir más allá y incluir ARN no codificantes, péptidos señal, etc [44]

La anotación estructural se enfoca en la identificación y caracterización de elementos genéticos, como genes y regiones regulatorias, dentro de un genoma. Para la identificación de genes se utilizan algoritmos de predicción de genes que buscan secuencias de codificación que puedan traducirse en proteínas. Además de los genes, se buscan regiones no codificantes, como promotores, terminadores y elementos reguladores. Esto proporciona una visión completa de la arquitectura genómica. Finalmente, se utilizan bases de datos de dominios proteicos y homologías para predecir funciones de las proteínas codificadas por los genes identificados [65]. La anotación funcional asigna funciones específicas a los elementos genéticos identificados en la anotación estructural, para lo que se utilizan bases de datos como UniProt [66] y Pfam [67], para asignar funciones a proteínas mediante comparaciones de secuencias, dominios y vías metabólicas conocidas.

### 2.1.3. Modelos metabólicos a escala genómica (GEMs)

La reconstrucción de modelos metabólicos a escala genómica es una herramienta que permite entender y prever el funcionamiento de sistemas biológicos. Estos modelos son particularmente valiosos cuando se aplican a comunidades microbianas, ya que proporcionan una visión integrada de las interacciones metabólicas entre diferentes microorganismos en un

ecosistema [68]. Las redes a escala genómica se construyen a partir de conocimiento curado y sistematizado que les permite describir las relaciones genotipo-fenotipo [41] mediante de las relaciones entre genes, enzimas y las reacciones presentes en un genoma anotado. Los modelos a escala genómica (GEM) son representaciones matemáticas de redes reconstruidas que facilitan el cálculo, proporcionan restricciones y permiten estudiar funciones objetivo de interés para representar las funciones biológicas óptimas que el organismo podría alcanzar [52, 68].

El primer paso hacia una reconstrucción de un modelo metabólico a escala genómica es la identificación y anotación funcional de los genes que codifican las enzimas metabólicas presentes en el genoma. Estas anotaciones provienen de bases de datos que emplean métodos basados en homología para mapear secuencias del genoma en reacciones metabólicas. El uso de estas bases de datos de anotaciones en general se trata en varias revisiones [56]. Se ha observado que la elección de una base de datos particular afecta significativamente la estructura de la red reconstruida [69]. Esta variabilidad puede atribuirse a la precisión limitada de los métodos basados en homología, anotaciones erróneas presentes en grandes bases de datos [65], el hecho de que muchos genes sólo pueden anotarse como secuencias hipotéticas de función desconocida [64] y la alta fracción de funciones enzimáticas “huérfanas” que no pueden asignarse a una secuencia genómica particular [70].

El desarrollo de un GEM requiere bases de conocimiento metabólico seleccionadas, como la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) [71], y una secuencia genómica anotada del organismo de interés. Al mapear la secuencia del genoma anotada en la base de datos (Figura 2.4 a), se puede reconstruir una red metabólica compuesta por todas las reacciones metabólicas conocidas (Figura 2.4 b). Esta red metabólica se puede convertir a un formato matemático, una matriz estequiométrica (matriz S), donde las columnas representan reacciones, las filas representan metabolitos y cada posición es el coeficiente estequiométrico correspondiente de un metabolito particular en una reacción (Figura 2.4 c). Se necesita un objetivo celular para permitir el cálculo de un flujo metabólico factible que optimice el objetivo del modelo. Una función objetivo ampliamente utilizada es optimizar la tasa de crecimiento, representada por una función de biomasa, que es una reacción del modelo [53], compuesta por metabolitos esenciales necesarios para el crecimiento.

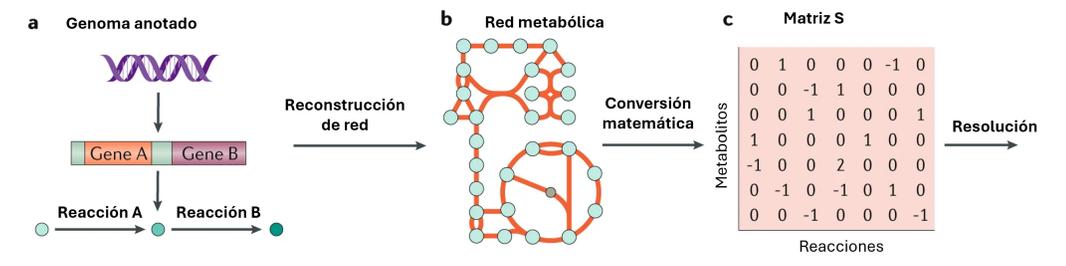


Figura 2.4: Principios básicos para la reconstrucción de un modelo metabólico a escala genómica. (a) Los genes metabólicos de genomas anotados de interés conducen a reacciones metabólicas. (b) La integración de todas las reacciones metabólicas a través de metabolitos compartidos da como resultado la construcción de una red metabólica para el organismo de interés. (c) La red metabólica se puede convertir en una matriz estequiométrica (matriz S). (Modificada [68])

La complementariedad metabólica entre distintos organismos se puede estudiar integrando sus GEMs, en donde se enlazan las redes metabólicas para permitir la activación de más reacciones, a través de la adición de reacciones faltantes o de metabolitos intermedios [39]. El beneficio de esta interacción metabólica se ve reflejado en el alcance metabólico de las redes, aumentando la cantidad de metabolitos producibles bajo determinadas condiciones nutricionales [72]. La herramienta MiSCoTo [38] permite realizar este análisis a partir de los GEMs de los organismos y un conjunto de nutrientes, estudiando el alcance metabólico de un huésped al interactuar con simbiontes [38]. Define que un compuesto es producible por el sistema formado por el huésped y simbiontes si existe una cadena de reacciones metabólicas que transforma el medio de cultivo en el compuesto esperado, sin tener en cuenta las acumulaciones de flujo o la competencia por los recursos [38].

Además, considera dos escenarios para realizar la predicción de la complementariedad metabólica en un sistema, uno de ellos es el modelado mixto (Figura 2.5 (b)), que considera que las redes del holobionte se combinan formando un metaorganismo, ignorando las reacciones de transporte y los intercambios entre compartimentos, mientras que otro es el modelado compartimentado (Figura 2.5 (a)), que considera que los organismos poseen un límite metabólico y para atravesarlo se requieren reacciones de transporte e intercambios entre los organismos [38]. Esto se muestra en la Figura 2.5.

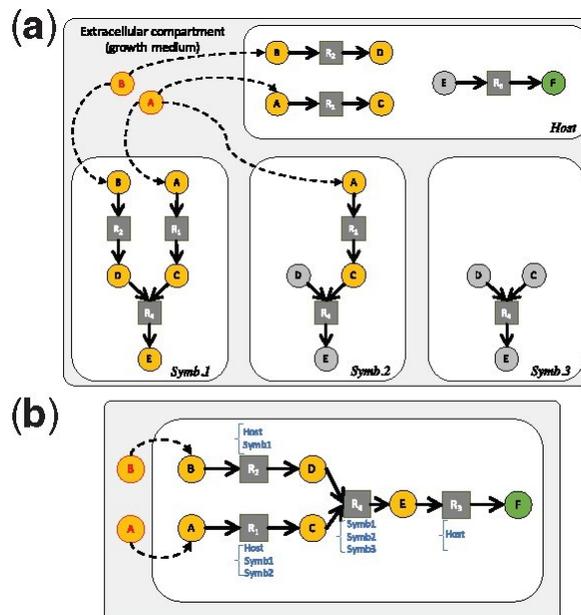


Figura 2.5: Predicción de interacciones metabólicas entre GEMs. (a) El sistema consta de un organismo huésped y tres simbiontes. A partir de los metabolitos A y B como semillas (medio de cultivo), el objetivo de la comunidad seleccionada es producir la diana F, para la cual sólo el huésped tiene capacidad enzimática. (b) Modelado mixto. La unión de las redes metabólicas permiten al huésped alcanzar la producción de F. Modificado [38])

## 2.2. Estado del arte

El interés del microbioma asociado a las algas y su influencia en el metabolismo ha sido reportado hace varios años. En 1973, Pedersen *et al.*, reportaron efectos beneficiosos de las bacterias sobre las algas, principalmente a través de la producción de hormonas de crecimiento, donde se mostró que las algas no desarrollan su morfología adecuadamente en condiciones axénicas, aunque el crecimiento de algas puede restaurarse mediante la adición de la citoquinina al medio de cultivo [25]. Lo mismo ocurre con el aporte de vitaminas [25–27], asimilación del nitrógeno [27–29] y degradación de polisacáridos [27], evidenciando una dependencia metabólica de algas hacia su microbioma.

El alga *Ectocarpus spp.* es una especie modelo para el estudio de la fisiología de macroalgas pardas debido a que tiene un genoma pequeño, es fácil de cultivar en el laboratorio. y posee un ciclo de vida corto que lo hace adecuado para estudios genéticos [73]. El cultivo de bacterias asociadas a *Ectocarpus* es el primer paso hacia el desarrollo de un sistema modelo para estudios funcionales *in vitro* de las interacciones entre macroalgas pardas y bacterias. Tapia *et al.*, 2016 [34] aisló experimentalmente 9 cepas bacterianas asociadas a *E. siliculosus*, las que al ser cultivadas en condiciones axénicas, el alga parda filamentosa *Ectocarpus sp.* pierde su morfología ramificada y crece con una apariencia de pequeña bola, evidenciando que depende en gran medida de la presencia de bacterias, mientras que el efecto bacteriano en el perfil del exometaboloma de las algas refleja el impacto de las bacterias en toda la fisiología de esta alga. KleinJan *et al.*, 2017 [33] aisló cepas asociadas a *E. subulatus* tratados con distintas técnicas de aislamiento, cultivando un total de 46 cepas, que presentaron una cultivabilidad cercana al 50 %. También Dittami *et al.*, 2020 aisló otras 95 cepas correspondientes a 27 géneros diferentes asociadas a *E. subulatus* [31]; Karimi *et al.*, (2020) [32] reporta los genomas de 72 cepas bacterianas asociadas a *E. subulatus*, donde se han observado vías de desintoxicación y suministro de vitamina B en la mayoría de los genomas secuenciados, lo que destaca las posibles contribuciones del metabolismo bacteriano a la aptitud y supervivencia del huésped.

En cuanto a comunidades microbianas, fueron reconstruidos 79 genomas ensamblados del metagenoma (MAGs) bacterianos a partir de láminas del alga parda *Nereocystis luetkeana*, permitiéndolo determinar su potencial metabólico y sus roles funcionales. Los genomas bacterianos contenían genes asociados a la biosíntesis de alginato liasa, implicados en la degradación de polisacáridos y la formación de biopelículas. En particular, *Granulosicoccus* contenía un conjunto completo de genes para sintetizar cobalamina (vitamina B12), lo que sugiere que las bacterias asociadas a las algas marinas tienen el potencial de proporcionar vitaminas a sus algas huéspedes [27].

Con respecto a comunidades asociadas a *Macrocystis pyrifera*, Florez *et al.*, 2019 [74] analizó la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a esta alga de dos poblaciones genéticas diferentes en localidades con factores ambientales contrastantes. Una población del norte sometida a cambios contrastantes de nutrientes y temperatura; y una población del sur que se encuentra cerca de granjas salmoneras. Se encontraron diferencias entre las comunidades bacterianas epífitas de macroalgas y el agua de mar en términos de diversidad.

Los estudios *in vitro* de las macroalgas pardas comercialmente valiosas y ambientalmen-

te más relevantes (orden Laminariales) son un desafío debido a su tamaño y ciclos de vida complejos. Actualmente no hay evidencia de la publicación de un modelo metabólico a escala genómica para el alga *Macrocystis pyrifera*. El alga *Ectocarpus spp.* es una especie modelo para el estudio de la fisiología de macroalgas pardas debido a que tiene un genoma pequeño, es fácil de cultivar en el laboratorio, y posee un ciclo de vida corto que lo hace adecuado para estudios genéticos [73]. En 2014 se secuenció su genoma y se hizo una reconstrucción metabólica a escala genómica, que consta de 1866 reacciones y 2020 metabolitos y se considera funcional debido a que se valida su producción de biomasa [37]. Años más tarde se realizó la secuenciación de los genomas de *Saccharina japonica*, un alga parda del orden *Laminariales* y *Cladosiphon okamuranus* del orden *Ectocarpales* [75]. Se construyeron sus redes metabólicas a escala genómica, que tienen un promedio de 2230 metabolitos y 3370 reacciones. También se reconstruyó el GEM borrador para la especie *Ectocarpus subulatus* [31], que posee 2074 reacciones y 2173 metabolitos, estableciendo la base genómica para su uso como modelo comparativo para estudiar los mecanismos de tolerancia al estrés, y en particular la tolerancia a la baja salinidad.

Con información disponible sobre el GEM de *E. siliculosus* [76] y la comunidad bacteriana reportada por KleinJan *et al.*, 2017 [33], se estudia la complementariedad metabólica entre alga y una selección de 10 genomas bacterianos asociados a esta alga [37]. Acá que realiza la reconstrucción de los modelos metabólicos a escala genómica (GEMs) y luego se utiliza la herramienta MiSCoTo para estudiar las capacidades metabólicas entre el alga huésped y la bacteria, destacando una variedad de intercambios de metabolitos potencialmente beneficiosos entre ellos, que permitieron predecir consorcios formados por un subconjunto bacterias que complementarían mejor el metabolismo de las algas. Luego, se realizan experimentos de cocultivo con estos consorcios para monitorear el crecimiento de las algas, así como la presencia de metabolitos clave de las algas. Los cultivos demostraron un aumento significativo en el crecimiento de algas en cultivos inoculados con los consorcios, lo que sugiere que la complementariedad metabólica es un buen indicador de los intercambios de metabolitos beneficiosos en el holobionte.

Algo similar realiza Karimi *et al.*, 2021 [58], que utilizan los genomas de una comunidad de 81 especies bacterianas asociadas al alga *E. subulatus*, lo que fueron anotados funcional y estructuralmente para construir sus respectivos GEMs, además, disponen del GEM borrador de *E. subulatus* [31]. Luego utilizan la herramienta MiSCoTo para estudiar la complementariedad metabólica entre esta comunidad y su alga asociada, resultando en que se añaden 590 metabolitos a la capacidad metabólica del alga, evidenciando el beneficio metabólico, esperando a futuro realizar la validación experimental de las predicciones bioinformáticas probablemente será crucial para evaluar y perfeccionar los procesos.

También fue estudiado el microbioma de raíces de plantas, utilizando se modelos metabólicos a escala genómica de 193 bacterias aisladas de raíces de *Arabidopsis thaliana*. Se analizan sus metabolitos producibles bajo restricciones nutricionales simuladas utilizando MiSCoTo [77]. Además, se seleccionan consorcios relativamente pequeños podrían reflejar la capacidad de toda la comunidad debido a la redundancia metabólica y la inspección de 30 metabolitos específicos indicó que la mayoría de las cepas tenían el potencial genético para producir casi todos los compuestos objetivo.

Por otro lado, Dittami *et al.*, 2014 [17] realizó un estudio sobre la complementariedad metabólica entre el alga *E. siliculosus* y la bacteria *Ca. P. ectocarpus*, pero combinando los GEMs con la idea de rellenar la red del alga para generar uno solo que represente el holobionte. Se estudió el alcance metabólico del alga sin las redes de la bacteria y con las redes, resultando en que se producen 8 nuevos metabolitos de crecimiento de biomasa.

Con la información adquirida a partir de estas investigaciones que se centran en el estudio de las capacidades metabólicas de modelos a escala genómica, tanto de macroalgas como de comunidades con comportamientos simbióticos, es posible esperar que la integración de GEMs del alga *Macrocytis pyrifera* y su comunidad bacteriana revele un aumento en el potencial metabólico del holobionte que demuestre que estos organismos se ven favorecidos al convivir en simbiosis.

# Capítulo 3

## Metodología

El estudio de la complementariedad metabólica entre el alga parda *Macrocystis pyrifera* y su comunidad bacteriana asociada se realiza integrando sus modelos metabólicos a escala genómica, con el fin de identificar los beneficios que genera la presencia de bacterias en la capacidad metabólica del alga. Para lograr esto, se utiliza la metodología descrita en este capítulo, que consiste en la anotación de los MAGs de las bacterias pertenecientes a la comunidad de estudio y la generación de sus respectivos modelos metabólicos. Luego se calcula la capacidad metabólica del holobionte en base a distintos objetivos metabólicos al incorporar el GEM de *M. pyrifera* y de su comunidad asociada en un medio de cultivo definido. Finalmente se realiza una selección de los consorcios mínimos que permitan alcanzar los objetivos previamente definidos.

El material necesario para el desarrollo de este trabajo fue entregado por colaboradores y corresponde al GEM de *M. pyrifera*, los MAGs de las bacterias asociadas a esta alga y dos conjuntos de metabolitos deseados, que son los componentes de biomasa del alga *M. pyrifera* y el metaboloma de algas pardas [78].

Las bacterias que forman parte del holobionte fueron identificadas y secuenciadas posterior al ensamble de genomas de *M. pyrifera* hembra y macho, realizado por el proyecto Phaeoexplorer<sup>1</sup> a partir de muestras extraídas de la costa chilena. Los MAGs bacterianos fueron reconstruidos a partir del reensamble y *binning* de fragmentos catalogados como contaminantes de los ensambles de *M. pyrifera*. Se obtuvieron 20 MAGs bacterianos, 14 de ellos son de bacterias asociadas al alga hembra y 6 a macho. En la Tabla A.1 se muestran las especies bacterianas identificadas, junto con su clasificación taxonómica. Los MAGs fueron entregados en formato FASTA en dos extensiones, *.fna*, que representa la secuencia de nucleótidos del genoma, y *.faa*, la secuencia de aminoácidos.

Del genoma del alga *M. pyrifera* secuenciado<sup>1</sup>, se construyó un GEM borrador generado con Pathway Tools<sup>2</sup>, proporcionado en formato SBML con el nombre de “*Macrocystis\_pyrifera*” que se encuentra en material suplementario. Este modelo es de un alga macho y no ha sido intervenido con *gap-filling*, con el fin de evitar añadir reacciones que podrían ser resultado de interacciones entre el alga y las bacterias.

---

<sup>1</sup> Dittami S. y Markov G., Comunicación personal, 2023

<sup>2</sup> Espinoza M., Comunicación personal, 2023

Por otro lado, para analizar el alcance de las capacidades metabólicas del holobionte obtenidas en el desarrollo del trabajo se definen objetivos metabólicos, que corresponden a conjuntos de metabolitos que se espera sean producidos por los organismos del holobionte. Uno de estos conjuntos se compone de 50 metabolitos que componen la biomasa de *M. pyrifera* y se muestran en la Tabla B.1. Otro de estos conjuntos corresponde a los metabolitos que forman parte del metaboloma de algas pardas, reportados por Belghit *et al.* (2017) [78] a partir del estudio de 11 algas pardas. Este conjunto consta de 247 metabolitos, que se encuentran en la Tabla B.2. Ambos conjuntos son utilizados como archivos en formato SBML, llamados “Target\_biomasa” y “Target\_metaboloma”, que fueron generados con el Código C.1 y se encuentran en material suplementario.

Las herramientas utilizadas para desarrollar este trabajo corresponden a Prokka [44], Pathway Tools [45], Memote [79] y MiSCoTo [38], que poseen requerimientos computacionales bajos, siendo aptas para su uso en un computador estándar. De todas maneras, algunas funciones de estas herramientas pueden tener un requerimiento mayor, dependiendo del tamaño de los archivos utilizados, por lo que puede tardar más tiempo en ejecutarse. En este trabajo se utilizó con un computador portátil con sistema operativo Windows 11, con procesador Intel Core i5 11<sup>va</sup> generación y RAM 8 GB.

En las siguientes secciones se detalla la metodología utilizada para el desarrollo de este trabajo, además, para una mejor comprensión, la Figura 3.1 muestra un diagrama general de la propuesta metodológica, destacando en cada paso los datos y la herramienta computacional utilizada para obtener los resultados.

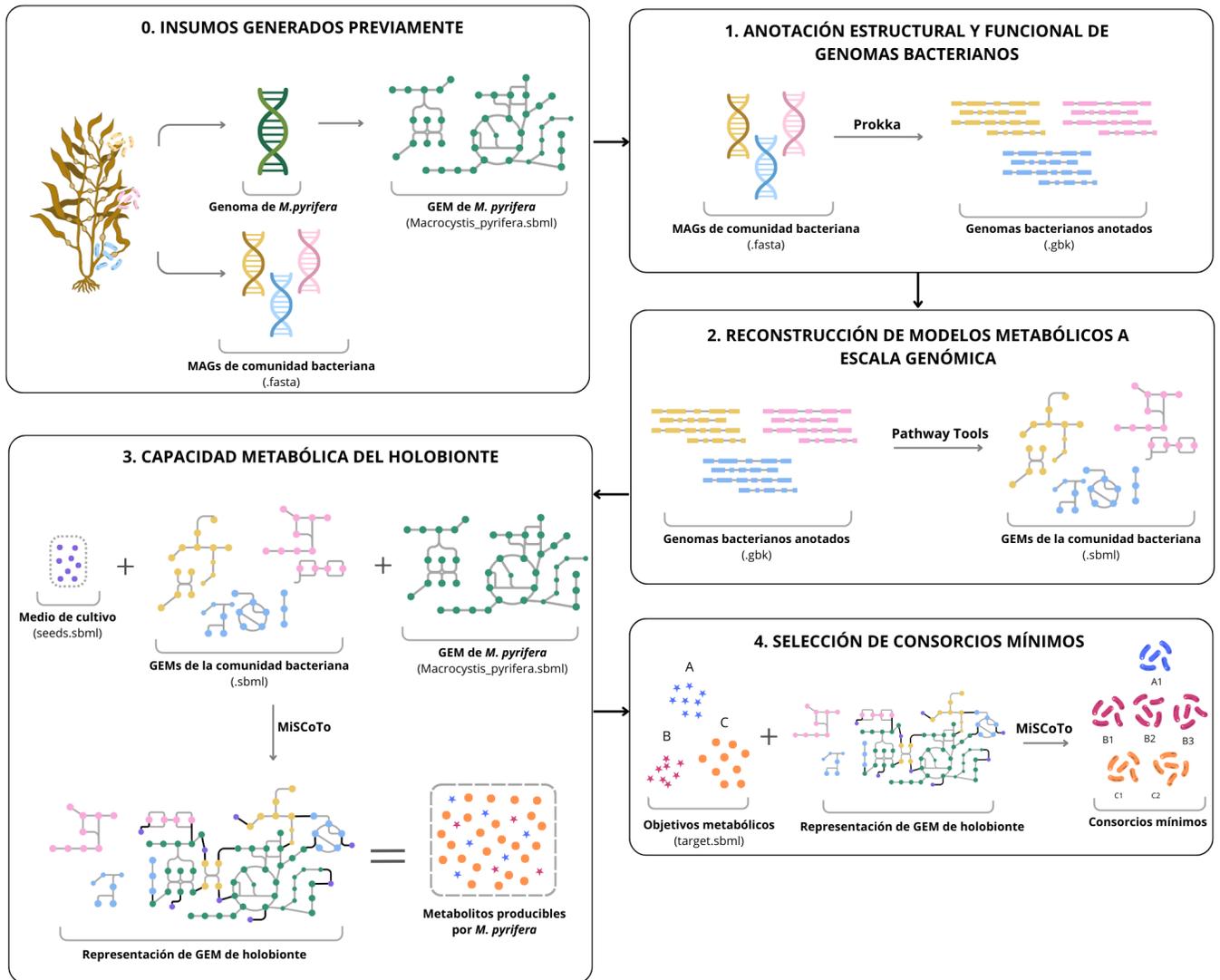


Figura 3.1: Diagrama de propuesta metodológica. (0) Material generado por colaboradores utilizados como insumo, que corresponden al GEM de *M. pyrifera* y los MAGs de las especies que componen la comunidad bacteriana. (1) Anotación estructural y funcional de los MAGs bacterianos con Prokka. (2) Reconstrucción de los GEMs bacterianos con Pathway Tools a partir de los genomas bacterianos anotados. (3) Predicción de la capacidad metabólica del holobionte con MiSCoTo, utilizando el medio de cultivo, los GEMs bacterianos y de *M. pyrifera*. Estas redes se unen formando la red metabólica del holobionte, que permite obtener un conjunto de metabolitos que son producibles por el alga. Las distintas figuras en este conjunto ilustran los metabolitos objetivo. (4) Selección de consorcios mínimos contruidos en base a objetivos metabólicos con MiSCoTo, obteniendo distintas soluciones óptimas.

## 3.1. Anotación de genomas bacterianos

Previo a la anotación de los genomas, se hizo una revisión manual del estado de los MAGs bacterianos, detectando que los asociados a las bacterias *Hyphomicrobiales bacterium (H)* y *Phycisphaera mikurensis NBRC 102666 (H)* tenían genes duplicados, que fueron eliminados manualmente.

Se realiza la anotación estructural y funcional de los 20 MAGs utilizando el software Prokka [44], que anota completamente genomas de bacterias, arqueas y virus, obteniendo varios archivos de salida, entre ellos, en formato GenBank (.gbk) y GFF (.gff). La instalación de Prokka en este sistema se encuentra en el Anexo D.1.

Para realizar la anotación con Prokka, los genomas en formato FASTA se deben encontrar en la carpeta de Ubuntu. Luego se utiliza el Código 3.1, que permite generar una carpeta con los distintos archivos de salida, incluyendo la anotación en formato GenBank y GFF.

Código 3.1: Anotación con Prokka

```
1 conda activate prokka
2 prokka --cpus 4 --prefix FILE --kingdom Bacteria --locustag NAME genome.fasta
```

Donde:

- - - **cpus** es el número de CPUs a utilizar.
- - - **prefix** es el nombre de la carpeta a generar que contendrá los archivos de salida.
- - - **kingdom** es el tipo de organismo que se va a anotar (Archaea, Bacteria, Mitochondria, Viruses).
- - - **locustag** es la etiqueta que se le otorga a los genes de la secuencia anotada.
- **genoma.fasta** es la secuencia a anotar en formato FASTA (.fasta, .fna o .faa).

Los archivos GenBank generados presentan una anomalía en los identificadores de los genes (*locus*) que fue reparado con un script de Python que se detalla en el Anexo F. De todas formas, la presencia de esta anomalía no genera inconvenientes para desarrollar el resto del trabajo. Para más información acerca del uso de Prokka se puede consultar su repositorio de GitHub<sup>3</sup>.

## 3.2. Generación de modelos metabólicos a escala genómica bacterianos

Los GEMs se construyen con la herramienta Pathway Tools [45], que predice las reacciones, vías y otras características metabólicas de un organismo a partir de su secuencia anotada, generando una base de datos, llamada PGDB (Pathway/Genome DataBase), que contiene la información funcional y genómica específica para cada organismo. El detalle de la instalación de esta herramienta se muestra en el Anexo D.2. Se utiliza el componente PathoLogic de

<sup>3</sup> GitHub Prokka <https://github.com/tseemann/prokka>

Pathway Tools, que acepta el genoma anotado en formato GenBank como entrada y su salida es un nuevo PGDB en formato SBML. Los modelos obtenidos se encuentran en la carpeta llamada “Comunidad\_bacterias” y el detalle de los pasos para generarlos se presenta en el Anexo G.

Para medir la cantidad de metabolitos, reacciones y genes totales se utiliza Memote [79], que es un paquete de Python que se puede ejecutar directamente desde la ventana de comandos de Windows utilizando el Código 3.2, que genera un reporte con la evaluación del modelo, comúnmente en formato HTML. Podría surgir un error, que se resuelve según lo indicado en el Anexo E.

Código 3.2: Evaluación de modelos con Memote

```
1 pip install memote #Instalación de Memote
2 memote report snapshot --filename "report.html" model.sbml
```

Donde:

- `report.html` es el nombre del archivo a generar.
- `model.sbml` es el GEM que se desea evaluar en formato .XML o .SBML.

Para más información acerca del uso del paquete se puede consultar su repositorio de GitHub<sup>4</sup>.

### 3.3. Predicción de capacidades metabólicas del holobionte

El estudio de las interacciones metabólicas entre los organismos que conforman el holobionte se realiza con la herramienta MiSCoTo [38], que predice las capacidades metabólicas potenciales que podrían activarse en un huésped por la contribución de microorganismos. MiSCoTo es un paquete de Python que se puede ejecutar directamente desde la ventana de comandos de Windows, cuyas entradas para hacer estas predicciones son los modelos metabólicos del huésped y sus simbioses, en este caso del alga *Macrocystis pyrifera* y la comunidad bacteriana del holobionte, y un archivo con los componentes del medio de cultivo, denominado *seed*.

Se dispone de los *seeds* conforman el medio Provasoli [37], utilizado comúnmente para cultivar el alga parda *Ectocarpus siliculosus*, y un medio estimado para cultivar *Macrocystis pyrifera* obtenido por colaboración<sup>5</sup>. Estos medios poseen 41 y 34 componentes respectivamente y comparten 27 de ellos. Para realizar el estudio metabólico del holobionte se utiliza la unión de estos medios, debido a que todos los componentes se consideran necesarios como precursores de procesos metabólicos, obteniendo un medio de cultivo de 48 metabolitos, que se muestran en la Tabla H.1. El archivo que representa este medio se encuentra en formato SBML en Material Suplementario, llamado “Seed.sbml”

<sup>4</sup> GitHub Memote <https://github.com/opencobra/memote>

<sup>5</sup> Espinoza M., Comunicación personal, 2023

Para predecir la capacidad metabólica del alga integrada al holobionte se utiliza el comando `miscoto scopes`, que calcula la cantidad de metabolitos totales que el alga es capaz de producir de manera individual y los metabolitos que se vuelven producibles gracias a la presencia de la comunidad bacteriana, este último conjunto se denomina *scope*. Se utiliza el GEM del alga y de las 20 bacterias generados anteriormente, junto al medio de cultivo, y se ejecuta el Código 3.3. También se calcula la capacidad metabólica de la comunidad bacteriana sin estar asociada al alga, que se realiza utilizando nuevamente el Código 3.3, sin añadir el modelo del alga. Al unir este resultado con la capacidad del alga en presencia de bacterias es posible obtener la capacidad metabólica total del holobionte.

MiSCoTo también permite añadir un archivo *target*, que corresponde al objetivo metabólico, es decir, un conjunto de metabolitos que se desea estudiar su producibilidad por el huésped (alga), tanto de manera individual como en presencia de los microorganismos. Se estudia la producibilidad de 50 metabolitos que componen la biomasa de *M. pyrifera* (Tabla B.1), y de 247 compuestos que son parte del metaboloma del alga parda (Tabla B.2). Adicionalmente, se verifica que estos metabolitos objetivo no se incluyen en el medio de cultivo para evitar reportar una producción errónea. Este estudio se realiza utilizando el Código 3.3 de la misma forma mencionada anteriormente, esta vez añadiendo el archivo *target* correspondiente.

Código 3.3: Predicción de capacidad metabólica del holobionte con MiSCoTo

```
1 pip install miscoto #Instalación de MiSCoTo
2 miscoto scopes -m host.sbml -b symbiont_directory -s seeds.sbml -t targets.sbml [--output
  ↪ output_file]
```

Donde:

- `host.sbml` es el GEM del huésped en formato SBML.
- `symbiont_directory` es una carpeta que contiene los GEMs del microbioma en formato SBML.
- `seeds.sbml` es el archivo con los componentes del medio de cultivo en formato SBML.
- `targets.sbml` es un archivo opcional de metabolitos para estudiar la capacidad de ser producidos por el huésped junto al microboma.
- `output_file` es el nombre del archivo de salida.

El comando `miscoto scopes` entrega un archivo JSON con el listado de los metabolitos totales y deseados que son producibles por el alga en solitario y en presencia de la comunidad. Para más información acerca del uso de esta herramienta se puede consultar su repositorio de GitHub<sup>6</sup>.

Se analizan los puntos de interacción que ocurren entre el alga y su comunidad bacteriana a nivel metabólico que permiten la producibilidad de nuevos metabolitos mediante una inspección manual de las redes metabólicas. Para ello, se busca el metabolito de estudio en la base de datos MetaCyc [80] a partir de su identificador (ID), lo que permite conocer las

<sup>6</sup> GitHub MiSCoTo <https://github.com/cfrioux/miscoto>

reacciones en las que participa con sus respectivos precursores y vías metabólicas. Se realiza una búsqueda manual de estas reacciones y precursores dentro de los GEMs a partir de sus IDs, con el fin de identificar el componente faltante en el GEM del alga que evita su producibilidad y que se encuentra presente en los GEMs bacterianos que al unirlos logra su producción.

### 3.4. Selección de consorcios mínimos

MiSCoTo entrega la posibilidad de conocer los consorcios microbianos mínimos, esto es, un subconjunto de bacterias conformado por la cantidad mínima de especies que permita al alga alcanzar un objetivo metabólico. Con ese propósito se utiliza el comando **miscoto mincom**, que selecciona las especies que debe tener la comunidad microbiana para producir la mayor cantidad de metabolitos deseados.

Los objetivos metabólicos definidos para hacer la selección de los consorcios mínimos corresponden a los metabolitos correspondientes a la biomasa de *M. pyrifera* (Tabla B.1) y los que conforman el metaboloma del algas pardas (Tabla B.2). Además, se define un nuevo conjunto conformado por los metabolitos totales que se vuelven producibles por el alga en su integración con el holobionte (*scope*), predichos con **miscoto scopes** en pasos previos y detallados en la Tabla B.3. Con ellos se crea un nuevo archivo *target* en formato SBML, llamado “**Target\_producibles**”, que se genera utilizando el script de Python detallado en el Código C.1. Este nuevo archivo se encuentra en material suplementario.

Para realizar esta selección se utilizan los GEMs de *M. pyrifera* y de sus bacterias asociadas, el medio de cultivo y los conjuntos de metabolitos de interés antes mencionados, y se ejecutan utilizando Código 3.4. La selección de consorcios se puede llevar a cabo mediante dos criterios de optimización. El primero busca minimizar el tamaño de la comunidad, considerando al holobionte como un sistema no compartimentado (metaorganismo), sin tener en cuenta reacciones de transporte ni intercambios. El segundo criterio apunta a minimizar el costo asociado a los intercambios metabólicos y las reacciones de transporte, considerando al holobionte como un sistema compartimentado. Estos criterios corresponden a las opciones **soup** y **minexch** respectivamente. Para este análisis se utiliza sólo la opción **soup**, debido a que la gran cantidad de GEMs a ejecutar significa una alta carga computacional para la opción **minexch**, que puede llegar a requerir horas de ejecución y agotar la memoria del dispositivo, a diferencia de la opción **soup** que se ejecuta en segundos. Además los GEMs utilizados son borradores, por lo que es posible que no presenten todas las reacciones de transporte necesarias para representar adecuadamente las interacciones.

Código 3.4: Selección de consorcios mínimos con MiSCoTo

```
1 miscoto mincom -m host.sbml -b symbiont_directory -s seeds.sbml -t targets.sbml -o  
  ↪ option [--enumeration] [--output output_file]
```

Donde:

- **option** es el tipo de optimización para hacer la selección (**soup** o **minexch**).
- **- - enumeration** es un comando opcional que entrega todas las comunidades mínimas

para este problema, es decir, sus soluciones.

Las distintas soluciones representan el consorcio mínimo que alcanza la mayor producción de los metabolitos objetivo. En material suplementario se encuentran en carpetas los GEMs que conforman los distintos consorcios mínimos.

Adicionalmente, se calcula la capacidad metabólica total del alga en presencia de los consorcios mínimos ejecutando el Código 3.3, esta vez utilizando la carpeta de los distintos consorcios en vez de la comunidad completa. Con esto se obtiene el *scope* con los distintos consorcios mínimos.

### 3.5. Comparación con comunidad bacteriana de *Ectocarpus siliculosus*

Las comunidades bacterianas asociadas al alga parda *Ectocarpus siliculosus* y las asociadas a *Macrocystis pyrifera* son comparadas en cuanto a sus capacidades metabólicas en ausencia de a su respectiva alga huésped. Para ello, se utilizan nuevamente los GEMs bacterianos asociados a *M. pyrifera* y se dispone de 10 GEMs de bacterias asociadas a *E. siliculosus*, reportados por Burgunter-Delamare *et al.*, (2020) [40], que son evaluados con Memote utilizando el Código 3.2.

El cálculo se realiza utilizando nuevamente el comando `miscoto scopes`, como se muestra en el Código 3.3, para calcular los metabolitos totales que cada comunidad es capaz de producir. Se usan como entrada los GEMs de cada comunidad y el medio de cultivo, sin considerar el GEM de su alga huésped respectiva. También se estudia la producibilidad de los metabolitos encargados del crecimiento de biomasa y los que conforman el metaboloma de algas pardas, utilizando el Código 3.3 de la misma forma anterior, añadiendo los archivos `target Targets_biomasa` y `Targets_metaboloma` como entrada.

Se obtiene un listado de los metabolitos que ambas comunidades son capaces de producir en el medio de cultivo, reflejando su capacidad metabólica. Estas listas se comparan con el fin de identificar los metabolitos que producen en común y los propios de cada comunidad.

# Capítulo 4

## Resultados

Los resultados obtenidos a partir de la metodología descrita anteriormente se enfocan en la construcción de los modelos metabólicos a escala genómica de la comunidad de *M. pyrifera* y en la capacidad metabólica del holobionte predicha a partir de ellos en base a la producción de metabolitos de biomasa y que conforman el metaboloma de algas pardas, que se detalla con la inspección de las vías metabólicas en las que participan. Además, se presentan los consorcios microbianos mínimos asociados a cada objetivo metabólico y se comparan las comunidad bacterianas de *Macrocystis pyrifera* y *Ectocarpus siliculosus* en cuanto a sus capacidades metabólicas.

### 4.1. Construcción de modelos metabólicos a escala genómica

Se generaron 20 GEMs a partir de las secuencias genómicas de las bacterias identificadas como parte del holobionte (MAGs), anotadas estructural y funcionalmente. La cantidad de genes codificantes, reacciones y metabolitos de estos GEMs, junto con el borrador de *M. pyrifera*, es mostrada en la Tabla 4.1.

En ella, es posible apreciar que entre los GEMs bacterianos, *Hyphomicrobiales bacterium* posee una cantidad de genes, reacciones y metabolitos mucho mayor que el resto de modelos. Presenta una cantidad de genes casi cuatro veces mayor al promedio de los otros GEMs bacterianos, mientras que la cantidad de reacciones y metabolitos es superior en un 65% y 50% al promedio respectivamente. Incluso posee valores más cercanos al alga, donde la cantidad de genes y reacciones son mayores a las del alga en un 4% y ~1%, mientras que los metabolitos son menores en solo un 3%, lo que podría indicar errores o sobreestimación en la información genómica.

Adicionalmente, los GEMs bacterianos poseen distintas cantidades de genes codificantes y no codificantes, información que es comparada en la Figura I.1. Este gráfico revela un comportamiento inusual en la cantidad de genes del modelo de *Hyphomicrobiales bacterium*, ya que sus genes no codificantes son mas del triple de los codificantes.

En la comunidad bacteriana, hay tres especies que se encuentran asociadas tanto al alga hembra como a macho, que corresponden a *Labrenzia sp. DG1229*, *Nitratireductor sp. XY-223* y *Phycisphaera mikurensis NBRC 102666*. De esto, es posible destacar que el modelo

Tabla 4.1: Genes codificantes, reacciones y metabolitos presentes en los GEMs utilizados. Las especies que se encuentran asociadas a un alga hembra o macho se identifican con (H) y (M) respectivamente.

Organismo	Genes	Reacciones	Metabolitos
<b><i>Macrocystis pyrifera</i></b>	<b>4926</b>	<b>3821</b>	<b>3687</b>
<i>Alphaproteobacteria bacterium</i> (H)	1203	2172	2342
<i>Alphaproteobacteria bacterium bin95</i> (H)	1682	2610	2702
<i>Bauldia litoralis</i> (H)	1457	2723	2630
<i>Cobetia amphilecti</i> (H)	1162	2381	2393
<i>Gammaproteobacteria bacterium</i> (H)	2936	2809	2936
<i>Haliea salexigens DSM 19537</i> (H)	894	2169	2291
<b><i>Hyphomicrobiales bacterium</i> (H)</b>	<b>5115</b>	<b>3825</b>	<b>3576</b>
<i>Hyphomonas sp. L-53-1-40</i> (H)	980	2089	2252
<i>Labrenzia sp. DG1229</i> (H)	1789	3063	2898
<i>Labrenzia sp. DG1229</i> (M)	1833	3116	2936
<i>Mariniblastus fucicola</i> (M)	988	1712	1837
<i>Maritalea myrionectae DSM 19524</i> (M)	1074	2424	2424
<i>Nitratireductor sp. XY-223</i> (H)	1704	2878	2875
<i>Nitratireductor sp. XY-223</i> (M)	1695	2882	2873
<i>Oleiphilus sp.</i> (H)	1044	2231	2342
<i>Phycisphaera mikurensis NBRC 102666</i> (H)	1591	2015	2124
<i>Phycisphaera mikurensis NBRC 102666</i> (M)	800	1737	1897
<i>Planctomycetes bacterium</i> (H)	1058	1857	2080
<b><i>Planctomycetes bacterium GA0077529</i> (M)</b>	<b>440</b>	<b>1098</b>	<b>1281</b>
<i>Sphingorhabdus sp. M41</i> (H)	1037	2142	2272
<b>Promedio bacterias sin <i>H. bacterium</i></b>	<b>1335</b>	<b>2321</b>	<b>2389</b>

de *L. sp. DG1229* asociado a macho posee una cantidad de genes, reacciones y metabolitos 2% mayor que su modelo asociado al alga hembra, mientras que el modelo de *N. sp. XY-223* asociado a hembra es mayor en menos de un 1% a su modelo asociado al alga macho.

En cambio, los GEMs de *P. mikurensis NBRC 102666* poseen una diferencia relevante, donde el modelo asociado al alga hembra presenta casi el doble de genes que el de alga macho, y sus cantidades de reacciones y metabolitos son cerca de un 20% mayor, evidenciando que existen errores en uno o ambos genomas.

## 4.2. Capacidad metabólica del holobionte

La predicción de la capacidad metabólica del alga en su integración con el holobionte entrega la cantidad de metabolitos que el alga puede producir de manera individual y los que se vuelven producibles por el alga en presencia de la comunidad bacteriana en el medio de cultivo, definido en la Tabla H.1. También se obtiene la capacidad metabólica del holobionte completo al añadirle los metabolitos totales que puede producir la comunidad bacteriana. En la Figura 4.1 se muestra la cantidad de metabolitos que produce el alga en solitario y la porción añadida gracias a la presencia de la comunidad bacteriana, correspondientes a 702 y 308 metabolitos (Tabla B.3) respectivamente. Además se muestra la cantidad de metabolitos

que produce el holobionte completo, que se conforma de la unión de metabolitos producidos solo por el alga, en presencia de la comunidad, y los producidos solo por la comunidad. El detalle de este resultado se encuentra en material suplementario (S4).

La cantidad de metabolitos que el alga es capaz de producir aumenta un 44 % (308) gracias a la en presencia de la comunidad bacteriana, resultando en un total de 1010 metabolitos producibles por el alga, evidenciando la existencia de complementariedad metabólica entre los GEMs. Por otro lado, la comunidad bacteriana es capaz de producir un total de 1096 metabolitos, de los cuales 434 son distintos a los ya producibles por el alga, es decir, en el holobionte la comunidad y el alga producen 662 metabolitos en común. Con esto se obtiene que el holobionte completo puede producir un total de 1444 metabolitos, donde 50 % (742) es aportado gracias a la presencia de la comunidad bacteriana, ya sea produciendo metabolitos o promoviendo la producción del alga.

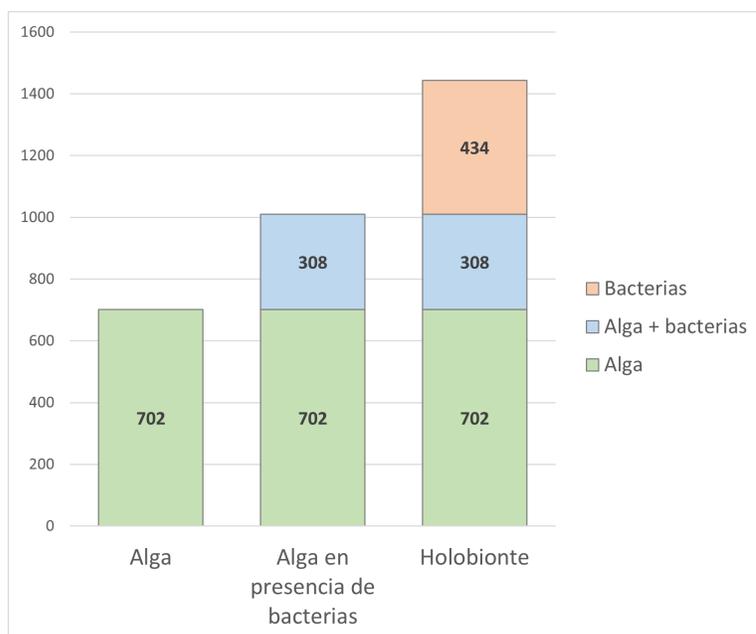


Figura 4.1: Cantidad de metabolitos totales que son producibles por el alga, tanto de manera individual como en presencia de bacterias, y por el holobionte completo, compuesto por la unión de los producibles por el alga y la comunidad bacteriana.

Se estudia la producibilidad de los metabolitos encargados del crecimiento de biomasa y los que forman parte del metaboloma de alga parda [78], que corresponden a 50 y 247 metabolitos respectivamente (Tablas B.1 y B.2). La Figura 4.2 muestra la cantidad de estos metabolitos que son producibles por el alga de forma individual, en presencia de la comunidad bacteriana y los que no son producibles por el modelo.

Para complementar este resultado, se analiza la producibilidad de los metabolitos objetivo según la categoría a la que pertenecen. Se definen 6 categorías que corresponden a ácidos grasos, ácidos nucleicos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas y otros, esta última se conforma de compuestos inorgánicos, cofactores y pigmentos, como *beta*-caroteno y fucoxantina. En la

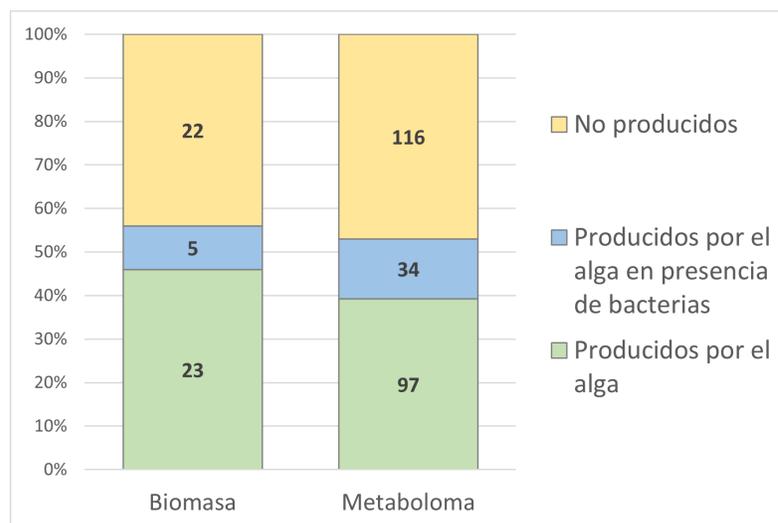


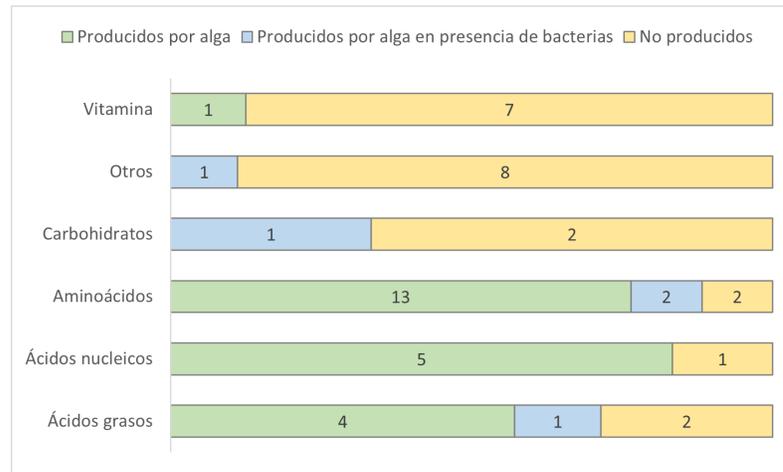
Figura 4.2: Cantidad de metabolitos de crecimiento de biomasa de *M. pyrifera* y del metaboloma de alga parda [78] producibles por el alga en solitario, en presencia de la comunidad bacteriana y que no se producen.

Figura 4.3 se muestra la cantidad de metabolitos de biomasa y del metaboloma producidos por el alga de forma individual, en presencia de la comunidad bacteriana y los que no se producen según la categoría a la que pertenecen.

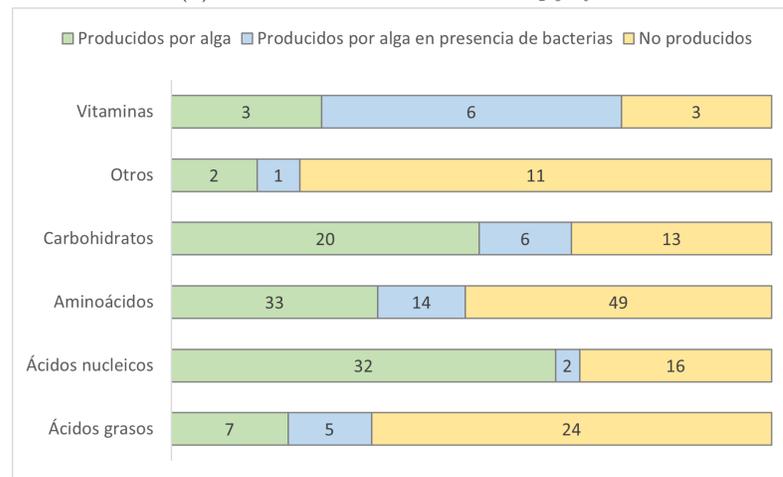
El objetivo metabólico de producción de biomasa de *M. pyrifera* corresponde a un conjunto de 50 componentes, de los cuales 23 son producibles por el alga. Es capaz de producir el 76 % (13) del total de aminoácidos, los que forman parte de los 20 aminoácidos codificables por el genoma, y el 57 % (4) del total de ácidos grasos, correspondientes a los ácidos mirístico, palmítico, esteárico y palmitato. Además, produce una vitamina, que es el  $\delta$ -tocoferol (vitamina E), y todos los ácidos nucleicos, a excepción de dTTP. En cuanto a acción de la comunidad bacteriana, los metabolitos adicionales de biomasa que permite producir son histidina, lisina, ácido oleico, manitol y el pigmento  $\beta$ -caroteno. En cambio, 22 metabolitos de crecimiento de biomasa no son producibles por el alga, correspondiente a un 40 % de los metabolitos, dentro de los que se encuentran los ácidos linolénico y linoleico, metionina, cistidina, alginato, callosa, el pigmento fucoxantina, vitaminas E, vitaminas B12 y compuestos inorgánicos.

El metaboloma de alga parda que se utilizó como objetivo metabólico se compone de 247 metabolitos, de los cuales cerca de un 35 % (97) son producibles por el alga de manera individual, 15 % (34) son añadidos gracias a la presencia de la comunidad bacteriana y el resto no es producible (116). En particular, la categoría que posee mayor alcance porcentual son las vitaminas, debido a que el alga produce un 25 % (3) de las vitaminas, y se añade un 50 % (6) en presencia de la comunidad bacteriana. En cuanto a las demás categorías, los carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos poseen una producción cercana a un 50 % (20), 27 % (33) y 17 % (7) por el alga en solitario, y un 15 % (6), 15 % (14) y 11 % (5) es producido adicionalmente gracias a la presencia de la comunidad bacteriana, respectivamente.

Las vitaminas son compuestos de gran interés de estudio debido a que son fundamentales en el crecimiento de las algas y el correcto funcionamiento de su metabolismo, además de



(a) Producción biomasa de *M. pyrifera*



(b) Producción metaboloma de alga parda

Figura 4.3: Producibilidad por categoría de metabolitos de crecimiento de biomasa de *M. pyrifera* (a) y que conforman el metaboloma de alga parda (b) por el alga en solitario, en presencia de la comunidad bacteriana y los que no son producidos por categorías.

ser importantes para el consumo humano por su aporte nutricional [26, 81]. Por esta razón, se estudia la producción de vitaminas por el alga de manera individual y en presencia de la comunidad bacteriana, considerando la unión entre las vitaminas para el crecimiento de biomasa y las que conforman el metaboloma de alga parda, resultado que se presenta en la Figura 4.4. Se puede apreciar que 3 vitaminas son producibles por el alga en solitario, que son el  $\delta$ -tocoferol (vitamina E), piridoxal y piridoxina (ambas formas de vitamina B6), mientras que la presencia de bacterias permite la producción de 6 más, alcanzando casi el 60% de las vitaminas deseadas, que son tres formas de vitamina B3 (niacinamida, ribósido de nicotinamida, niacina), piridoxamina (vitamina B6), riboflavina (vitamina B2) y monofosfato de tiamina (vitamina B1). En cambio, son 9 las vitaminas que no se logran producir por el alga en el holobionte, que son  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\alpha$ -tocotrienol (formas de vitamina E), adenosilcobalamina, cianocobalamina y cob(I)alamina (formas de vitamina B12), carnitina y pantotenato (vitamina B5).

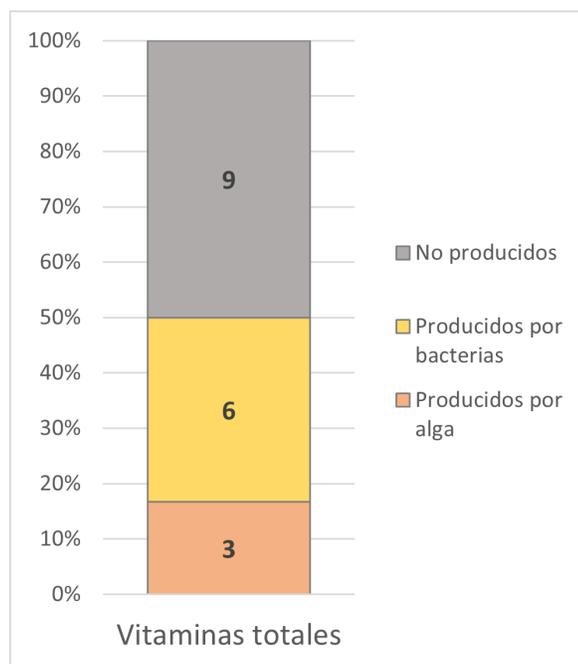


Figura 4.4: Cantidad de vitaminas que produce el alga de manera individual, en presencia de la comunidad bacteriana y que no se producen.

Una de las razones por las que los metabolitos objetivo no pueden ser producidos es debido a que no se encuentran definidos en los modelos metabólicos de estudio. Por esta razón se realiza un mapeo de los metabolitos no producidos con el fin de identificar los que no se encuentran definidos en los GEMs (Figura 4.5 y Anexo J). Con esta información es posible conocer los metabolitos que no tienen posibilidad de ser producidos por el alga, independiente del medio de cultivo o interacciones metabólicas. Estos son los que no se encuentran definidos en el GEM algal, es decir, se encuentran definidos sólo en los GEMs bacterianos o en ninguno. En cambio, los metabolitos no producibles que se encuentran definidos en el GEM algal o definidos tanto en el GEM algal como en los GEMs bacterianos podrían alcanzar su producción activando ciertas redes metabólicas, ya sea añadiendo metabolitos en el medio de cultivo o reacciones a partir de otras redes bacterianas que puedan interactuar.

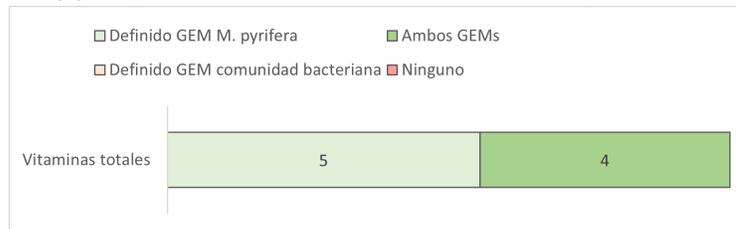
Con este resultado se obtiene que de los 22 metabolitos no producibles de la biomasa de *M. pyrifera*, 8 están ausentes en el GEM de esta alga, entre los que destacan el alginato, callosa, fucoxantina y floroglucinol. De los 116 metabolitos del metaboloma no producibles, 67 no se encuentran definidos en el GEM del alga, que corresponde a un 58% de los no producibles. En particular, los porcentajes de metabolitos no producibles que están definidos en los GEMs según categoría son un 33% (6) en ácidos grasos, 25% (3) en ácidos nucleicos, 53% (22) en aminoácidos y 46% (6) en carbohidratos. En cambio, considerando las vitaminas de biomasa y metaboloma de algas pardas, todas se encuentran definidas en el GEM del alga, de las cuales 5 no están definidas en los GEMs bacterianos, que son  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\alpha$ -tocotrienol y cianocobalamina.



(a) Mapeo de metabolitos de biomasa de *M. pyrifera* no producidos



(b) Mapeo de metabolitos de metaboloma no producidos



(c) Mapeo de vitaminas totales no producidas

Figura 4.5: Identificación de metabolitos de biomasa de *M. pyrifera* (a), de metaboloma de alga parda (b) y vitaminas totales (c) no producibles que se encuentran definidos en el GEM algal, en los GEMs bacterianos, o en ninguno de ellos.

## 4.3. Inspección de redes metabólicas asociadas a la producción de metabolitos deseados

Para abordar la producción de los conjuntos de metabolitos deseados mencionados anteriormente, se hace una inspección manual de las reacciones metabólicas en las que participan, con el fin de conocer el motivo por el cual son producibles o no.

### 4.3.1. Redes metabólicas de producción de metabolitos de la biomasa de *M. pyrifer*

Se analizan las reacciones metabólicas en las que se producen los metabolitos de la biomasa de *M. pyrifer*. Para ello, se divide este análisis en los metabolitos producibles por el alga en presencia de la comunidad bacteriana, donde se analizan los puntos de interacción, y en los metabolitos no producibles. La no producibilidad de metabolitos depende de si se encuentran definidos en los GEMs o no, detalle que se muestra en la Tabla J.1, por lo que el análisis se distribuye en base a esto.

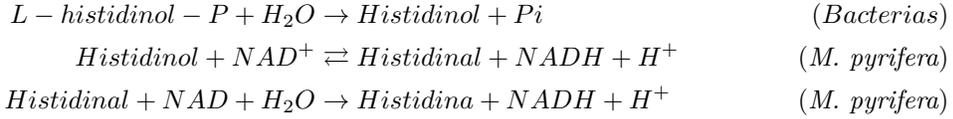
#### 4.3.1.1. Metabolitos de biomasa producibles por *M. pyrifer* en presencia de la comunidad bacteriana

Gracias a las interacciones metabólicas en el holobionte, *M. pyrifer* es capaz de añadir 5 nuevos metabolitos de biomasa a su alcance metabólico, que son el ácido oleico, histidina, lisina, manitol y el pigmento  $\beta$ -caroteno. A continuación se muestran las reacciones en las que se evidencia la interacción entre los organismos que permiten lograr esta producción.

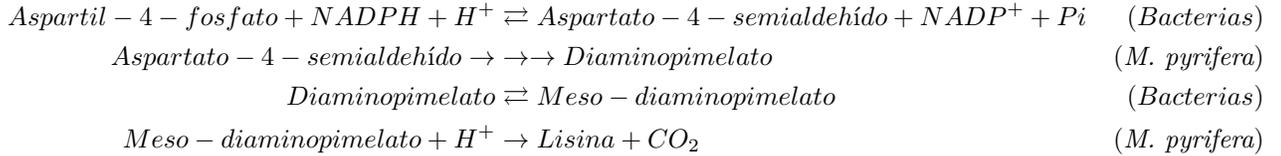
- **Ácido oleico:** el modelo metabólico de *M. pyrifer* posee 8 reacciones en las que el ácido oleico es producto, de ellas, sólo una posee un reactante producible, que es el oleil-CoA. Esta reacción corresponde a EC 3.1.2.2 y participa en la vía metabólica de biosíntesis de ácido oleico, donde es producido a partir de oleil-CoA [80], el cual no es producible por el alga, pero es aportado a la red del holobionte gracias a que todas las bacterias de la comunidad lo producen. En la Figura K.1 se muestra la vía metabólica de la que forma parte esta reacción.



- **Histidina:** la histidina es reactante de varias reacciones presentes en el modelo metabólico de *M. pyrifer*, las que participan en las vías metabólicas para la biosíntesis de ergotioneina (EC 2.1.1.44) [82], carnosina (EC 6.3.2.11) [83] y homocarnosina (EC 6.3.2.11) [83]. El modelo de *M. pyrifer* posee un reacción que produce histidina a partir de histidinal (EC 1.1.1.23) dentro de la vía metabólica de síntesis de histidina, la cual se genera a partir de histidinol, que a su vez es producido por L-histidinol-P (EC 3.1.3.15). Este último metabolito es producible por el alga, pero no posee la reacción necesaria para transformarlo en histidinol, interrumpiendo la vía metabólica, funcionalidad que es aportada por todas las bacterias de la comunidad. En la Figura K.2 se muestra un extracto de esta vía metabólica.



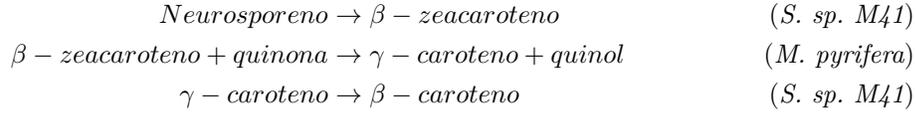
- **Lisina:** en el modelo metabólico de *M. pyrifer* lisina participa en reacciones de degradación (EC 1.5.1.8) [84] y fermentación a acetato y butanoato (EC 5.4.3.2) [85]. Además forma parte del metabolismo de fructosilisina y la glucosilisina [80]. La lisina se produce a partir de meso-diaminopimelato (EC 4.1.1.20), pero el modelo de *M. pyrifer* carece de algunas reacciones de esta vía para alcanzar su producción, las que son aportadas a la red por la comunidad bacteriana. Estas reacciones faltantes son la que convierten aspartil-4-fosfato en aspartato-4-semialdehído (EC 1.2.1.11), aportadas por todas las bacterias, y diaminopilemato en meso-diaminopimelato (EC 5.1.1.7), que es aportada por todas las bacterias a excepción de *Mariniblastus fucicola*. En la Figura K.3 se muestra la vía metabólica que contiene estas reacciones.



- **Manitol:** el modelo metabólico de *M. pyrifer* incluye el ciclo de manitol, donde esta molécula participa en una cadena de reacciones que inicia con fructosa-6P, que es producible por el alga. La fructosa-6P es convertida en manitol-1P (EC 1.1.1.17) para luego producir manitol (EC 3.1.3.22). La reacción para producir manitol-1P no se encuentra definida en el GEM de *M. pyrifer*. Esta funcionalidad es aportada por el metabolismo de *Hyphomicrobiales bacterium* para lograr la síntesis de manitol. En la Figura K.4 se muestra la vía metabólica que contiene estas reacciones.



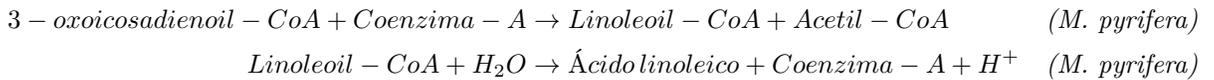
- **$\beta$ -caroteno:** la producción de  $\beta$ -caroteno se realiza a partir de una cadena de reacciones entre los modelos de la bacteria *Sphingorhabdus sp. M41* y *M. pyrifer*, que son análogas a la vía metabólica de biosíntesis de  $\beta$ -caroteno. El alga es capaz de producir neurosporeno en sus redes, que es un carotenoide requerido por el modelo de *S. sp. M41* para producir  $\beta$ -zeacaroteno (EC 1.3.99.31). A su vez, este metabolito participa en una reacción en donde  $\beta$ -zeacaroteno produce  $\gamma$ -caroteno (EC 5.5.1.19). Finalmente, la bacteria *S. sp. M41* permite sintetizar  $\beta$ -caroteno a partir de  $\gamma$ -caroteno (EC 5.5.1.19). Estas reacciones y su análogo a la vía metabólica de biosíntesis de  $\beta$ -caroteno se muestra en las Figuras K.5 y K.6.



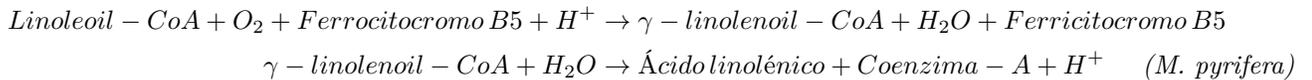
#### 4.3.1.2. Metabolitos de biomasa no producibles por *M. pyrifer* en el holobionte

Se analizan las reacciones metabólicas de los metabolitos de la biomasa que no son producibles por *M. pyrifer* con el fin de identificar qué reacciones o metabolitos faltan en los GEMs para lograr la producción deseada. En este análisis no se consideran los metabolitos no producibles que no se encuentran definidos en los GEMs de estudio debido a que no poseen reacciones en las que participen, estudiado al final de la Sección 4.2 (Figura 4.5). Estos corresponden al alginato, callosa, floroglucinol, fucoxantina, I<sub>2</sub>, Pb<sup>+2</sup>. Por otro lado, se encuentran los metabolitos que no están definidos en el modelo de *M. pyrifer*, pero sí lo están en algún modelo bacteriano, que corresponden al arsenato y Hg<sup>+2</sup>, que a pesar de estar en los modelos bacterianos, no pueden ser producibles por el alga. A continuación se muestran las redes metabólicas y/o precursores faltantes que se podrían agregar para lograr la producción de los metabolitos de interés definidos en los GEMs.

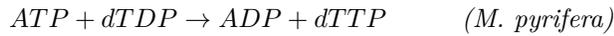
- **Ácido linoleico:** el ácido linoleico se puede sintetizar en la vía metabólica de hidrólisis de acetil-CoA mostrada en la Figura K.7, que es una reacción genérica en donde un ácido graso que se encuentra unido a acetil-CoA es liberado (EC 3.1.2.20). En este caso, el ácido linoleico proviene del linoleoil-CoA, que es producido a partir de 3-oxoicosadienoil-CoA en una reacción no asociada a ninguna vía metabólica (EC 2.3.1.16). El 3-oxoicosadienoil-CoA no es producto de ninguna reacción en el modelo del alga y no es producible por la comunidad bacteriana.



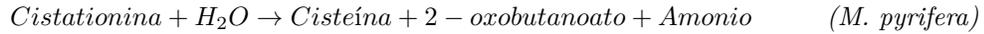
- **Ácido linolénico:** el ácido linolénico se sintetiza por la misma vía que el ácido linoleico (Figura K.7), pero en este caso ocurre a partir de  $\gamma$ -linolenoil-CoA, que es producto de linoleoil-CoA gracias a una reacción catalizada por el ferrocitocromo B5 (EC 1.14.19.3) [86]. Anteriormente se mencionó que linoleoil-CoA no es producible por el modelo de *M. pyrifer* ni por la comunidad bacteriana.



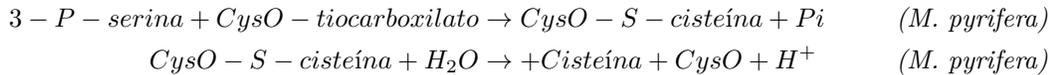
- **dTTP:** el dTTP forma parte de reacciones de liberación de fosfatos, produciendo una molécula de dTDP o dTMP. La única reacción que poseen los modelos de *M. pyrifer* y todas las bacterias de la comunidad para producir dTTP es mediante la adición de un fosfato a la molécula de dTDP (EC 2.7.4.6), pero esta molécula tampoco es producible por ninguno de estos modelos.



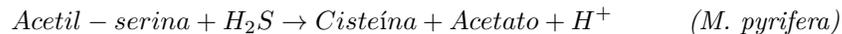
- **Cisteína:** la cisteína es un aminoácido que participa como reactante en muchas reacciones dentro del modelo metabólico de *M. pyrifera*. Este modelo posee tres vías metabólicas para la biosíntesis de cisteína. En la primera, la cisteína es producida a partir de cistanionina (EC 4.4.1.1), que no tiene reacciones para ser producida en el modelo de *M. pyrifera* y no es producible por ninguna de las bacterias de la comunidad. En la Figura K.8 se muestra la vía metabólica a la que pertenece esta reacción.



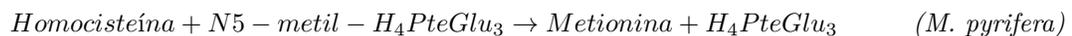
La otra la vía metabólica para la síntesis de cisteína requiere un tipo de carrier CysO unido a una cisteína (CysO-S-cisteína) para su producción (EC 3.13.1.6), que a su vez es producido a partir de 3-P-serina (EC 2.5.1.113). Esta última molécula es producible por las bacterias de la comunidad, a excepción de *Planctomycetes bacterium* y *Planctomyces bacterium GA0077529*, pero las reacciones para llegar a la cisteína no se encuentran en el modelo del alga, teniendo incompleta esta ruta. Esta vía metabólica se muestra en la Figura K.9.



La última corresponde a una vía metabólica de biosíntesis de cisteína que proviene de las vías de biosíntesis de serina y de la asimilación de sulfato, donde la cisteína se produce a partir de acetil-serina y ácido sulhídrido (EC 2.5.1.47). Esta reacción no se encuentra definida en el modelo de *M. pyrifera*, pero sí en los bacterianos (a excepción de los de *Nitratireductor sp. XY-223*), pero el ácido sulhídrico no es producible, por lo que tampoco se alcanza la producción de cisteína. En la Figura K.10 se muestra esta vía.



- **Metionina:** la metionina se encuentra presente en cerca de 45 reacciones dentro del modelo metabólico de *M. pyrifera*, donde participa principalmente como producto y actúa como sustrato en reacciones de degradación (EC 4.4.1.11) y producción de acetil-metionina (EC 2.3.1.1). Se produce en la vía metabólica de síntesis de metionina, que inicia con la homoserina, la cual se convierte en fosfomoserina (EC 2.7.1.39). Este metabolito produce cistationina gracias a la acción de la cisteína (EC 2.5.1.48), que no es producible por los modelos, como se mencionó anteriormente. Esto interrumpe la producción de metionina en la vía, ya que no se puede producir homocisteína, que es precursor de metionina en la reacción EC 2.1.1.14. En la Figura K.11 se muestra esta vía metabólica.



En el GEM de *M. pyrifera* se encuentra definida otra vía de biosíntesis de metionina,

cuyo precursor también es la homocisteína (EC 2.1.1.13 y EC 2.1.1.14), pero esta es producida a partir de acetil-homoserina y ácido sulfhídrico (EC 2.5.1.49). Este último metabolito no es producible por el holobionte, por lo que tampoco se logra obtener metionina. En la Figura K.12 se muestra esta vía metabólica.



Además, la metionina puede ser producida a partir de reacciones de la vía metabólica de la regla del extremo Ac/N, en donde se degrada la cadena de aminoácidos metionil-acil-[proteína] en una -acil-[proteína], liberando la metionina. Estas reacciones se muestran en la Figura K.14. Los metabolitos metionil-acil-[proteína] no son producibles por el alga ni por la comunidad bacteriana, ya que no presentan reacciones en las que sean producto.



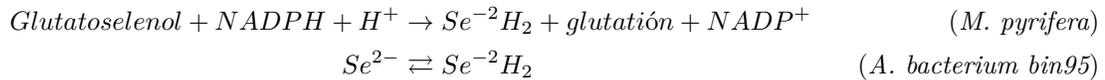
La metionina participa en varias reacciones siendo producto de una transformación de la S-adenosilmetionina, la que entrega el -adenosil a otro compuesto, liberando metionina. La S-adenosilmetionina se puede producir solo a partir de la metionina, por lo que en este caso no es producible por los modelos. En la siguiente reacción se muestra un ejemplo de la acción de la S-adenosilmetionina.



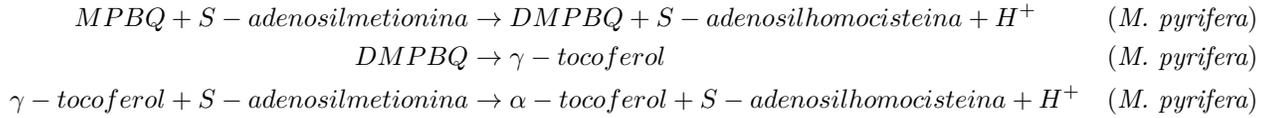
- **Cd<sup>2+</sup>**: este metabolito participa en una reacción de transporte en la que Cd<sup>2+</sup> es expulsado hacia el exterior por una enzima ATPasa (EC 7.2.2.21). Esta reacción también se encuentra en algunos GEMs bacterianos, que son los de *Bauldia litoralis*, *Gammaproteobacteria bacterium*, *Phycisphaera mikurensis NBRC 102666*, *Mariniblastus fucicola* y *Maritalea myrionectae*. Como es una reacción únicamente de transporte del metabolito, el modelo no posee la capacidad de producirlo. En la reacción *in* indica que el metabolito se encuentra al interior del compartimento y *out* al exterior.



- **Se<sup>2-</sup>**: este metabolito se encuentra en el modelo metabólico de *M. pyrifera* como reactante en una reacción de la biosíntesis de L-selenocisteína (EC 2.7.9.3), pero no es producto de ninguna, por lo que no podría ser producida por el alga. Por otro lado, todas las bacterias de la comunidad, a excepción de *Alphaproteobacteria bacterium bin95*, poseen una reacción espontánea para producir Se<sup>2-</sup> a partir de Se<sup>2-</sup>H<sub>2</sub>, el que a su vez es producido por glutatoselenol (EC 1.8.1.-). Los modelos bacterianos no poseen reacciones en las que glutatoselenol sea producido, por lo tanto, el resto de compuestos de la cadena no se pueden producir.



- **Tocoferoles:** las vitaminas  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol se encuentran definidas en el modelo de *M. pyrifera*, pero no de los modelos bacterianos. Los tocoferoles poseen una vía específica para su síntesis, donde las vitaminas  $\gamma$ -tocoferol y  $\alpha$ -tocoferol participan en una misma parte de la vía. Se inicia con el 2-metil-6-fitilo-1,4-benzoquinol (MPBQ), que es transformado en 2,3-dimetil-6-fitilo-1,4-benzoquinol (DMPBQ) gracias a S-adenosilmetionina (EC 2.1.1.295). Luego DMPBQ reacciona a  $\gamma$ -tocoferol (EC 5.5.1.24), que su vez, es transformado a  $\alpha$ -tocoferol gracias a S-adenosilmetionina (2.1.1.95) [87, 88]. En la Figura K.15 se muestra la vía metabólica que contiene estas reacciones.

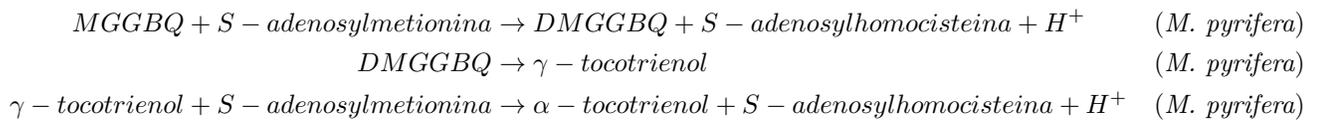


El modelo de *M. pyrifera* tiene la capacidad de producir MPBQ, pero no así el metabolito S-adenosilmetionina, por lo tanto, se ve interrumpida la vía metabólica y no se alcanza a producir DMPBQ,  $\gamma$ -tocoferol ni  $\alpha$ -tocoferol.

De igual manera ocurre para la vitamina  $\beta$ -tocoferol, que participa en otra parte de la vía metabólica junto a  $\delta$ -tocoferol. Se inicia con MPBQ, que produce  $\delta$ -tocoferol (EC 5.5.1.24), el que nuevamente requiere de la acción de S-adenosilmetionina para producir  $\beta$ -tocoferol (EC 2.1.1.95). En este caso,  $\delta$ -tocoferol es producible por el alga, ya que no requiere de la presencia del metabolito faltante, pero la producibilidad de  $\beta$ -tocoferol se ve interrumpida por la falta de S-adenosilmetionina.

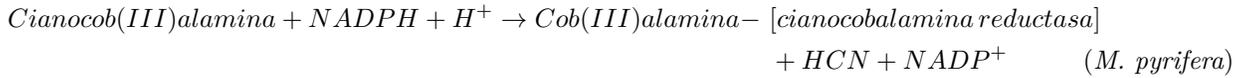


- **$\alpha$ -tocotrienol:** la vitamina  $\alpha$ -tocotrienol se sintetiza en la vía metabólica de síntesis de tocotrienoles, que es análoga a la síntesis de tocoferoles. La síntesis de  $\alpha$ -tocotrienol inicia con 2-metil-6-geranilgeranil-1,4-benzoquinol (MGGBQ), que es transformado en 2,3-dimetil-6-geranilgeranil-1,4-benzoquinol (DMGGBQ) gracias a S-adenosylmetionina (EC 2.1.1.295). Luego, DMGGBQ puede producir  $\gamma$ -tocotrienol (EC 5.5.1.24), que su vez, es transformado a  $\alpha$ -tocotrienol gracias a S-adenosylmetionina (EC 2.1.1.95). En la Figura K.16 se muestra la vía a la que pertenecen estas reacciones. Nuevamente, el alga es capaz de producir MGGBQ, pero debido a la falta de S-adenosylmetionina, la vitamina  $\alpha$ -tocotrienol no es producible.



- **Cianocobalamina:** la cianocobalamina (cianocob(III)alamina) es una forma de vitamina B12 que se encuentra definida sólo en el GEM de *M. pyrifera* en una sola reacción, en

la que participa como reactante, uniéndose a la enzima cianocobalamina-reductasa, que forma parte de la vía metabólica de recuperación de cobalamina, en que la se sintetizan enzimas (EC 1.16.1.6). Además, esta vitamina no se encuentra definida en ninguno de los GEMs de la comunidad bacteriana, por lo que no puede ser sintetizado por estas.



- **Cob(I)alamina:** la cob(I)alamina es la forma más reducida de vitamina B12 [89] y se encuentra definida en el GEM de *M. pyrifer* en una sola reacción, en la que participa como reactante, donde es oxidada para ser transformada en cob(II)alamina mediante una reacción espontánea que forma parte de la vía metabólica de recuperación de adenosilcobalamina, mostrada en la Figura K.23. Esta vitamina no participa como producto en ninguna reacción del modelo de *M. pyrifer* y no es producida por la comunidad bacteriana.



- **Adenosilcobalamina:** la adenosilcobalamina es otra forma de vitamina B12 que es producida en la vía metabólica de recuperación de adenosilcobalamina. Esta vía inicia con cob(I)alamina, que es transformado en cob(II)alamina mediante la reacción mencionada antes, y este en adenosilcobalamina. Como se mencionó anteriormente, la cob(I)alamina no es producible por el modelo de *M. pyrifer* y la flavoproteína requerida en esta vía para hacer la conversión de cob(II)alamina en adenosilcobalamina no es producible por el holobionte. En la Figura K.23 se muestra esta vía metabólica.



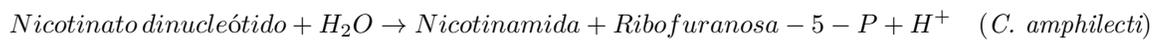
### 4.3.2. Redes metabólicas de producción de metabolitos del metaboloma de alga parda

La cantidad de metabolitos que conforman el metaboloma de algas pardas producibles gracias a la presencia de la comunidad bacteriana y los no producibles sobrepasa los 100 metabolitos, por lo que se analizan las redes metabólicas sólo de las vitaminas, consideradas los metabolitos más relevantes para este estudio. Se analizan las redes en las que participan las vitaminas para comprender su influencia, y en los no producibles.

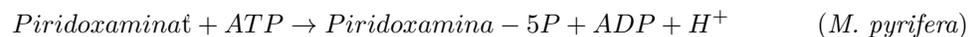
#### 4.3.2.1. Vitaminas del metaboloma producibles por *M. pyrifer* en presencia de la comunidad bacteriana

Gracias a las interacciones metabólicas en el holobionte, el alga es capaz de añadir 6 vitaminas nuevas a su alcance metabólico, pertenecientes al metaboloma de algas pardas. Estas vitaminas corresponden a nicotinamida, ribósido de nicotinamida, nicotinato, piridoxamina, riboflavina y tiamina monofosfato. A continuación se muestran las redes metabólicas en las que participan.

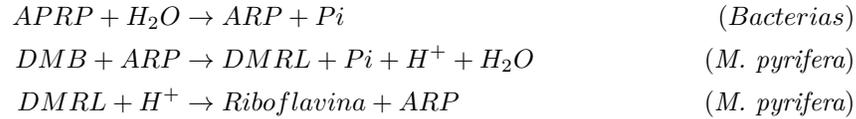
- **Ribósido de nicotinamida, nicotinamida y nicotinato:** estos metabolitos son producidos en la vía metabólica de recuperación de NAD por reacciones presentes en los GEMs del alga y de la bacteria *Cobetia amphilecti*. Esta vía es cíclica e inicia con el compuesto nicotinato dinucleótido, que es producido por el alga, y sintetiza NAD mediante dos reacciones consecutivas presentes en el GEM del alga (EC 2.7.7.18 y EC 6.3.5.1). Luego, mediante reacciones presentes en el GEM de *C. amphilecti* NAD es convertido nuevamente en nicotinato dinucleótido (EC 3.6.1.22) para sintetizar ribósido de nicotinamida (EC 3.2.2.14) y nicotinamida (EC 3.2.2.6). Este último metabolito es convertido en nicotinato mediante una reacción de *M. pyriferá* (EC 3.5.1.19), para finalmente cerrar el ciclo al ser convertido en nicotinato dinucleótido por una reacción presente en el GEM del alga (EC 6.3.4.21). En la Figura K.17 se muestra esta vía metabólica, que proviene del metabolismo de plantas.



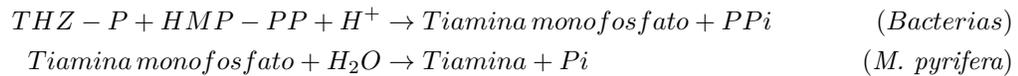
- **Piridoxamina:** este metabolito forma parte de la vía de recuperación de piridoxal-5P, que posee ciclos en los que la piridoxamina se transforma en piridoxamina-5P, y viceversa (EC 2.7.1.35 y EC 3.1.3.74). Los modelos de todas las bacterias de la comunidad, a excepción *Gammáproteobacteria bacterium* y *Planctomycetes bacterium*, aportan a la red del alga el metabolito piridoxamina-5P, por lo tanto, permiten que se genere piridoxamina. La vía metabólica en la que se encuentran estas reacciones se muestra en la Figura K.18, que proviene del metabolismo de las plantas *Arabidopsis thaliana* y *Triticum aestivum* [90, 91].



- **Riboflavina:** la riboflavina es producida en la vía metabólica de biosíntesis de flavina, donde su precursor es 6,7-dimetil-8-ribitilumacina (DMRL) (EC 2.5.1.9). Este compuesto es generado por 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-P (DMB), que es producible por el modelo del alga, y 5-amino-6-(D-ribitilamino)uracil (ARP) (EC 2.5.1.78), que no es producible por *M. pyriferá*, debido a que no posee la reacción necesaria. Esta reacción es aportada por todas las bacterias de la comunidad, en la que se produce ARP a partir de 5-amino-6-(5-fosfo-D-ribitilamino)uracil (APRP) (EC 3.1.3.104). El resto de reacciones de esta vía metabólica se encuentran definidas en el modelo del alga. Esta vía metabólica se muestra en la Figura K.19, que proviene del metabolismo de las bacterias *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* y la planta *Arabidopsis thaliana* [92, 93].



- **Tiamina monofosfato:** este metabolito participa en la vía metabólica para la biosíntesis de tiamina difosfato, donde su precursor es la tiamina (EC 2.7.6.2), la cual es producida por tiamina monofosfato. Este último metabolito se produce a partir de 4-metil-5-(2-fosfooxietil)tiazol (THZ-P) y 4-amino-2-metil-5-(difosfooximetil)pirimidina (HMP-PP) a partir de una reacción que no se encuentra definida en el modelo de *M. pyrifer* (EC 2.5.1.3), pero es aportada a la red por la comunidad bacteriana por las especies *Alphaproteobacteria bacterium*, *Alphaproteobacteria bacterium bin95*, *Cobetia amphilecti*, *Hyphomicrobiales bacterium* y *Labrenzia sp. DG1229*. Cabe destacar que la tiamina forma parte del conjunto de metabolitos del medio de cultivo según lo definido en el medio Provasoli [37]. En la Figura K.20 se muestra esta vía metabólica.



#### 4.3.2.2. Vitaminas del metaboloma no producibles por *M. pyrifer* en presencia de la comunidad bacteriana

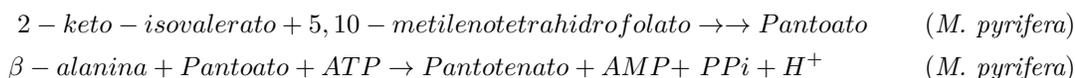
Se hizo una búsqueda de las vitaminas del metaboloma que no son producibles por el holobionte ( $\alpha$ -tocoferol, carnitina y pantotenato). La  $\alpha$ -tocoferol se encuentra definida sólo en el GEM de *M. pyrifer*, donde no es producible, como se mencionó anteriormente. La carnitina y pantotenato se encuentran definidas tanto en el GEM del alga como en los bacterianos y a continuación se estudian las reacciones en las que participan para analizar su producibilidad.

- **Carnitina:** la carnitina se produce a partir de la vía metabólica de biosíntesis de carnitina, que inicia con el metabolito trimetil-lisina, que no es producible por *M. pyrifer*, ya que sólo participa como reactante en las reacciones en las que está definido, ni por la comunidad bacteriana, debido a que este metabolito no se encuentra presente en ninguno de los modelos de bacterias. Por lo tanto, no permite la producción de los siguientes metabolitos de la vía, que son 3-hidroxi-trimetil-lisina, trimetil-laminobutiraldehído,  $\gamma$ -butirotetaina y finalmente, carnitina. Cabe destacar que los metabolitos trimetil-lisina y  $\gamma$ -butirotetaina también forman parte del metaboloma de algas pardas, en las categorías de “aminoácido” y “otro” respectivamente. En la Figura K.21 se muestra esta vía metabólica.



- **Pantotenato:** este metabolito participa en la última reacción de la vía metabólica de biosíntesis de fosfopantotenato como reactante. Esta vía inicia con 2-keto-isovalerato, que es producible por *M. pyrifer*, pero la siguiente reacción de la vía requiere de un 5,10-metilenotetrahidrofolato (EC 2.1.2.11), metabolito que no es producible ni por el modelo del alga ni por las bacterias, por lo tanto se interrumpe la vía y no se producen

los metabolitos siguientes. La vía metabólica en la que ocurre esto se muestra en la Figura K.22.



## 4.4. Consorcios mínimos

La selección de consorcios mínimos consiste en elegir una cantidad mínima de microorganismos que puedan alcanzar un objetivo metabólico. En este caso, se escogen tres objetivos, correspondientes a la producción de los metabolitos de biomasa de *M. pyrifer*, los que forman parte del metaboloma de algas pardas y los metabolitos totales que *M. pyrifer* es capaz de producir gracias a la presencia de la comunidad bacteriana completa (*scope*), estudiados en la Sección 4.2. Este conjunto se conforma de 308 metabolitos que se añaden a la capacidad metabólica del alga, que se detallan en la Tabla B.3.

Esta predicción entrega subconjuntos de las 20 bacterias de la comunidad asociada a *M. pyrifer* que corresponden a soluciones del problema de optimización bajo el criterio minimización del tamaño de la comunidad, con el fin de producir la mayor cantidad de metabolitos objetivo. El resultado de esta predicción se encuentra en la Tabla 4.2, donde se muestran las soluciones según el objetivo metabólico. Las especies que se repiten en las distintas soluciones se encuentran destacadas con el mismo color.

Tabla 4.2: Comunidades mínimas que permiten la producción de los metabolitos de biomasa de *M. pyrifer*, los que conforman el metaboloma de alga parda y los metabolitos totales que se vuelven producibles por el alga en su integración con el holobionte. Las especies repetidas se encuentran destacadas con color.

	Solución 1	Solución 2	Solución 3
<b>Biomasa</b>	<i>Hyphomicrobiales bacterium</i> (H)	—	—
	<i>Planctomycetes bacterium</i> (H)		
	<i>Sphingorhabdus sp. M41</i> (H)		
<b>Metaboloma</b>	<i>Cobetia amphilecti</i> (H)	<i>Cobetia amphilecti</i> (H)	<i>Bauldia litoralis</i> (H)
	<i>Hyphomicrobiales bacterium</i> (H)	<i>Hyphomicrobiales bacterium</i> (H)	<i>Cobetia amphilecti</i> (H)
	<i>Nitratireductor sp. XY-223</i> (H)	<i>Nitratireductor sp. XY-223</i> (M)	<i>Hyphomicrobiales bacterium</i> (H)
	<i>Planctomycetes bacterium</i> (H)	<i>Planctomycetes bacterium</i> (H)	<i>Planctomycetes bacterium</i> (H)
<b>Producibles por el alga en el holobionte</b>	<i>Alphaproteobacteria bacterium bin95</i> (H)	<i>Alphaproteobacteria bacterium bin95</i> (H)	—
	<i>Bauldia litoralis</i> (H)	<i>Bauldia litoralis</i> (H)	
	<i>Cobetia amphilecti</i> (H)	<i>Cobetia amphilecti</i> (H)	
	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i> (H)	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i> (H)	
	<i>Hyphomicrobiales bacterium</i> (H)	<i>Hyphomicrobiales bacterium</i> (H)	
	<i>Oleiphilus sp.</i> (H)	<i>Oleiphilus sp.</i> (H)	
	<i>Phycisphaera mikurensis NBRC 102666</i> (M)	<i>Phycisphaera mikurensis NBRC 102666</i> (H)	
	<i>Planctomycetaceae bacterium Ga0077529</i> (M)	<i>Planctomycetaceae bacterium Ga0077529</i> (M)	
	<i>Planctomycetes bacterium</i> (H)	<i>Planctomycetes bacterium</i> (H)	
	<i>Sphingorhabdus sp. M41</i> (H)	<i>Sphingorhabdus sp. M41</i> (H)	

De la Tabla 4.2 es posible destacar que las bacterias *Hyphomicrobiales bacterium* y *Planctomycetes bacterium* están presentes en todos los consorcios mínimos reportados, mientras

que *Cobetia amphilecti* está ausente sólo en el consorcio cuyo objetivo es la producción de biomasa y *Sphingorhabdus sp. M41* está ausente sólo en los consorcios para producción del metaboloma. Con respecto a la producción del metaboloma de alga parda, las soluciones 1 y 2 poseen las mismas especies, pero se diferencian en el modelo de *Nitratireductor sp. XY-223*, ya que la solución 1 utiliza el modelo asociado a alga hembra (H) y la solución 2 el asociado a alga macho (M), mientras que la solución 3 reemplaza *Nitratireductor sp. XY-223* por *Bauldia litoralis*. Lo mismo ocurre en los dos consorcios mínimos asociados al objetivo de los metabolitos producibles por el alga en el holobionte, que poseen las mismas 10 especies y se diferencian en el modelo de *Phycisphaera mikurensis NBRC 102666*, debido a que las soluciones 1 y 2 utilizan el modelo asociado a alga macho y hembra respectivamente. Los dos consorcios mínimos seleccionados para este objetivo metabólico incluyen las 5 especies que conforman los otros consorcios mínimos, a excepción de *Nitratireductor sp. XY-223*, lo que se ve reflejado con colores en la tabla.

Anteriormente se estudió el alcance de la comunidad bacteriana completa con respecto a estos objetivos metabólicos (Sección 4.2), obteniendo los metabolitos que se vuelven producibles por el alga cuando se asocia con bacterias, que son 5 metabolitos para el crecimiento de biomasa del alga, 32 del metaboloma de alga parda y 308 metabolitos totales. La selección de los consorcios mínimos se construye fijando este alcance, por lo tanto, los metabolitos producibles por el alga en presencia de estos consorcios son los mismos que con la comunidad completa con respecto a los objetivos metabólicos, a pesar de la eliminación de especies en su microbioma. Por ejemplo, para obtener los 5 metabolitos que conforman la biomasa que se vuelven producibles gracias a la presencia de la comunidad bacteriana (ácido oleico, histidina, lisina, manitol y  $\beta$ -caroteno), se requiere solo la acción de las especies *Hyphomicrobiales bacterium*, *Planctomycetes bacterium* y *Sphingorhabdus sp. M41*, y no de la comunidad completa. Esto permite identificar la redundancia entre las especies del microbioma y las bacterias que son fundamentales con respecto a los objetivos metabólicos.

Como se mencionó anteriormente, el modelo de *M. pyrifera* en el medio de cultivo utilizado puede producir 702 metabolitos (Figura 4.1), cantidad que no depende de la comunidad y no se ve afectada por la eliminación de bacterias. Sin embargo, la cantidad de metabolitos totales que se adicionan a la capacidad metabólica del alga gracias a la presencia de los consorcios mínimos es distinta. En la Tabla 4.3 se registran los metabolitos totales que se vuelven producibles por *M. pyrifera* en presencia de los consorcios mínimos obtenidos, donde se puede notar que la producibilidad de estos es variable. En el caso de los consorcios mínimos del tercer objetivo metabólico este resultado es redundante, ya que esos 308 metabolitos totales son justamente los metabolitos definidos como objetivo, es decir, estos consorcios fueron construidos en base al alcance de ellos.

Tabla 4.3: Metabolitos totales que se vuelven producibles por *M. pyrifera* en presencia de los consorcios mínimos definidos previamente.

Objetivo metabólico	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Biomasa	252	-	-
Metaboloma	265	265	267
Producibles por el alga en el holobionte	308	308	-

## 4.5. Comparación con comunidad microbiana de *Ectocarpus siliculosus*

La comunidad bacteriana de *Ectocarpus siliculosus* se compone de 10 especies, cuyos GEMs fueron reportados por Burgunter-Delamare *et al.* (2020) [40]. En la Tabla 4.4 se muestran las reacciones y metabolitos de los modelos de esta comunidad. Estos modelos no poseen genes asociados.

Tabla 4.4: Cantidad de reacciones y metabolitos que poseen los GEMs de las especies de la comunidad bacteriana asociada a *Ectocarpus siliculosus*.

Organismo	Reacciones	Metabolitos	Clase
<i>Bosea sp. 5A</i>	2658	2982	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Erythrobacter sp. 430</i>	1962	2276	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Hoefflea sp. 430</i>	2621	2910	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Imperialibacter sp. R6</i>	2347	2657	<i>Cytophagia</i>
<i>Marinobacter sp. HK15</i>	2222	2565	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Rhizobium sp. 404</i>	2412	2721	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Roseovarius sp. 134</i>	2303	2637	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Roseovarius sp. 420</i>	2304	2637	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Sphingomonas sp. 361</i>	1979	2346	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Sphingomonas sp. 391</i>	2257	2616	<i>Alphaproteobacteria</i>
<b>Promedio</b>	<b>2307</b>	<b>2635</b>	

Se comparan las capacidades metabólicas de las comunidad completa asociada a *Macrocystis pyrifera*, estudiada anteriormente, y la comunidad de *Ectocarpus siliculosus*, que poseen especies distintas. Para ello, se calcula la cantidad de metabolitos totales que las comunidades son capaces de producir en el medio de cultivo determinado. Además, se calcula la producibilidad de los metabolitos encargados del crecimiento de biomasa de *M. pyrifera* y los del metaboloma de alga parda por ambas comunidades. Este resultado se presenta en la Figura 4.6, donde se muestra la cantidad de metabolitos producidos solo por la comunidad de *M. pyrifera*, solo por la de *E. siliculosus* y los producidos por ambas.

Es posible observar que del total de metabolitos producidos de crecimiento de biomasa y que conforman el metaboloma, más del 80% son producidos por ambas comunidades, lo que demuestra una similitud en los alcances metabólicos de ellas con respecto a los objetivos definidos. Por otro lado, estas comunidades producen cantidades distintas de metabolitos totales, donde la comunidad asociada a *M. pyrifera* produce un total de 1096, mientras que la comunidad de *E. siliculosus* produce 740. Esta diferencia puede deberse a la cantidad de especies bacterianas que conforman estas comunidades, ya que la comunidad de *M. pyrifera* tiene 20 bacterias y la de *E. siliculosus* 10.

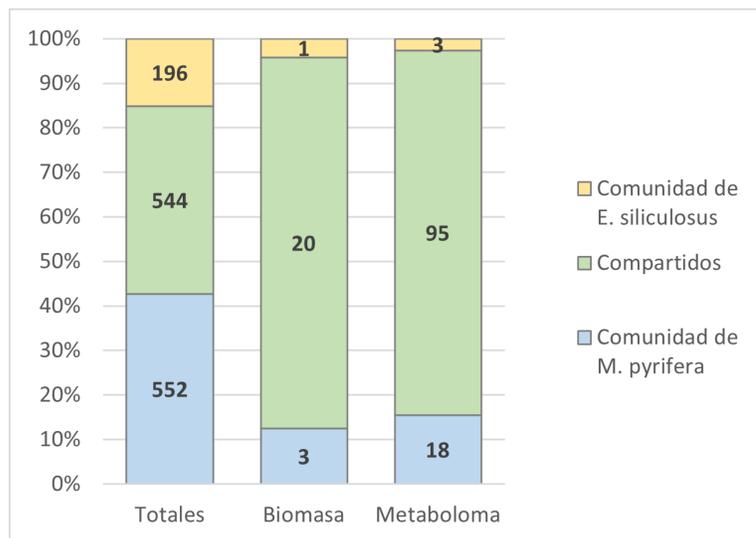
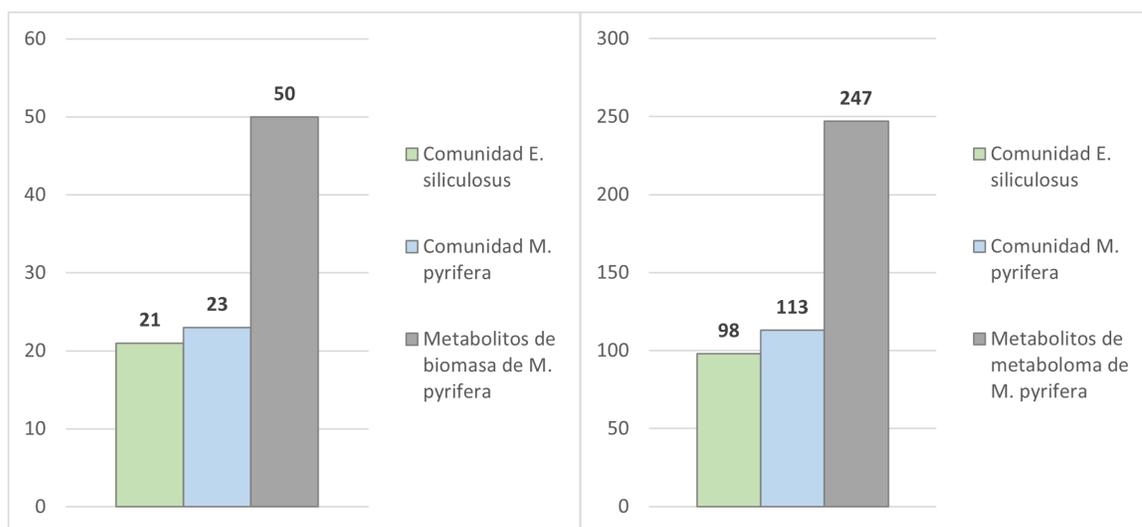


Figura 4.6: Cantidad de metabolitos totales, que conforman la biomasa de *M. pyriferá* y del metaboloma de alga parda que son producidos por las comunidades bacterianas de *M. pyriferá*, *E. siliculosus* y los que compartidos.

Además, en la Figura 4.7 se compara la cantidad de metabolitos producidos por las dos comunidades de estudio con respecto a los objetivos metabólicos de crecimiento de biomasa de *M. pyriferá* y producción del metaboloma de algas pardas [78]. En este primer caso, ambas comunidades alcanzan casi el 50 % de los metabolitos deseados, mientras que para el segundo objetivo alcanzan cerca de un 40 %. En un escenario ideal, el modelo del alga al que se encuentran asociadas debiera poder producir la cantidad de metabolitos faltantes con el fin de alcanzar el objetivo.



(a) Biomasa de *M. pyriferá*

(b) Metaboloma de alga parda

Figura 4.7: Comparación de la cantidad de metabolitos producidos por las comunidades bacterianas asociadas a *M. pyriferá* y *E. siliculosus* con respecto al objetivo, que corresponden a los metabolitos que conforman la biomasa de *M. pyriferá* (a) y el metaboloma de alga parda (b).

# Capítulo 5

## Discusiones

### 5.1. Modelos metabólicos a escala genómica

Los modelos metabólicos a escala genómica (GEMs) describen el conjunto de reacciones metabólicas de un organismo utilizando asociaciones gen-proteína-reacción (GPR). En este trabajo, se generaron GEMs de una comunidad bacteriana asociada al alga *M. pyrifera* con el fin de estudiar la complementariedad metabólica entre ellas, por lo que es necesario analizar la validez de los GEMs que se utilizan. Para ello, se comprueban los GEMs comparándolos con los de organismos con características similares disponibles en bibliografía en cuanto a su cantidad de genes, reacciones y metabolitos. Estas cantidades pueden dar un primer acercamiento de la capacidad metabólica del organismo, por lo que esta comparación podría ayudar a detectar inconsistencias. Además, se discute sobre las posibles fuentes de error que pueden presentar los procesos de obtención de MAGs, anotación estructural y funcional del genoma, y reconstrucción de GEMs.

#### 5.1.1. GEM de *Macrocystis pyrifera*

El modelo metabólico a escala genómica del alga *M. pyrifera* utilizado en este estudio corresponde a un borrador generado con Pathway Tools [45] a partir de la secuenciación de una muestra de alga macho extraída de la costa chilena realizado por el proyecto Phaeoexplorer. Al ser un GEM borrador, no ha sido curado manualmente ni intervenido con el proceso de *gap-filling*, por lo que podría tener reacciones erróneas o faltantes, resultando en un modelo incompleto. De todas formas, aunque pueden faltar componentes en el modelo, esta característica resulta relevante para este caso de estudio, ya que una reacción faltante en el modelo podría representar una potencial interacción metabólica con la comunidad bacteriana.

El GEM de *M. pyrifera* fue analizado con Memote [79], entregando que el modelo posee 4926 genes, 3821 reacciones y 3687 metabolitos (Tabla 4.1). Para comprobar estos valores, es posible compararlo con los GEMs de organismos con características similares, como lo son *Saccharina japonica*, *Ectocarpus siliculosus* y *Ectocarpus subulatus*, que son algas pardas pertenecientes a la misma subclase filogenética que *M. pyrifera*, Fucophycidae [94]. Con estos modelos se puede tener una aproximación de la cantidad de genes, reacciones y metabolitos esperables para que el modelo sea válido en este estudio.

*Saccharina japonica* pertenece al orden Laminariales al igual que *Macrocystis pyrifera*,

siendo estas algas las que presentan mayor cercanía filogenética en comparación con las mencionadas anteriormente [94]. El GEM de *S. japonica* fue curado manualmente y posee 5018 genes, 3348 reacciones y 3249 metabolitos en su versión actualizada [75]. La cantidad de genes presentes en el modelo de *M. pyrifera* es un 2% menor, mientras que de reacciones y metabolitos es superior en un 14% y 13% respectivamente, siendo del mismo orden de magnitud, a pesar de ser un GEM borrador sin curación o *gap-filling*.

Por otro lado, se encuentran las algas pardas *Ectocarpus siliculosus* y *Ectocarpus subulatus*, que pertenecen al orden filogenético Ectocarpales. El GEM de *E. siliculosus* posee 2281 genes, 1977 reacciones y 2132 metabolitos [37], y el de *E. subulatus* posee 2445 genes, 2074 reacciones y 2173 metabolitos [31], los cuales también fueron completados con reacciones adicionales en base a curación manual. El modelo de *M. pyrifera* posee más del doble de genes que estos GEMs, mientras que presenta cerca de 90% más de reacciones y cerca de un 70% más de metabolitos. Esta diferencia entre los GEMs podría estar relacionada a factores biológicos, debido a la variación filogenética por pertenecer órdenes distintos [94] y al tamaño del genoma, ya que especies de Ectocarpales poseen genomas más pequeños (127–290 Mbp) que especies de Laminariales (580–720 Mbp) [73], por lo que el GEM de *M. pyrifera* es consistente con lo esperado.

Además, estas diferencias también podrían estar relacionadas a las técnicas utilizadas en el procedimiento de secuenciación y/o anotación del genoma [75], pero se desconoce qué técnicas y herramientas se utilizaron en esas etapas para la generación del modelo de *M. pyrifera*, por lo que no se podría confirmar que las diferencias entre los modelos recaen en ellas. De todas maneras, las técnicas de secuenciación y las herramientas de anotación automática poseen variaciones asociadas a los equipos, algoritmos y bases de datos, que podrían omitir genes o introducir sobrepredicciones de funciones que generen errores y propagación de estos, modificando la información en los modelos metabólicos [65].

La información sobre la cantidad de genes, reacciones y metabolitos no es del todo comparable entre el GEM de *M. pyrifera* y los de las algas pardas mencionadas, ya que estos modelos incluyen procesos de curación manual y *gap-filling* que permiten añadir, eliminar o modificar reacciones al integrar datos de perfiles metabólicos con el fin de mejorar su calidad [31, 37, 75], mientras que el modelo de *M. pyrifera* utilizado es un borrador, generado sólo de forma automática, sin modificaciones manuales ni estudios de calidad. De todas maneras, estas cantidades son útiles para tener una primera aproximación de la validez de este modelo, el que se encuentra dentro de lo esperado al estar en el mismo orden que magnitud de los modelos de referencia, por lo que se considera válido para estudiar el comportamiento metabólico del holobionte en este trabajo.

### 5.1.2. GEMs de la comunidad bacteriana

Las especies que conforman la comunidad bacteriana asociada al alga parda *M. pyrifera* fueron identificadas y secuenciadas por colaboradores a partir *reads* catalogados como contaminantes del ensamble de genomas de *M. pyrifera* de muestras sin tratamiento con antibióticos extraídas de la costa chilena. Estos *reads* fueron reensamblados para construir los genomas bacterianos, generando MAGs.

En este trabajo los GEMs de las bacterias de la comunidad son generados en base a sus

MAGs, los que son anotados estructural y funcionalmente con Prokka [44], para luego construir los GEMs con la herramienta Pathway Tools [45]. Estos GEMs son borradores, por lo que podrían tener reacciones faltantes o erróneas, pero no son curados manualmente ni rellenados con *gap-filling* con el propósito de estudiar si las especies del holobionte pueden complementar sus redes metabólicas añadiendo componentes faltantes.

Los GEMs bacterianos generados son analizados con Memote [79], que entrega la cantidad de genes, reacciones y metabolitos (Tabla 4.1). El modelo con los valores más bajos es *Planctomyces bacterium GA0077529*, con 440 genes, 1098 reacciones y 1281 metabolitos, mientras que el modelo con los valores más altos es *Hyphomicrobiales bacterium*, con 5115 genes, 3825 reacciones y 3576 metabolitos, lo que muestra una gran diferencia genómica y metabólica entre ellos. Los modelos generados poseen cantidades de genes, reacciones y metabolitos en ordenes de magnitud distintos entre sí, mostrando que podría existir variabilidad genómica y metabólica entre las bacterias que conforman la comunidad. Para comprobar esta información se realiza una comparación con información de GEMs de organismos similares disponible en bibliografía.

En un trabajo anterior se reconstruyeron 5000 GEMs bacterianos [95], obteniendo que en promedio una bacteria contiene 691 genes metabólicos, 1308 reacciones y 792 metabolitos [95]. Este promedio oculta la variabilidad entre los tamaños de las redes, donde las más pequeñas poseen cerca de 200 reacciones y las más grandes 2400 [95]. La cantidad de genes, reacciones y metabolitos se relacionan de manera que a medida que crece el tamaño de las redes metabólicas, existe una tendencia asintótica del número de metabolitos con respecto al número de genes y reacciones [95]. Un comportamiento similar presentan los GEMs generados de la comunidad de estudio, donde estas tres cantidades son bajas o altas simultáneamente, por lo tanto, poseen una relación consistente con lo reportado por Machado *et al.*, 2018 [95].

La comunidad de estudio se compone de bacterias pertenecientes a los filos *Proteobacterias* y *Planctomyces* (Tabla A.1). Para tener una referencia de la cantidad de genes, reacciones y metabolitos que presentan los GEMs bacterianos según su clasificación taxonómica, se analiza un estudio que realizó una reconstrucción de 7300 GEMs de microorganismos intestinales humanos [96], donde se obtiene que las bacterias del filo *Proteobacterias* poseen hasta un máximo de 2000 genes, 3500 reacciones y 3500 metabolitos aproximadamente, mientras que las bacterias del filo *Planctomyces* poseen valores menores, presentando hasta 1000 genes, 1500 reacciones y 1000 metabolitos en sus modelos. Al comparar esta información con la de los GEMs de la comunidad de estudio (Tabla 4.1), es posible notar que se asemejan a estas cantidades, encontrándose dentro del rango esperado y donde las bacterias pertenecientes al filo *Planctomyces* presentan los valores más bajos, como ocurre por ejemplo con *Phycisphaera mikurensis NBRC 1026666* o *Mariniblastus fucicola*. Sin embargo, el GEM de *Hyphomicrobiales bacterium* es la excepción, ya que posee valores mayores a los esperados para bacterias del filo *Proteobacterias*, teniendo más del doble de los genes y sobrepasando por 300 reacciones las esperadas, lo que podría indicar que este modelo posee errores o está sobredimensionado.

Adicionalmente, se comparan los GEMs generados con los de una comunidad similar, correspondiente a las bacterias asociadas al alga parda *E. siliculosus*. Una investigación estudió el comportamiento metabólico de este holobionte, reportando los GEMs de 10 bacterias cul-

tivables asociadas a esta alga parda generados con Pathway Tools [40]. En promedio, estos modelos poseen 2306 reacciones y 2634 metabolitos, mientras que los GEMs de la comunidad de *M. pyrifer*a posee en promedio 2321 reacciones y 2389 metabolitos (Tabla 4.1) sin considerar la presencia de la bacteria *Hyphomicrobiales bacterium* debido a que su comportamiento inusual, mencionado anteriormente, podría afectar en este análisis, aumentando este promedio. Los promedios de la cantidad de reacciones y metabolitos que presentan los GEMs de ambas comunidades se encuentran dentro del mismo orden de magnitud, con una variabilidad de un 1% en reacciones y un 10% en metabolitos, lo que permite considerar aptos a los GEMs borradores generados para este trabajo, considerando que las características de los modelos es consistente con los datos consultados [95], donde los organismos procariontes no presentan un rango constante en el tamaño de su genoma y red metabólica. Además, se tiene en cuenta que pueden tener errores al no haber sido intervenidos con ningún proceso para aumentar su calidad, como curación manual.

Como se mencionó anteriormente, el modelo de la bacteria *Hyphomicrobiales bacterium* tiene un comportamiento inusual debido a que posee una cantidad de genes mucho mayor a la esperada [96], incluso sobrepasando los genes que presenta el GEM borrador del alga *M. pyrifer*a. En comparación con los otros GEMs bacterianos generados, presenta una cantidad de genes casi cuatro veces mayor al promedio. En cuanto a su cantidad de reacciones y metabolitos, no es tan distinta con respecto a la cantidad esperada (3500 cada una) [96], pero sí con respecto al promedio de los otros GEMs bacterianos, que supera en un 65% la cantidad de reacciones y en un 50% los metabolitos. Como el MAG de *Hyphomicrobiales bacterium* se anotó con la misma herramienta que los otros, al igual que la reconstrucción del GEM, se asume que el problema reside en el MAG, que podría haber presentado errores en su construcción, los que se propagan en la anotación y la construcción de GEMs.

Los MAGs son genomas construidos a partir de *reads* obtenidos de la secuenciación de una comunidad microbiana, que son ensamblados considerando su pertenencia a un mismo organismo, obteniendo aproximaciones de genomas [59]. Pueden contener partes de genomas de diferentes cepas, ya sea de la misma especie o de alguna especie diferente [97]. Aunque es poco probable que un MAG sea una secuencia genómica aislada, su validez como aproximación de genomas microbianos depende de su calidad [59]. En base a esto, es posible deducir que el genoma de la bacteria *Hyphomicrobiales bacterium* presenta estas heterogeneidades, ya que la alta cantidad de genes podría indicar que posee genomas de varias bacterias, ya sea pertenecientes al orden *Hyphomicrobiales* u otras especies que forman parte de la comunidad. A pesar de esto, el GEM generado de esta bacteria se considera apto para este trabajo, teniendo en cuenta que podría contener información metabólica de otras especies que forman parte comunidad relevante para el estudio del holobionte.

La comunidad del holobionte utilizada es una combinación entre la comunidad bacteriana asociada a un alga *M. pyrifer*a hembra y una asociada a alga macho, donde identificaron especies en común, que corresponden a *Labrenzia sp. DG1229*, *Nitratireductor sp. XY-223* y *Phycisphaera mikurensis NBRC 102666*, por lo que la comunidad del holobionte posee estas especies repetidas. Los GEMs de estas especies no presentan las mismas cantidades de genes, reacciones y metabolitos (Tabla 4.1). Se muestra que los dos GEMs de *L. sp. DG1229* y de *N. sp. XY-223* son distintos en un 2% y ~1%, mientras que los dos GEMs de *P. mikurensis NBRC 102666* son significativamente distintos, ya que uno posee casi el doble de genes y

un 20 % más de reacciones y metabolitos que el otro. Como estos GEMs fueron generados mediante la misma metodología, es decir, anotación con Prokka y construcción de GEMs con Pathway Tools, es posible deducir que estas diferencias provienen de los MAGs.

Como se mencionó anteriormente, los MAGs al ser construidos a partir del ensamble de un conjunto de *reads* de una comunidad, presentan heterogeneidades genómicas, esto es, tener fragmentos de especies combinadas [97, 98]. Con respecto a los GEMs de *L. sp. DG1229* y de *N. sp. XY-223*, sus diferencias son bastante bajas en comparación con los GEMs de *P. mikurensis NBRC 102666*. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la obtención de sus MAGs, que fueron contruidos a partir de *reads* contaminantes del ensamble del genoma de *M. pyrifer*, por lo que es posible que no se hayan recuperado suficientes fragmentos para formar genomas bacterianos más completos. Por otro lado, el ensamble de estos *reads* puede tener fallas, resultando en una mala agrupación de ellos al incorporar o ignorar algunos *reads* de forma errónea [99]. Además, para identificar la taxonomía de las especies de la comunidad se realiza la alineación de secuencias, en donde se comparan las obtenidas con secuencias de referencia presentes en bases de datos para buscar compatibilidades [100]. La etapa de identificación podría haber sido una fuente de error en los MAGs de *P. mikurensis NBRC 102666*, donde sus secuencias fueron identificadas erróneamente como la misma especie. De todas formas estos MAGs fueron construidos con secuencias pertenecientes a la comunidad bacteriana de estudio, por lo que aportan información genómica y metabólica de esta sin importar la especie a la que se encuentran asociados estos MAGs.

### 5.1.3. Herramientas computacionales

En este apartado se hace una revisión computacional de las etapas de anotación estructural y funcional de los genomas y la reconstrucción de GEMs, donde se muestran las principales fuentes de error y herramientas computacionales que se utilizan para estudios similares a este trabajo, validando el uso de las herramientas Prokka y Pathway Tools para el estudio metabólico del holobionte.

#### 5.1.3.1. Prokka para la anotación de los genomas bacterianos

Los MAGs de las bacterias que forman parte de la comunidad de estudio debieron ser anotados estructural y funcionalmente para poder construir sus respectivos modelos metabólicos. La anotación estructural consiste en identificar los genes que componen el genoma y la anotación funcional se encarga de conocer la función que cumplen con respecto a la codificación de enzimas metabólicas [44, 64]. Un proceso de anotación automática realiza una predicción de genes utilizando herramientas bioinformáticas que mapean secuencias del genoma en reacciones metabólicas mediante el uso de bases de datos, creando un borrador del genoma [64, 70]. La calidad de la anotación automática depende de las herramientas computacionales implementadas y las bases de datos consultadas, las que podrían predecir de forma errónea la función que cumplen los genes debido a errores presentes en bases de datos o la existencia de genes cuya secuencia sólo puede anotarse hipotéticamente por tener una función desconocida [64].

Esta heterogeneidad en la calidad puede mitigarse combinando múltiples herramientas y bases de datos para aumentar la cobertura y la cantidad de información que contiene el genoma resultante de la anotación [64, 101]. Esto es lo que logra la herramienta Prokka [44], ya que coordina un conjunto de herramientas existentes para lograr una anotación más

completa de secuencias bacterianas genómicas [44], que son Prodigal [102] para identificar las secuencias codificantes, RNAmmer [103] para los genes de ARN ribosomal, Aragorn [104] para los genes de ARN de transferencia, SignalP [105] para los péptidos de señalización e Infernal [106] para las secuencias no codificantes. Además, para predecir la codificación de los genes Prokka utiliza varias bases de datos de manera jerárquica, comenzado de la que entrega información más específica a la más general, donde se encuentra UniProt [66], RefSeq (NCBI Reference Sequence Database) [107], Pfam [67] y TIGRFAM [108], lo que ayuda a reducir errores en la anotación.

Existen otras herramientas de anotación automática, dentro de las que destacan RAST [109] y xBASE2 [110], que son bastante usadas por sus buenos resultados, pero tienen tiempos de espera entre unas horas y un día, lo que puede ralentizar el trabajo si se trata de anotar una comunidad microbiana, mientras que Prokka puede anotar un genoma bacteriano en aproximadamente en 10 minutos [44]. Una comparación entre estas tres herramientas resultó en que Prokka produce una anotación similar o incluso mejor que RAST y xBASE2 en cuanto a la cantidad de secuencias anotadas [44].

Por lo tanto, en cuanto a la anotación realizada a los MAGs de la comunidad bacteriana de estudio es posible tener certeza de que el resultado es oportuno y se espera que no posea grandes fuentes de error que puedan ser propagadas a la etapa de generación de GEMs, debido a que Prokka combina múltiples bases de datos y herramientas para reducir errores y asegurar una anotación lo más completa posible.

#### 5.1.3.2. Pathway Tools para la generación de GEMs

Los modelos metabólicos a escala genómica (GEM) describen un conjunto completo de reacciones metabólicas de un organismo utilizando asociaciones gen-proteína-reacción (GPR), que se formulan en base a la información del genoma anotado [41]. La reconstrucción de un GEM debe considerar un gran número de asociaciones GPR y muchas otras fuentes de información, por lo que se han desarrollado herramientas para la reconstrucción automática con el fin de aligerar el proceso [36, 69]. Entre ellas se encuentran CarveMe [95] y MetaDraft [111]), que utilizan la base de datos BiGG [112], RAVEN [113] y Pathway Tools [45], basadas en MetaCyc [80], AuReMe [114], que utiliza las bases de datos MetaCyc y BiGG; Merlin [115], basada en la base de datos KEGG [71], ModelSEED [57], que posee su propia base de datos, entre otros softwares.

Un estudio realizó una evaluación sistémica de las 7 herramientas de reconstrucción de GEMs [69], incluyendo Pathway Tools, herramienta utilizada en el presente trabajo. El estudio comparó las herramientas en base a distintos criterios, donde Pathway Tools destaca por ser una de las herramientas más rápidas para generar modelos, junto con ModelSEED y CarveMe, teniendo un gran potencial para estudios a gran escala, como el caso de una comunidad microbiana. Además, los modelos construidos con Pathway Tools poseen una mayor cantidad de reacciones debido a que incluye transporte y reacciones espontáneas.

Por estas características, Pathway Tools demuestra ser una herramienta adecuada para construir los GEMs de las bacterias de la comunidad de este estudio. Además, la base de datos que utiliza, MetaCyc, está curada manualmente, lo que entrega una mayor confianza de las redes obtenidas [77]. Esta herramienta ha sido utilizada exitosamente para la generación

de GEMs de comunidades bacterianas en varios estudios, como es el caso de la construcción de una comunidad de 72 cepas bacterianas de *Ectocarpus subulatus* [32], el estudio de la complementariedad metabólica entre *Ectocarpus siliculosus* y una comunidad de 10 bacterias [40], y el estudio de las interdependencias metabólicas que existen en las raíces de *Arabidopsis thaliana* con una comunidad de 193 [77]. Por otro lado, el GEM de *M. pyrifera* proporcionado para realizar este trabajo también fue construido con Pathway Tools, por lo tanto, tener los GEMs de la comunidad generados con la misma herramienta permite tener consistencia y evitar errores al momento de integrarlos para estudiar la complementariedad metabólica, ya que al ser creados bajo la misma lógica, se tiene certeza de que las reacciones metabólicas tienen el mismo comportamiento y que sus componentes se encuentran con los mismos identificadores, además, las reacciones espontáneas y de transporte predichas por la herramienta se basan de la misma información.

Sin embargo, en un proceso automático de reconstrucción de GEMs la calidad de las redes puede ser variable debido a que depende de la anotación del genoma y de la predicción de las funciones metabólicas basados en distintas bases de datos [69, 116]. La herramienta de reconstrucción de GEM podría no encontrar un gen en la base de datos de referencia o encontrarlo, pero no tener ninguna reacción asociada a ese gen [69]. También, pueden agregar otras reacciones en función de otros criterios, como la probabilidad de que exista una ruta particular, pero depende estrechamente de la base de datos utilizada, la que podría tener información errónea o no confiable del organismo de estudio o uno similar con el cual comparar [69]. Estos problemas resultan en reacciones erróneas o faltantes en el GEM construido, por lo que es importante considerar la realización de una curación manual o *gap-filling* posterior. En este caso, como se integra un conjunto de GEMs para estudiar su complementariedad, se propone a realizar estas etapas una vez incorporadas las reacciones y/o metabolitos aportados por la comunidad con el fin de mejorar la calidad del sistema.

Además, los GEMs vinculan los metabolitos y reacciones metabólicas con identificadores (ID), que son diferentes en cada base de datos, es decir, una misma reacción o metabolito se puede almacenar en dos bases de datos con dos identificadores diferentes [69]. Algunas bases de datos pueden almacenar reacciones o metabolitos específicos o de manera genérica, característica que Pathway Tools presenta comúnmente, que representan un grupo de reacciones o metabolitos que cumplen con características en común. Esto significaría, por ejemplo, que un conjunto de reacciones se puede encontrar una base de datos con distintos IDs, mientras que en otra base de datos están como una sola. Esto puede ser un problema al momento de comparar GEMs con bibliografía o al generar conjuntos de nutrientes (*seeds*) o metabolitos objetivo (*targets*), ya que pueden haber diferencias en la compatibilidad. Para mitigar el problema se puede utilizar MetaNetX [117], que es un repositorio de GEMs y rutas bioquímicas que permite mapear identificadores en las distintas bases de datos, lo que ayuda a reconocer componentes y migrar entre las bases de datos.

## 5.2. Capacidad metabólica del holobionte

Los modelos metabólicos a escala genómica representan todas las reacciones esperadas en un organismo asociadas a su genoma, las que se enlazan formando rutas metabólicas y permiten describir su capacidad metabólica. Para simular la producción de metabolitos de una red

se requiere de un conjunto de metabolitos de sustrato, llamados *seeds* [38], que representan la disponibilidad de nutrientes [77]. Por otro lado, un metabolito se define como producible cuando los reactantes de la reacción a la que pertenece son producibles también, por lo tanto, la producción de metabolitos totales del organismo se logra gracias al ingreso de los sustratos a la red, que la recorren haciendo producibles los metabolitos de las reacciones intermedias hasta llegar al producto final [38, 77, 118].

La disponibilidad de nutrientes restringe la producción metabólica representada por la red debido a que determina qué reacciones pueden activarse, por lo tanto, para estudiar la capacidad metabólica mediante GEMs es fundamental utilizar un medio de cultivo adecuado para el organismo de estudio [77]. En este trabajo se estudia la capacidad metabólica del holobionte conformado por *M. pyrifer* y sus bacterias asociadas utilizando un *seed* de 48 metabolitos (Tabla H.1), creado con una estimación del entorno de *M. pyrifer* y los compuestos presentes en el medio Provasoli [37], un medio utilizado comúnmente para el cultivo de algas marinas. El medio Provasoli ha sido utilizado para estudiar los GEMs de las algas pardas *Ectocarpus siliculosus* [37], *Saccharina japonica* [75] y *Cladosiphon okamuranus* [75], como también para el estudio de la complementariedad metabólica entre el alga *Ectocarpus siliculosus* y un grupo de 10 bacterias, tanto para el cultivo *in vivo* como para la predicción metabólica *in silico* utilizando GEMs [40].

La complementariedad metabólica entre distintos organismos se puede estudiar integrando sus GEMs, en donde se enlazan las redes metabólicas para permitir la activación de más reacciones, a través de la adición de reacciones faltantes o de metabolitos intermedios [39]. El beneficio de esta interacción metabólica se ve reflejado en el alcance metabólico de las redes, aumentando la cantidad de metabolitos producibles bajo determinadas condiciones nutricionales [72]. La herramienta MiSCoTo permite realizar este análisis a partir de los GEMs de los organismos y un conjunto de nutrientes (*seeds*), estudiando el alcance metabólico de un huésped al interactuar con simbiontes [38].

En este trabajo se estudia la complementariedad metabólica entre el alga *M. pyrifer* y su comunidad bacteriana con el uso de MiSCoTo, obteniendo que el alga es capaz de producir 702 metabolitos de manera individual a partir del conjunto de nutrientes mencionado anteriormente, mientras que en presencia de la comunidad bacteriana se añaden 308 nuevos metabolitos, lo que significa un aumento de 44 % en su alcance metabólico total, mostrando que existe un potencial beneficio con la interacción entre los organismos del holobionte. Un comportamiento similar se presentó en el estudio de la complementariedad metabólica del alga *E. siliculosus* y su comunidad bacteriana compuesta por 10 bacterias [40], donde se añaden 160 nuevos metabolitos al alcance del alga, al igual que para el alga *E. subulatus* y su comunidad de 81 bacterias, donde añaden 590 metabolitos a alcance metabólico del alga [58]. De desconoce la producción total de metabolitos de los GEMs de estas algas.

Si bien este comportamiento permite verificar la existencia de interacciones metabólicas en el holobionte que beneficien la producción metabólica del alga, no significa que necesariamente vaya a ocurrir *in vivo*, debido a que la producibilidad de los metabolitos puede requerir la presencia y activación de mecanismos de excreción o absorción que no están siendo considerados en los modelos [40]. Por otro lado, el algoritmo que utiliza MiSCoTo no considera la cinética, la estequiometría de las reacciones, la abundancia de los organismos participantes, el

agotamiento de nutrientes, ni la acumulación de metabolitos, además, para esta predicción se considera que las redes del holobionte se combinan formando un metaorganismo, ignorando las reacciones de transporte y los intercambios entre compartimentos [38]. Por lo tanto, el alcance metabólico de los organismos podría no tener un comportamiento biológico consistente con la realidad, pero sí a nivel computacional.

Es necesario reiterar que los GEMs borradores utilizados para predecir las complementariedades metabólicas pueden estar parcialmente erróneos e incompletos debido a que se basan en predicciones y anotaciones automáticas para su construcción, que podrían omitir genes o introducir sobrepredicciones de funciones. El proceso de *gap-filling* es necesario para mejorar la calidad de un GEM al añadir reacciones faltantes o corregir errores, pero es posible que este proceso oculte posibles dependencias metabólicas entre organismos, por lo que, para este estudio, utilizar GEMs borradores podría entregar mejores resultados acerca de las interacciones en las redes, pero con el riesgo de tener fallas debido a la reconstrucción.

Para estudiar más a fondo la capacidad metabólica alcanzada por el alga *M. pyrifera* en su asociación con la comunidad bacteriana se definieron dos conjuntos de metabolitos objetivo, correspondientes a la biomasa de *M. pyrifera* y los que forman parte del metaboloma de algas pardas. Para estudiar la validez de un GEM, varios estudios han definido que un modelo es funcional cuando es capaz de generar biomasa [37][75], por lo que analizar la producción de metabolitos de biomasa es clave para conocer el estado del GEM y el efecto tiene la integración de la comunidad. Por otro lado, el metaboloma describe el perfil químico del organismo de estudio, por lo que analizar la influencia de la comunidad bacteriana sobre estos metabolitos proporciona información valiosa sobre sus supuestas interacciones [119]. Dentro de los metabolitos estudiados, se presta especial atención a las vitaminas, debido a que son fundamentales para el metabolismo de las algas, al actuar como factores de crecimiento [120]. Además, son de gran interés para el consumo humano por su efecto nutricional [120].

### 5.2.1. Producción de metabolitos encargados de crecimiento de biomasa de *M. pyrifera*

El crecimiento de *M. pyrifera* es un indicador fundamental para validar la funcionalidad de un GEM [37], debido a que es la función principal que describe el desarrollo de un organismo. El GEM borrador del alga parda *E. siliculosus* [37] es capaz de producir el 50% de los metabolitos definidos para el crecimiento de biomasa, de los que se encuentran aminoácidos, azúcares, polioles y ácidos grasos, y mostró dificultades con la producción de varios ácidos grasos poliinsaturados, manitol y los aminoácidos esenciales metionina y tirosina [37]. Asimismo, los GEMs borradores de las algas *S. japonica* y *C. okamuranus* [75] podían producir muy pocos de los metabolitos de biomasa definidos, compuesta por cerca de 70 y 30 metabolitos respectivamente. Esto indica que para los tres borradores se mostró que las anotaciones contenidas en la base de datos del genoma no eran suficientes para proporcionar una red funcional, donde hay metabolitos que no son producible. Para mejorar este problema, estos modelos fueron corregidos mediante *gap-filling* y curación manual, permitiendo que el GEM de *E. siliculosus* sea capaz de producir los 51 metabolitos de biomasa [37], mientras que los GEMs de *S. japonica* y *C. okamuranus* sólo 12 y 7 metabolitos no pueden ser producidos por sus GEMs, donde se encuentran principalmente ácidos grasos [75].

Para estudiar el crecimiento de *M. pyrifera*, fueron definidos 50 metabolitos (Tabla B.1) a partir de evidencia bibliográfica <sup>7</sup>. De ellos, el GEM borrador de *M. pyrifera* es capaz de producir 23 metabolitos de manera individual en el medio de cultivo definido (Tabla H.1), entre los que se encuentran 4 ácidos grasos, 5 ácidos nucleicos, 13 aminoácidos y una vitamina. Los ácidos grasos producibles son el ácido mirístico, ácido palmitoleico, palmitato y ácido esteárico, que también fueron reportados como producibles por los GEMs curados de *E. siliculosus* [37], *S. japonica* [75] y *C. okamuranus* [75]. En cuanto a los aminoácidos, el modelo de *M. pyrifera* puede producir 13, que forman parte de los 20 aminoácidos codificados en el genoma, como alanina y prolina [121]. Estos 13 aminoácidos también fueron reportados como producibles por los modelos antes mencionados. La única vitamina que *M. pyrifera* es capaz de producir es  $\delta$ -tocoferol, que no es parte de los metabolitos de biomasa estudiados en los modelos de *E. siliculosus*, *S. japonica* y *C. okamuranus*. Se ha estudiado la presencia  $\delta$ -tocoferol en 21 algas marinas, resultando que las algas pardas son las que poseen mayor contenido [81] y forma parte del valor funcional y nutricional de *M. pyrifera*, donde se ha indicado que posee una baja cantidad con respecto a otros tocoferoles [121].

A diferencia de los modelos de algas mencionados anteriormente, el borrador de *M. pyrifera* en este estudio no se modifica con *gap-filling*, con el fin completar sus redes metabólicas mediante funciones de su comunidad bacteriana asociada. Como resultado, la presencia de la comunidad permite añadir 5 compuestos al alcance metabólico de *M. pyrifera*, que corresponden a ácido oleico, histidina, lisina, manitol y  $\beta$ -caroteno.

A continuación se realiza un análisis de las redes metabólicas de los metabolitos de biomasa que son producidos y no producidos por el alga en presencia de la comunidad bacteriana, teniendo como referencia la producción de estos metabolitos en los GEMs de *Ectocarpus siliculosus* [37], *Saccharina japonica* y *Cladosiphon okamuranus* [75], y los estudios de complementariedad metabólica, unos entre las algas *E. siliculosus* y *E. subulatus* con sus respectivas comunidades bacterianas.

#### 5.2.1.1. Metabolitos de biomasa que se vuelven producibles por el alga en el holobionte

El ácido oleico es el principal ácido graso C18 presente de las algas pardas [81] y el segundo más abundante en el alga *M. pyrifera*, seguido del ácido linoleico [121, 122], que son importantes para la salud humana y nutrición de peces ya que no pueden ser sintetizados por estos organismos [4]. En el GEM de *M. pyrifera* la producción de ácido oleico ocurre de la degradación de ácidos grasos más complejos, como glicerol oleato y ergosteril oleato, sin embargo, estos no son producibles por el alga ni las bacterias. La reacción en la que está ocurriendo la interacción para lograr su producción se muestra en la vía de la Figura K.1, que corresponde a una reacción en la que se libera el ácido oleico unido a un acetil-CoA a partir de la hidrólisis del compuesto oleoil-CoA, el cual no es producible por el modelo del alga, pero sí por todos los GEMs de la comunidad bacteriana, por lo tanto, aportan este compuesto a la red metabólica del alga.

El GEM de *E. siliculosus* es capaz de producir ácido oleico después de la adición manual

---

<sup>7</sup> Espinoza M., Comunicación personal, 2023

de una reacción, que permite obtenerlo como producto del oleoil-ACP [37], siendo análoga a la reacción que posee el GEM de *M. pyrifera* para producir este metabolito, mientras que los GEMs de *S. japonica* y *C. okamuranus* también son capaces de producir ácido oleico después ser completados con *gap-filling* [75]. Por otro lado, los estudios de complementariedad metabólica de las algas *E. siliculosus* y *E. subulatus* con su respectiva comunidad bacteriana revelan que el ácido oleico es producido gracias a la presencia de las bacterias, en particular de *Marinobacter sp.* y *Bosea sp.* mediante oleoil-CoA [40, 58].

Los aminoácidos que se vuelven producibles por *M. pyrifera* en presencia de bacterias son la histidina y lisina, que forman parte de los aminoácidos esenciales que componen al alga *M. pyrifera* [121, 123]. La histidina se produce mediante la vía metabólica de síntesis de histidina (Figura K.2) [80]. Esta vía se encuentra incompleta en el GEM de *M. pyrifera*, debido a que le falta la reacción que transforma el L-histidinol-P en histidinol, por lo tanto, no es viable llegar a producir histidina. Esta reacción es aportada por la comunidad bacteriana, que se encuentra definida en todos los GEMs, lo que permite completar la vía metabólica para sintetizar histidina.

Histidina es producible por el GEM de *E. siliculosus* después de la adición manual la misma reacción faltante en el modelo de *M. pyrifera* [37], mientras que los GEMs de *S. japonica* y *C. okamuranus* también son capaces de producir histidina después ser completados con *gap-filling* [75]. Por otro lado, los estudios de complementariedad metabólica de *E. siliculosus* y *E. subulatus* con su respectiva comunidad bacteriana revelan que la histidina es producida gracias a la presencia de las bacterias a partir del aporte de histidinal [40, 58]. Además, en otro estudio se hizo una fusión de los GEMs de *E. siliculosus* y la bacteria *Ca. P. ectocarpi* [17] en donde la histidina se vuelve producible al añadir las redes de la bacteria. Esta predicción fue comprobada con un cultivo *in vivo* [40], donde el alga tratada con antibióticos no produce el aminoácido y el alga inoculada con las bacterias *Hoeflea*, *Imperialibacter* y *Sphingomonas* sí lo produce. Esta evidencia permite tener un respaldo empírico de que la producción de histidina se logra gracias a la interacción metabólica en el holobionte de *Ectocarpus*.

La lisina se produce mediante la vía metabólica de biosíntesis de lisina a partir de de meso-diaminopimelato (Figura K.3) [80]. El GEM del alga no posee dos reacciones necesarias en esta vía, por lo que se encuentra incompleta. Estas reacciones faltantes son proporcionadas a la red por todos los GEMs de las bacterias, logrando la producción de lisina. Este aminoácido es producido por el GEM borrador de *E. siliculosus* [37], es decir, no requirió ser intervenido para alcanzar su producción, mientras que el GEM de *S. japonica* alcanzó su producción después de la intervención con *gap-filling* [75]. Los estudios de complementariedad metabólica de *E. siliculosus* y *E. subulatus* con sus comunidades indican que la lisina se vuelve producible gracias a la presencia de bacterias gracias al aporte de meso-diaminopimelato [40, 58], lo que es consistente con los resultados obtenidos, donde este precursor se alcanza gracias a la comunidad bacteriana.

El manitol es uno de los carbohidratos más abundantes en *M. pyrifera*, siendo una de las principales reservas para almacenar carbono directamente de fructosa-6-fosfato [3, 37] y posee un gran interés como fuente de energía para la producción de biocombustibles a través de su fermentación, junto con el alginato [8]. Este carbohidrato forma parte del ciclo del manitol

(Figura K.4), donde es sintetizado a partir de manitol-1P, compuesto que es producido a partir de fructosa-6P [80]. Esta vía se encuentra incompleta en el modelo de *M. pyrifera* debido a que no tiene definida la reacción para producir manitol-1P, a pesar de ser producible la fructosa-6P, por lo que la producción de manitol se ve interrumpida. Esta reacción es aportada por el GEM de *Hyphomicrobiales bacterium*, donde se encuentra definida en todos los GEMs, lo que permite completar la vía metabólica.

Manitol es producible por el GEM de *E. siliculosus* después de la adición manual de una reacción que transforma el manitol-1P en manitol, [37], reacción que es parte del ciclo del manitol y sí se encuentra definida en el modelo de *M. pyrifera*, mientras que los GEMs de *S. japonica* y *C. okamuranus* también son capaces de producir manitol después ser completados con *gap-filling* [75]. El estudio de complementariedad metabólica entre *E. subulatus* y sus bacterias reportó que el manitol se vuelve producible gracias a la presencia de la comunidad [58], al igual que el resultado obtenido en este trabajo, lo que pone en evidencia que la presencia de manitol podría ser resultante de la comunidad bacteriana.

El único compuesto en la categoría de “otros” que es producible por *M. pyrifera* corresponde a  $\beta$ -caroteno, un pigmento fotoprotector que se encuentra en abundancia en las algas pardas encargado de su color café [121, 124]. Los carotenoides poseen efectos positivos para la salud humana, en particular, debido a sus propiedades antioxidantes [125]. El  $\beta$ -caroteno se produce mediante la vía metabólica de síntesis de carotenoides, donde es producido a partir de  $\gamma$ -caroteno (Figura K.5). El GEM de *M. pyrifera* tiene esta vía metabólica incompleta, por lo que es complementada con las redes metabólicas de *Sphingorhabdus sp. M41* para lograr sintetizar el  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, este resultado podría no estar correcto, ya que el alga no posee alguna reacción en que se pueda producir  $\beta$ -caroteno, incluso este metabolito se encuentra definido sólo en el modelo de *S sp. M41* y no en el modelo de *M. pyrifera*. Además, las reacciones del alga y *S. sp. M41* que llegan a este producto no se encuentran etiquetadas por la base de datos MetaCyc como parte de la vía metabólica, pero son análogos.

Los GEMs de *S. japonica* y *C. okamuranus* son capaces de producir  $\beta$ -caroteno al añadir manualmente las reacciones que componen la vía metabólica de síntesis de este metabolito contenidas en MetaCyc, donde se ha evidenciado por anotación de genomas de algas pardas que el licopeno es el principal componente que inicia la síntesis de  $\beta$ -caroteno [75], mientras que en *M. pyrifera* es el  $\beta$ -zeacaroteno. El holobionte de *E. subulatus* vuelve producible el  $\beta$ -caroteno gracias a la presencia de la comunidad bacteriana, pero no se especifican las reacciones utilizadas para lograrlo [58].

La producción adicional de metabolitos de biomasa de *M. pyrifera* gracias a la presencia de su comunidad bacteriana asociada permite evidenciar una potencial interacción entre los organismos del holobionte que favorece la producción de metabolitos necesarios para el crecimiento del alga. Acá se detallan los puntos clave de interacción entre los organismos, estudiados a partir de sus GEMs construidos, en donde las bacterias complementan el metabolismo del alga adicionando metabolitos y reacciones faltantes. El metabolito faltante en la red del alga es oleil-CoA para la producción de ácido oleico, mientras que las reacciones faltantes son la que transforma diaminopimelato en meso - diaminopimelato (EC 5.1.1.7), para la producción de lisina, L-histidinol-P en histidinol (EC 3.1.3.15), para la producción de histidina, fructosa-6P en manitol-1P (EC 1.1.1.17), para la producción de manitol, y

neurosporeno en  $\beta$ -zeacaroteno (EC 1.3.99.3) para la síntesis de  $\beta$ -caroteno. Además, existe evidencia de estas interacciones metabólicas estudios *in silico* con especies de *Ectocarpus* y sus comunidades bacterianas asociadas [40, 58], que permite tener un respaldo de estos resultados. Destaca un estudio *in vivo* entre estos organismos que prueba que la histidina es producida gracias a la inoculación con bacterias, siendo un incentivo para que se realicen a futuro más pruebas *in vivo* para el estudio de estas interacciones.

### 5.2.1.2. Metabolitos de biomasa no producidos por el alga en el holobionte

A pesar de la complementariedad metabólica existente entre los GEMs de *M. pyrifera* y su comunidad bacteriana, hay 22 metabolitos de biomasa que no son producibles. Esto puede suceder debido a distintas razones, como que los metabolitos no se encuentran definidos en los modelos, por lo que su producción es inviable, o ausencia de reacciones o metabolitos precursores presentes en el sistema.

Los dos ácidos grasos no producibles por *M. pyrifera* son los ácidos linoleico y linolénico, que son poliinsaturados de C18. En el GEM de *M. pyrifera* ambos ácidos grasos son sintetizados a partir de la hidrólisis de un acetil-CoA, donde se libera el ácido graso que tiene unido, en este caso, provienen de la hidrólisis de linoleoil-CoA. Este metabolito no es producible por ninguno de los GEMs, evitando que esta vía se active. En comparación, el GEM borrador de *E. siliculosus* es capaz de producir estos dos ácidos grasos previo a la curación manual [37], mientras que los GEMs de *S. japonica* y *C. okamuranus* producen solo ácido linoleico. Por lo tanto, la no producibilidad de estos ácidos grasos se debe a la ausencia de linoleoil-CoA, compuesto que podría ser requerido en el medio de cultivo como cofactor o requerir la adición de una nueva red metabólica para su síntesis. En las algas pardas predominan los ácidos grasos C18 [126], siendo el ácido linoleico el segundo más abundante en *M. pyrifera*, seguido de ácido oleico [121, 122], en cambio los niveles de ácido linolénico son bajos, incluso no pudo ser detectado en un estudio sobre la composición lipídica de *M. pyrifera* [122].

En cuanto a los aminoácidos, *M. pyrifera* no es capaz de producir cisteína ni metionina, que conforman el perfil de los 17 aminoácidos de esta alga [121, 123]. En el GEM de *M. pyrifera* la cisteína es producible en tres vías metabólicas distintas de biosíntesis de cisteína, todas ellas incompletas. Una de ellas (Figura K.9) requiere de cistationina, que solo se puede producir a partir de cisteína en otra reacción perteneciente a la vía de degradación de metionina, y no es producible por bacterias. A otra vía (Figura K.8) le falta una reacción, la cual no es aportada por la comunidad, donde se produce CysO-S-cisteína a partir de 3-P-serina, que es precursor de la cisteína. En cuanto a metionina, se produce en la vía metabólica de biosíntesis de metionina (Figura K.11) que se encuentra incompleta debido se requiere el ingreso de cisteína a la vía para producir cistationina, que sintetiza homocisteína para luego obtener metionina. Las vías metabólicas de cisteína y metionina se encuentran acopladas, ya que la síntesis de metionina requiere la entrada de cisteína y la vía de síntesis de cisteína proviene de la degradación de metionina, debido a que se produce homocisteína para el inicio de la vía.

La cisteína y metionina son aminoácidos de azufre, ya que contienen sulfhidrilo, por lo tanto, para la síntesis de estos compuestos se requiere previamente asimilar el sulfato [127]. De la vía metabólica de asimilación de sulfato se produce ácido sulhídrido, que se incorpora a una de las vías de biosíntesis de metionina (Figura K.12) y de biosíntesis de cisteína (Figura K.10) [80]. La vía metabólica para la asimilación de sulfato, mostrada en la Figura K.13, se

encuentra definida en el GEM de *M. pyrifera* y en una de sus reacciones posee una entrada de una tiorredoxina, una proteína transportadora de electrones que no puede ser producida por ninguno de los GEMs del holobionte. La ausencia de esta proteína genera que la vía de asimilación de sulfato no se está activando. Como una de las vías de biosíntesis de metionina y cisteína dependen de ácido sulhídrido, se deduce en esta vía podría ser la razón por la que la metionina y cisteína no se logran producir.

Por otro lado, en los GEMs estudiados la metionina también se transforma en S-adenosilmetionina [128], que tampoco puede ser producido. Esta molécula participa principalmente en metilación, que se relaciona con varios procesos como la expresión genética y fluidez de la membrana, y en síntesis de poliamina, componente que es requisito para el crecimiento celular [129, 130]. El hecho de que tanto la metionina como la cisteína no sean producibles por los GEMs que conforman el holobionte es una señal de que podrían haber reacciones y/o metabolitos faltantes en el sistema, incluyéndolo en el *seed*, debido a que su presencia es necesaria para representar procesos metabólicos importantes relacionados con el crecimiento y regulación metabólica [127]. En comparación, los GEMs de *E. siliculosus* y *S. japonica* son capaces de producir cisteína y metionina luego de ser curados manualmente y modificados con *gap-filling* [37, 40].

Los carbohidratos de biomasa de *M. pyrifera* no producibles son el alginato y la callosa. Estos metabolitos se encuentran comúnmente en las sustancias intracelulares y las paredes celulares de las algas pardas, siendo uno de los polisacáridos estructurales más importantes de las algas pardas [37, 124, 131]. Tanto el alginato como la callosa no se encuentran definidos en ninguno de los GEMs del holobionte, por lo que su producción es inviable. MetaCyc posee una vía metabólica para la síntesis de alginato algal y bacteriano, que inicia con GDP-manosa, y otra para la síntesis de 1,3- $\beta$ -D-glucano (callosa), que corresponde a una polimerización donde se unen monómeros de glucosa, liberando UDP [80].

El GEM de *E. siliculosus* es capaz de producir alginato después de añadir varias de las reacciones para completar la vía de la síntesis de alginato, además, la generación automática del borrador predijo algunas de estas reacciones correctamente [37]. Los GEMs de *E. siliculosus* y *S. japonica* producen alginato luego de realizar *gap-filling*. Por otro lado, en estos modelos no se estudia la producción de callosa, al igual que en los estudios de complementariedad metabólica mencionados anteriormente, por lo que es posible que este carbohidrato no forme parte de la biomasa de estos organismos o no sea considerado relevante.

Otros metabolitos de biomasa que no se encuentran definidos en ninguno de los GEMs son la fucoxantina y el floroglucinol, definidos en la categoría “otros”, por lo tanto su producción por el alga en el holobionte es inviable. La fucoxantina es un pigmento de color marrón dorado que junto al  $\beta$ -caroteno le entregan este color al alga [124]. Los florotaninos se conforman de monómeros de floroglucinol unidos entre sí de diversas maneras y se encuentran únicamente en las algas pardas [132]. Estos metabolitos ayudan a proteger a las algas de las condiciones de estrés y de los herbívoros. MetaCyc tiene definidas las vías metabólicas para la síntesis de fucoxantina, a partir de neoxantina, y floroglucinol, a partir de malonil-CoA en la vía de acetato-malonato [80, 133].

Como las vías de estos metabolitos que no se encuentran definidos en los GEMs del ho-

lobionte se encuentran determinadas en la base de datos MetaCyc, se puede deducir que el problema de su ausencia está relacionado con la etapa de anotación del genoma o secuenciación, o puede que los genes de los organismos del holobionte no estén bien caracterizados, ya que no se logra identificar la reacción GPR en el genoma, lo que se podría inspeccionar el genoma algal para identificar la presencia de estas vías o agregarlas manualmente al modelo final. Otra razón puede relacionarse con que *M. pyrifera* no posee la capacidad de producirlos y deben ser aportados únicamente por la comunidad, capacidad que podría no estar ocurriendo debido a la falta de componentes en sus redes o de especies en la comunidad.

El dTTP es un ácido nucleico no producible por el GEM de *M. pyrifera* que se compone de una tiamina y tres fosfatos, y participa en reacciones cediendo uno o dos fosfatos, convirtiéndose en dTDP o dTMP respectivamente [80]. Cumple funciones dentro de la replicación y reparación del ADN, cuya cantidad relativa es importante para la correcta síntesis del ADN, debido a que su deficiencia o exceso puede provocar mutaciones [134]. Este metabolito se produce a partir de ATP y dTDP, este último no es producible por el alga ni por la comunidad bacteriana. Tanto el dTDP como el dTTP podrían ser incluidos en los metabolitos que conforman el *seed*, como sucede en el caso del ATP y otros ácidos nucleicos, con el objetivo que poder activar las reacciones en las que participa.

Las algas pardas son capaces de absorber compuestos inorgánicos del ambiente mediante biosorción, que permite su unión con la biomasa de forma pasiva [135], lo que incluye al arsenato, plomo ( $Pb^{+2}$ ), cadmio ( $Cd^{+2}$ ) y mercurio ( $Hg^{+2}$ ), selenato ( $Se^{-2}$ ) y yodo ( $I_2$ ). El arsenato es un elemento inorgánico tóxico para los seres humanos y otros organismos vivos, que es absorbido por las algas marinas y convertido en arsenoazúcares, permitiendo que sea menos tóxico al ser ingerido [136]. Además, los metales pesados como el  $Pb^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  y  $Hg^{+2}$  son absorbidos gracias al polisacárido alginato, que se encuentra en abundancia en las paredes del alga, es el principal responsable de la capacidad natural de intercambio iónico de las algas pardas con estos metales [135]. Lo mismo ocurre con el selenato ( $Se^{-2}$ ), que es requerido para la síntesis de selenoproteínas [137]. De estos metabolitos, los únicos que se encuentran definidos en los GEMs de estudio son el  $CD^{+2}$  y  $Se^{-2}$ , y además, la base de datos MetaCyc posee información escasa sobre la síntesis de estos compuestos inorgánicos, lo que podría estar indicando una inviabilidad para ser producibles por los organismos y que son compuestos recuperados del entorno, por lo tanto, se propone considerarlos como *seed* para permitir activar las redes en las que colaboran.

El GEM borrador de *M. pyrifera* es incapaz de producir varios de los metabolitos de su biomasa, incluso al complementar su metabolismo con el de las bacterias, por lo tanto, este modelo no se puede considerar funcional. Ninguno de los metabolitos no producibles por el holobionte posee evidencia de ser aportados al alcance metabólico del alga *Ectocarpus sp.* gracias a la presencia de sus comunidades bacterianas [40, 58], por lo que se espera que este problema de producción metabólica esté relacionado con errores en el GEM de *M. pyrifera* y su comunidad asociada, que podrían tener reacciones o metabolitos faltantes debido a las etapas de secuenciación, anotación del genoma y/o caracterización de genes. En particular, los metabolitos alginato, callosa y fucoxantina no se encuentran definidos en los GEMs, los cuales cumplen funciones estructurales importantes y su presencia ha sido ampliamente reportada, por lo que para obtener un GEM funcional es importante realizar una curación manual que incluya estos metabolitos y sus vías metabólicas. Lo mismo ocurre con los precursores de

metabolitos de biomasa que no son producibles por el alga debido a la ausencia de reacciones que los sinteticen, como linoleoil-CoA para la producción de los ácidos linoleico y linolénico, y el ácido sulhídrico para la producción de metionina y cisteína, en particular, tiorredoxina, que es una proteína faltante para la asimilación de sulfato. Estos metabolitos faltantes se pueden añadir al modelo a través de nuevas reacciones que los produzcan o añadirlos al medio de cultivo como cosustratos [54]. Finalmente, hay metabolitos inorgánicos definidos en la biomasa que con escasa información de síntesis en la base de datos MetaCyc y poseen evidencia de ser absorbidos del ambiente, los que podrían ser incluidos dentro de los nutrientes del medio de cultivo con el fin de activar las vías metabólicas en las que participan.

### 5.2.2. Producción de metabolitos que conforman el metaboloma de alga parda

Se definió como objetivo metabólico para estudiar el alcance metabólico del alga *M. pyrifera* en el holobionte un conjunto de metabolitos que forman parte del metaboloma completo de alga parda, compuesto por 391 metabolitos identificados de 11 especies de algas pardas, que incluyen del orden *Laminariales* y *Ectocarpales* [78]. Este metaboloma es un perfil metabólico en profundidad y extenso, que considera una gran variedad de especies, alcanzando un resultado detallado. Si bien *M. pyrifera* no es considerada para desarrollar este perfil, participan algas que pertenecen a su mismo orden taxonómico (*Laminariales*), por lo que se espera que sus metabolomas sean similares debido a sus cercanía filogenética.

Como los modelos utilizados en este trabajo se encuentran basados en MetaCyc, se utilizan los compuestos que se encuentran definidos en esta base de datos, reduciendo el listado de metabolitos del metaboloma a 247. De ellos, 97 son producibles por el GEM de *M. pyrifera* de manera individual en el medio de cultivo definido en la Tabla H.1, mientras que en presencia de la comunidad bacteriana la producción de estos metabolitos aumenta un 35 %, alcanzando 131 metabolitos producibles. En particular, se produce un 33 % de los ácidos grasos, 68 % de ácidos nucleicos, 49 % de aminoácidos, 67 % de carbohidratos y 55 % de las vitaminas.

Este resultado evidencia nuevamente que existe interacción metabólica entre el GEM de *M. pyrifera* y la comunidad bacteriana, la que aporta metabolitos y enzimas que complementan las capacidades metabólicas del alga. Un aumento en el alcance de los metabolitos del metaboloma permite tener un primer acercamiento del comportamiento del holobionte y los beneficios que este aporta a *M. pyrifera*, debido a que se revela qué parte de la composición del alga es generada a partir de las interacciones con su comunidad. Además, es posible obtener información no sólo de la síntesis de biomasa, sino que también con respecto a su interacción con el entorno o la producción de metabolitos de interés comercial.

Sin embargo, el alga en su integración con el holobionte no es capaz de producir cerca del 47 % de los metabolitos definidos como parte del metaboloma del alga parda. Esto puede estar sucediendo debido a la ausencia de metabolitos precursores dentro del modelo del holobionte, los que pueden ser aportados por la comunidad bacteriana o del medio de cultivo, activando nuevas rutas. También pueden haber vías metabólicas incompletas, que podrían ser completadas con la adición de nuevas bacterias a la comunidad o mediante curación manual.

Con respecto a la producción de ácidos grasos, el 67 % no es producible por el alga, lo que

podría estar relacionado con que en los modelos metabólicos los ácidos grasos forman parte de moléculas conjugadas, es decir, componen otras moléculas, mientras que en el metaboloma se encuentran definidas en forma aislada [75]. Esto debido a que las vías metabólicas de los ácidos grasos los transforman uniendo o liberando grupos en reacciones en cadena, por lo que es posible que los ácidos grasos producibles por el alga no coincidan con los del metaboloma en términos de identificadores (IDs), pero sí con alguna parte de la vía, lo que no se reflejó en el resultado final. Lo mismo puede ocurrir con los aminoácidos o carbohidratos, de los cuales el 51 % y 33 % no son producibles respectivamente.

Los metabolitos de la categoría “otros” corresponden a compuestos inorgánicos, que en general cumplen el rol de cofactores. El 79 % de ellos no es producible por el alga, similar a lo que sucede con el conjunto de metabolitos de biomasa. Estos metabolitos corresponden a cofactores o compuestos que forman parte del metabolismo secundario [78], es decir, cumplen funciones biológicas de señalización o transporte [35], por lo tanto, es probable que el modelo no contenga reacciones para su síntesis debido a que los adquiere directamente del medio de cultivo.

De los metabolitos del metaboloma que no son producibles, hay metabolitos que no se encuentran definidos en los GEMs, siendo inviable su producción, que corresponden al 58 %. Este porcentaje es bastante elevado y pone en evidencia posibles errores en los GEMs del holobionte debido a problemas en las etapas de secuenciación y anotación del genoma, en las que no se logran identificar algunos genes o su función, resultando en la ausencia de componentes en la red. Sin embargo, este conjunto de metabolitos no es específico para el metaboloma de *M. pyrifera*, debido a que contiene componentes de otras algas pardas que pueden presentar perfiles metabólicos distintos, por lo que el metaboloma estudiado podría estar sobrestimado como conjunto objetivo para el estudio de *M. pyrifera*. Además, este metaboloma es desarrollado con algas provenientes de la costa de Noruega, por lo que puede contener componentes específicos para ese hábitat [78]. Para solucionar esto, se propone como trabajo futuro hacer una selección de los metabolitos de esta lista más cercanos al comportamiento biológico de *M. pyrifera*.

En un estudio de complementariedad metabólica entre el alga parda *E. siliculosus* y su comunidad bacteriana se identificó mediante el uso de GEMs que los compuestos histidina, putrescina,  $\beta$ -alanina, ácido nicotínico y espermidina son producibles por el alga en presencia de la comunidad bacteriana [40]. Para comprobar esto se hicieron cultivos *in vivo* del alga tratada con antibióticos e inoculada con bacterias, los que revelan que la histidina, putrescina,  $\beta$ -alanina y espermidina se vuelven producibles gracias a las bacterias, mientras que el ácido nicotínico no es producible.

Estos metabolitos forman parte del metaboloma de algas pardas, a excepción de putrescina, por lo tanto, se analizará la producción de estos metabolitos en el GEM de *M. pyrifera*. Anteriormente se mencionó que la histidina se vuelve producible gracias al aporte de histidina por parte de las bacterias, siendo consistente con el resultado de Burgunter-Delamare *et al.* 2020 [40]. La putrescina, a pesar de no ser parte del metaboloma, es producible por *M. pyrifera* sin necesidad de la interacción con bacterias, al igual que  $\beta$ -alanina, mientras que el ácido nicotínico y espermidina se vuelven producibles por el alga en presencia de la comunidad. Este resultado es consistente con las pruebas *in vivo*, lo que permite respaldar el estudio

de complementariedad *in silico* con este trabajo y que entrega un primer acercamiento de lo que podría ocurrir a nivel metabólico en el holobionte.

### 5.2.3. Producción de vitaminas por el alga en el holobionte

Las algas marinas son una gran fuente de vitaminas del grupo B y vitaminas E (tocoferoles). Las vitaminas B son nucleótidos que contienen una base nitrogenada heterocíclica (es decir, la B2 deriva de FAD, B3 de NAD, B5 de acetyl-CoA), o se derivan de nucleótidos (B1, B6). Esto implica que las coenzimas son capaces de unirse al ARN o derivaban de otra molécula que poseía esa capacidad [138]. Las vitaminas son fundamentales para el metabolismo, debido a que participan en el metabolismo intermedio de carbohidratos y aminoácidos, y cumplen el rol de factor de crecimiento en cultivo, y como coenzimas para completar reacciones químicas esenciales [138], como es el caso de la biotina, que es un cofactor de varias enzimas carboxilasas, incluyendo acetyl-CoA carboxilasa, que participa en la síntesis de ácidos grasos, al igual que la tiamina, que es cofactor de enzimas involucradas en el metabolismo primario de carbohidratos y aminoácidos, por lo tanto, son necesarias en el metabolismo tanto de las algas como se otros organismos [120]. En este trabajo se incluyen biotina y tiamina como parte del medio de cultivo definido para simular el comportamiento de los organismos del holobionte mediante sus GEMs.

Del estudio del alcance metabólico del holobionte, se obtiene que el alga es capaz de producir 3 vitaminas sin la presencia de la comunidad bacteriana, que corresponden al  $\delta$ -tocoferol, piridoxal y piridoxina, que forman parte de los metabolitos del metaboloma de alga parda y el  $\delta$ -tocoferol también es un metabolito de crecimiento de biomasa. Además, el alga vuelve producible 6 vitaminas del metaboloma de alga parda gracias a la presencia de la comunidad bacteriana, que corresponden a nicotinamida, ribósido de nicotinamida, nicotinato, piridoxamina, riboflavina y tiamina monofosfato. Finalmente, las vitaminas no producibles por el alga son  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\alpha$ -tocotrienol, vitamina B12, carnitina y pantotenato.

Las vitaminas B1 corresponden a tiamina, tiamina monofosfato y difosfato, metabolitos que son producibles por *M. pyrifer*a en la vía metabólica de biosíntesis de tiamina difosfato (Figura K.20). Esta vía es completada gracias a la complementariedad metabólica con la comunidad bacteriana debido a que aporta la reacción para la producción de tiamina monofosfato a partir de tiazol y una pirimidina. Como se mencionó anteriormente, la tiamina desempeña un papel fundamental como cofactor de enzimas, donde la tiamina difosfato (TPP) es su forma activa, esencial para todos los organismos [120]. Si bien la tiamina fue agregada en el medio de cultivo como factor de crecimiento, la vía metabólica que permite la síntesis de tiaminas es complementada con las redes de la comunidad bacteriana, lo que permite deducir que *M. pyrifer*a no requiere tiamina adicional en su entorno para crecer. Algo similar ocurre con *Chlamydomonas reinhardtii*, que se descubrió que pueden sintetizar esta vitamina [120].

La tiamina forma parte de los compuestos del medio de cultivo Provasoli, medio comúnmente utilizado para el cultivo de algas marinas [37], por lo que los GEMs de referencia de *E. siliculosus*, *S. japonica* y *C. okamuranus* son modelados con este medio [37, 75], al igual que los estudios de complementariedad metabólica de *E. siliculosus* y *E. subulatus* con sus comunidades bacterianas [40, 58], además, en el estudio *in vivo* para investigar la com-

plementariedad metabólica de *E. siliculosus* se utilizó también este medio. Por lo tanto, es relevante descubrir que en los GEMs las vitaminas tiamina, tiamina monofosfato y difosfato son producibles por el alga gracias a la interacción metabólica en el holobionte, mostrando la posibilidad de que la fuente de obtención de esta vitamina es a través de las bacterias que conviven con el alga.

La vitamina B2 corresponde a la riboflavina y se produce mediante la vía metabólica de biosíntesis de flavina (Figura K.19), que es completada con el metabolismo de la comunidad bacteriana debido a que aporta una reacción que permite la producción del precursor de la riboflavina, ARP. Las vitaminas B3 corresponden a nicotinamida, ribósido de nicotinamida y nicotinato, metabolitos que son producibles por *M. pyrifer*a en presencia de la comunidad bacteriana. Se producen en la vía metabólica de recuperación de NAD (Figura K.17), que es completada con el metabolismo de la bacteria *Cobetia amphilecti*, y corresponde a un ciclo de reacciones en donde el NAD es convertido en nicotinato dinucleótido, que permite sintetizar nicotinamida, ribósido de nicotinamida y nicotinato en reacciones consecutivas.

Las vitaminas B2 y B3 pueden realizar transferencias de electrones a enzimas en reacciones redox, que representan aproximadamente una cuarta parte de las reacciones enzimáticas, por lo que son esenciales en el funcionamiento metabólico de los organismos [26]. Los dos estudios de complementariedad metabólica de *E. siliculosus* y *E. subulatus* reportaron que las vitaminas riboflavina, nicotinamida, ribósido de nicotinamida y nicotinato son producidas en presencia de sus respectivas comunidades bacterianas, lo que permite respaldar el resultado obtenido para el alga *M. pyrifer*a y reforzando la importancia de las interacciones metabólicas en el holobionte.

La vitamina B5 corresponde al pantotenato y no es producible por el GEM de *M. pyrifer*a debido a que la vía metabólica de biosíntesis de fosfopantotenato (Figura K.22), que es donde se produce, se encuentra incompleta, ya que su precursor, el pantoato, no es producible por el holobionte. El pantotenato cumple un rol como cofactor de enzimas en la biosíntesis y el catabolismo de lípidos, como la ácido graso sintasa y la piruvato descarboxilasa, y en la biosíntesis de metabolitos secundarios, por ejemplo, la biosíntesis de lignina [139]. Además, es precursor de la coenzima A, que es la molécula fundamental para el metabolismo debido a que acumula una gran cantidad de energía en sus enlaces [138].

El medio de cultivo utilizado en este estudio contiene la coenzima A (CoA), por lo que la ausencia de pantotenato no afecta en la simulación de las funciones biológicas de *M. pyrifer*a ni en su alcance metabólico. Sin embargo, la coenzima A generalmente no se adquiere directamente del medio ambiente, sino que se sintetiza internamente en las células de los organismos, con el pantotenato y la cisteína como precursores [80]. En los GEMs de referencia de *E. siliculosus* [37], *S. japonica* [75] y *C. okamuranus* [75] no se reporta la producción de pantotenato, pero la coenzima A se encuentra en el *seed* de referencia [37], al igual que en los estudios de complementariedad metabólica de *E. siliculosus* y *E. subulatus*. Por lo tanto, como no se ha reportado la producción de pantotenato, no se puede tener certeza si el responsable de esta síntesis se relaciona con la interacción con la comunidad bacteriana o no, mientras que en el metaboloma de alga parda se reportó la presencia de esta vitamina en 10 de las 11 especies, incluyendo *Laminaria digitata* y *Saccharina latissima*, que son las más cercanas filogenéticamente a *M. pyrifer*a, y siendo *Fucus vesiculosus* el alga en la que se ausenta [78].

Las vitaminas B6 corresponden a piridoxal y piridoxina, que son producibles por *M. pyrifer*a sin la necesidad de la presencia de la comunidad bacteriana, y piridoxamina, que es

producibles por el alga gracias a las bacterias de la comunidad. Se producen en la vía metabólica de recuperación de piridoxal-5P (Figura K.18), vía que posee un ciclo que inicia con piridoxal-5P, que sintetiza piridoxal y piridoxina, producibles por el alga. Mientras que hay una vía que requiere piridoxamina-5P para sintetizar piridoxina, el cual es aportado por la comunidad bacteriana. La piridoxina participa en la formación de una serie de enzimas implicadas en el metabolismo de las proteínas, además, participa en la síntesis de clorofila, varios metabolitos secundarios y actúa como un poderoso antioxidante [140, 141]. La vitamina B6 también puede ser fundamental en la vía de asimilación de azufre, siendo requerida para la incorporación de S en la síntesis de aminoácidos [138]. En los dos estudios de complementariedad metabólica de *E. siliculosus* y *E. subulatus* con sus comunidades bacterianas se reporta la producción de estas vitaminas en el holobionte, lo que valida el resultado obtenido.

Las formas de vitamina B12 definidas en el GEM de *M. pyriferus* corresponden a adenosilcobalamina y cianocobalamina, esta última participa sólo como reactante en las reacciones definidas en la base de datos MetaCyc, por lo que es inviable su producción en los GEMs de estudio. En cambio, la adenosilcobalamina participa en la vía metabólica de recuperación de adenosilcobalamina (Figura K.23), donde se requiere convertir cob(I)alamina en cob(II)alamina mediante una flavoproteína, moléculas que no son producibles por el holobionte.

La vitamina B12 actúa como cofactor de enzimas que catalizan reacciones de transferencia de metilo, en particular, de la metionina sintasa, enzima esencial para la biosíntesis de metionina [120, 139]. Esta enzima puede ser dependiente de vitamina B12, llamada MetH, o independiente, llamada MetE, por lo que el requerimiento de esta vitamina depende del organismo. Por ejemplo, la diatomea *Thalassiosira pseudonana* tiene un requerimiento obligatorio de B12, mientras que *Chlamydomonas reinhardtii* no. Sin embargo, la mayoría de las algas poseen un requerimiento obligatorio de la vitamina B12 de forma exógena, lo que significa que no son capaces de poder sintetizarla, indicando un probable caso de auxotrofia [120].

Por otro lado, los niveles de vitamina B12 libre en el medio ambiente son insuficientes para favorecer el crecimiento de algas auxotróficas y se ha obtenido evidencia de que los organismos procariontes son capaces de sintetizar esta vitamina, lo que implica que toda la vitamina B12 que se encuentra en las algas debe haber sido producida originalmente por bacterias en una interacción simbiótica [26, 120, 139].

Con respecto a los modelos de referencia, para el GEM de *E. siliculosus* se define la vitamina B12 en el medio de cultivo de manera genérica, es decir, engloba el conjunto de todas las formas de vitaminas B12, mientras que para los GEMs de *S. japonica* y *C. okamuranus* [75] se definen la cianocobalamina y adenosilcobalamina en el medio de cultivo como cofactores. En los estudios de complementariedad metabólica de las algas *E. siliculosus* y *E. subulatus* no reportan la producción de vitaminas B12 gracias a la presencia de la comunidad bacteriana, sin embargo, los genomas de *Granulosicoccus* asociadas al alga *Nereocystis luetkeana* contienen un conjunto completo de genes para sintetizar vitaminas B12 [27], lo que sugiere que las bacterias asociadas a las algas tienen el potencial de proporcionar los requerimientos necesarios de vitamina B12 a sus algas huéspedes.

La carnitina a menudo se asocia con el complejo de vitaminas B y se produce a partir de la vía metabólica de biosíntesis de carnitina (Figura K.21) a partir de trimetil-lisina, que no

es producible por el holobionte. La carnitina cumple un rol importante en el metabolismo de los lípidos como portador de ácidos grasos desde el citoplasma hacia la matriz mitocondrial para su oxidación y producción de energía, además, se ha reportado que su suplementación al medio de cultivo de algas podría mejorar la síntesis de pigmentos fotosintéticos y la capacidad antioxidante, aumentando del crecimiento [142]. En cuanto a los estudios de referencia, en ningunos de los GEMs ni estudios de complementariedad se registra la producción de esta vitamina, por lo que no se tiene información válida sobre la síntesis de este metabolito en el holobionte.

Los tocoferoles poseen una vía específica para síntesis de vitamina E (Figura K.15), la que posee dos ramas que inician de 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinol (MPBQ), en una de ellas se sintetiza  $\gamma$ -tocoferol y  $\alpha$ -tocoferol, y en la otra se sintetiza  $\delta$ -tocoferol y  $\beta$ -tocoferol. El  $\delta$ -tocoferol es producido directamente de (MPBQ), mientras que para los otros tocoferoles se requiere la acción de S-adenosilmetionina, que es un metabolito no producible por los GEMs, por lo tanto, estos tocoferoles no son producibles por el modelo.

Se ha reportado que el tocoferol más abundante en *M. pyrifera* es el  $\alpha$ -tocoferol, que compone cerca del 90% de los tocoferoles totales, seguido del  $\gamma$ -tocoferol [121]. También se evidencia la presencia de  $\beta$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol, pero en menor abundancia [81, 121]. En algas pardas, los tocoferoles pueden desempeñar funciones antioxidantes, ayudando a proteger las células contra el estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno. El estudio de complementariedad metabólica de *E. siliculosus* y su comunidad bacteriana [40] *in silico*, reporta que el alga produce sólo  $\delta$ -tocoferol en presencia de bacterias, mientras que el resto de tocoferoles no son producibles. En los GEMs de referencia tampoco se reporta la producción de estas vitaminas.

### 5.3. Comunidad bacteriana y selección de consorcios mínimos

La comunidad bacteriana asociada al alga *M. pyrifera* estudiada en este trabajo fue identificada con metagenómica por colaboradores a través de muestras tomadas de *M. pyrifera* hembra y macho tratadas con antibióticos, extraídas de la costa chilena. De las bacterias identificadas 14 se encuentran asociadas a alga hembra y 6 a macho, de las cuales 3 se encuentran asociadas a ambos sexos, que son *Labrenzia sp. DG1229*, *Nitratireducto sp. XY-223* y *Phycisphaera mikurensis NBRC 102666*. Como se dispone de un solo GEM borrador de *M. pyrifera*, que corresponde a alga macho, la comunidad de estudio se conforma de la unión de la bacterias asociadas a alga hembra y a macho, resultando en una comunidad de 20 bacterias, siendo 17 especies diferentes. Por lo tanto, en este trabajo se ignoran las variaciones que podrían existir entre las comunidades bacterianas asociadas a algas de distintos sexos, etapas de crecimiento o estacionalidad, sin embargo, se ha reportado que las comunidades podrían tener variaciones en su composición relacionadas a estos factores [30, 119].

El filo taxonómico predominante en la comunidad bacteriana de estudio corresponde a *Proteobacterias*, debido a que el 75% de las bacterias pertenecen a él, divididas entre las clases *Alphaproteobacterias*, pertenecientes a un 55%, y *Gammaproteobacterias*, con un 20%. El resto de las bacterias pertenecen a la clasificación taxonómica *Planctomycetota*, correspon-

dientes al 15%. La identificación taxonómica de la mayoría de bacterias no es específica, por lo que podrían estar representando a un grupo de bacterias con alguna categoría taxonómica en común o simplemente no se logró identificar correctamente la taxonomía. Las bacterias cuya especie taxonómica se encuentra definida son *Bauldia litoralis*, *Cobetia amphilecti*, *Haliea salexigens DSM 19537*, *Phycisphaera mikurensis NBRC 102666* y *Mariniblastus fucicola*, mientras que el resto de las bacterias se encuentran definidas ya sea por filo, clase, familia o género. Esto se debe a que en la construcción de los MAGs se agrupan los fragmentos genómicos siguiendo patrones similares [59], por lo que podrían contener información de distintas especies de características similares. Si bien dificulta realizar un análisis de la capacidad metabólica detallado por especies, estos MAGs bacterianos integran información genómica de un conjunto de especies que se encuentran asociadas al alga, por lo que de igual forma permite estudiar las interacciones metabólicas de manera global.

Previamente se identificó algunas bacterias asociadas al alga parda *Ectocarpus sp.* en varios estudios. Tapia *et al.*, 2016 [34] aisló experimentalmente 9 cepas bacterianas asociadas a *E. siliculosus*, 7 pertenecientes al filo *Proteobacteria* y dos a *Actinobacteria*. KleinJan *et al.*, 2017 [33] aisló cepas asociadas a *E. subulatus* tratados con distintas técnicas, cultivando un total de 46 cepas pertenecientes a 33 géneros, de los cuales los más abundantes corresponden a las clases *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. También Dittami *et al.*, 2020 [31] aisló otras 95 cepas correspondientes a 27 géneros diferentes asociadas a *E. subulatus* [31], de los cuales *Gammaproteobacteria* y *Firmicutes* son los más abundantes, pero también se identificaron *Actinobacterias* y *Alphaproteobacterias*. Karimi *et al.*, 2020 [32] reporta los genomas de 72 cepas bacterianas asociadas a *E. subulatus*, correspondientes a los filos *Actinobacterias*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacterias*. En contraste, se reconstruyeron 79 genomas bacterianos mediante metagenómica (MAGs) asociadas al alga parda *Nereocystis luetkeana*, extraídas de muestras de tejido y superficie de las hojas [27], y de las cuales a las clases *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes* son las más abundantes.

Estas comunidades registradas poseen en común que se componen mayoritariamente de bacterias pertenecientes al filo *Proteobacterias*, al igual que la comunidad de estudio asociada a *M. pyrifera*, en particular, bacterias de las clases *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. En cambio, estas comunidades también presentan clases como *Actinobacterias*, *Firmicutes* o *Bacteroidetes*, que están ausentes en la comunidad de *M. pyrifera* en este trabajo. Sin embargo, la comunidad de *M. pyrifera* es pequeña en cantidad de especies en comparación con el tamaño de las comunidades de los estudios mencionados anteriormente para *E. subulatus*, que se encuentran sobre las 40 especies, lo que podría justificar que no se encuentren presentes las clases menos abundantes.

Además, las diferencias entre las comunidades pueden ocurrir por distintas razones, como la forma en la que se obtienen los MAGs, ya que la comunidad podría variar o estar contaminada si la muestra se extrae del mar directo, o las técnicas de identificación utilizadas, que puede ser computacional o por secuencias de ARNr 16S. Por otro lado, se utilizaron técnicas de identificación de aislados mediante amplificación de secuencias ARNr 16S [33, 34] o identificación taxonómica con herramientas computacionales a través de ensamblajes metagenómicos [27, 32]. Sin embargo, se desconocen las técnicas que se utilizaron en la construcción de los MAGs de *M. pyrifera* y la técnica de identificación taxonómica de especies, por lo que no es

posible analizar con profundidad este aspecto.

### 5.3.1. Selección de consorcios mínimos

La selección de consorcios mínimos se basa en un criterio de optimización que consiste en elegir una cantidad mínima de microorganismos de la comunidad que permitan al huésped alcanzar la producción de un objetivo metabólico gracias a la complementariedad de sus redes, utilizando los nutrientes disponibles (*seeds*) [38]. Se toma el supuesto de que el holobionte (asociación huésped - simbioses) se comporta como un metaorganismo, es decir, es un sistema que no se encuentra compartimentado y no se consideran reacciones de transporte ni intercambios entre las especies. Estas comunidades óptimas permiten definir qué especies son las que cumplen roles fundamentales con respecto al objetivo. Se pueden encontrar varias soluciones equivalentes a este problema de optimización, lo que es una ventaja, ya que tener más de un consorcio óptimo proporciona pistas sobre la redundancia en el microbioma con respecto a la función objetivo, lo que aumenta sus posibilidades de ser realmente eficaz [38].

Los objetivos metabólicos definidos para la selección de consorcios corresponden nuevamente a la producción de metabolitos de crecimiento de biomasa de *M. pyrifera* (Tabla B.1), con el fin de reconocer las bacterias que son imprescindibles en el crecimiento del alga, y de metabolitos que conforman el metaboloma de alga parda [78] (Tabla B.2), para identificar el conjunto de bacterias que permiten al alga cumplir con el perfil metabólico característico de estas algas. Se define un último objetivo metabólico que corresponde al total de metabolitos que se vuelven producibles por el alga en el holobionte, que corresponden a los 308 componentes que se añaden a la capacidad metabólica del alga gracias a la presencia de la comunidad bacteriana (Tabla B.3).

Los consorcios mínimos obtenidos permiten al alga alcanzar la misma producción de los objetivos metabólicos que si estuviera con la comunidad completa, por lo tanto, el alga produce 5 metabolitos de crecimiento de biomasa adicionales en presencia de la comunidad, produce 34 del metaboloma de alga parda, y produce 308 totales adicionales. Estos consorcios son mostrados en la Tabla 4.2.

Para el objetivo metabólico de crecimiento de *M. pyrifera* se obtiene que el consorcio mínimo obtenido se conforma de 3 especies bacterianas, *Hyphomicrobiales bacterium*, *Planctomyces bacterium* y *Shingorhabdus sp. M41*. En cuanto al objetivo de alcanzar el metaboloma de alga parda se obtienen tres soluciones de cuatro bacterias cada una, las cuales comparten las especies *Cobetia amphilecti*, *Hyphomicrobiales bacterium* y *Planctomyces bacterium*. La cuarta bacteria de estas soluciones corresponde a *Bauldia litoralis* o a *Nitratireductor sp. XY-223*, en sus modelos asociados a alga hembra y macho. Como estas tres soluciones a consorcios mínimos son equivalentes, es decir, permiten al alga alcanzar la misma producción de metabolitos, es posible deducir que los GEMs de las bacterias que difieren en las soluciones son redundantes en cuanto a su complementariedad metabólica, es decir, cumplen la misma función metabólica en el holobionte para la producción de compuestos del metaboloma de alga parda. En particular, en estas soluciones se muestra que los dos GEMs de *Nitratireductor sp. XY-223* son equivalentes, a pesar de ser construidos a partir de muestras distintas, lo que indica que ese 1 % de diferencia en las cantidades de genes, reacciones y metabolitos no es representativa (Tabla 4.2).

Para el objetivo metabólico de producción de los metabolitos totales que son aportados a la capacidad metabólica del alga en presencia de la comunidad bacteriana se obtienen dos soluciones de consorcios mínimos, conformados por 10 especies cada una. Estas soluciones difieren solo en el GEM de *Phycisphaera mikurensis* NBRC 102666, donde una solución posee el GEM asociado a alga hembra y la otra el GEM asociado a alga macho, con lo que se obtiene que estos GEMs son equivalentes con respecto a la función metabólica que cumplen en el holobionte, a pesar de la diferencia significativa en la cantidad de genes, reacciones y metabolitos que poseen, en la que el GEM asociado a alga hembra contiene casi el doble de genes que el asociado a alga macho y contiene cerca de un 20 % más de reacciones y metabolitos. Esta equivalencia funcional entre GEMs podría indicar que el asociado a alga hembra se encuentra sobredimensionado y debe contener la información metabólica del GEM asociado a macho, ya que las reacciones de este último son suficientes para lograr el alcance metabólico deseado para el alga.

Además, estas dos soluciones de 10 especies se componen de la unión de la especie de los consorcios para los objetivos de crecimiento de biomasa de *M. pyrifera* y de producción del metaboloma de alga parda, correspondientes a cinco bacterias diferentes que son *Hyphomicrobiales bacterium*, *Planctomycetes bacterium*, *Sphingorhabdus sp. M41*, *Cobetia amphilecti* y *Bauldia litoralis*, junto a cinco nuevas especies. Como se mencionó anteriormente, el GEM de esta última especie es equivalente a los de *Nitratireductor sp. XY-223* con respecto al objetivo de producción de metaboloma de alga parda, mientras que para alcanzar el total de metabolitos producibles por el alga en el holobionte no son equivalentes, ya que ninguno de los consorcios mínimos para alcanzar este objetivo incluye a *Nitratireductor sp. XY-223*. Con esto es posible notar que la redundancia entre especies que conforman una comunidad bacteriana depende del objetivo metabólico que se desea alcanzar, y se deduce que el GEM de *Bauldia litoralis* posee una mayor capacidad metabólica, que le permite alcanzar un mayor número de metabolitos producibles.

Para los tres objetivos metabólicos se obtuvieron consorcios mínimos en los que se encuentran presente dos especies en todos ellos, que son *Hyphomicrobiales bacterium* y *Planctomycetes bacterium*, siendo las más relevantes en cuanto a las interacciones metabólicas entre *M. pyrifera* y su comunidad bacteriana, debido a que son parte de la biomasa de *M. pyrifera* y de su metaboloma. Cabe destacar que el GEM de *Hyphomicrobiales bacterium* es el que posee la mayor cantidad de genes, reacciones y metabolitos de toda la comunidad, y como se mencionó anteriormente, esto puede deberse a que contiene información de más de una especie, pero como también se supone que forman parte de la comunidad asociada al alga, es representativo dentro del estudio de complementariedad metabólica. Por otro lado, el GEM de *Planctomycetes bacterium* no predomina con respecto a la cantidad de genes, reacciones y metabolitos, ya que se encuentra bajo del promedio, pero aún así destaca por su función interactiva en el holobionte.

Las diez especies que conforman los consorcios mínimos asociados al objetivo metabólico para la producción total de metabolitos por el alga en el holobionte son las más relevantes dentro de la comunidad bacteriana completa de este estudio, ya que son las necesarias para permitir al alga alcanzar su máxima capacidad metabólica dentro de este holobionte. Además, la capacidad metabólica alcanzada por el alga con estos dos consorcios mínimos contiene los metabolitos de biomasa de *M. pyrifera* y del metaboloma de alga parda, lo que permite

considerar a estas 10 especies como las requeridas por el alga para crecer. Sin embargo, hay una gran cantidad de metabolitos importantes que tanto la comunidad completa como estos consorcios no permiten su producción, que son cerca del 40 % encargados de la biomasa y 45 % que conforman el metaboloma de alga parda. Con esto es posible considerar que el sistema de GEMs que representan este holobionte no es funcional, ya que no es posible simular los requerimientos mínimos para alcanzar el crecimiento y desarrollo correcto del alga. Por lo tanto, los consorcios mínimos presentados pueden contribuir a tener un primer acercamiento de la contribución de las comunidades microbianas y comprender las interacciones metabólicas que ocurren dentro del holobionte de *M. pyrifera*, pero no es un resultado lo suficientemente certero como para definir esta comunidad la indicada para el desarrollo del alga.

La falta de producción de metabolitos importantes para el desarrollo del alga puede deberse a la ausencia de especies bacterianas clave en la funcionalidad del holobionte que no fueron identificadas, ya sea por la técnica y calidad en la toma de muestras o en las etapas de identificación. Por otro lado, como se mencionó en secciones anteriores, la ausencia de metabolitos importantes, como el alginato, callosa o fucoxantina, o de reacciones, como para la síntesis de metionina y cisteína, puede relacionarse con la construcción incorrecta o insuficiente de los GEMs, incluyendo etapas de anotación de genomas. Por ello, es importante realizar una curación manual de los GEMs posterior al estudio de complementariedad metabólica entre los organismos, con el fin de rellenar espacios faltantes en las redes sin ignorar las interacciones ya descubiertas.

## 5.4. Comparación entre la comunidad bacteriana de *Macrocystis pyrifera* y *Ectocarpus siliculosus*

En 2020 [40] se estudia la complementariedad metabólica *in silico* entre una comunidad conformada por 10 especies bacterianas y el alga parda *Ectocarpus siliculosus* mediante el uso de GEMs y la herramienta MiSCoTo para la predicción de capacidades metabólicas en el holobionte y selección de consorcios mínimos [40]. La predicción metabólica resulta en que el alga es capaz de producir 160 nuevos metabolitos gracias a la complementariedad metabólica con la comunidad. Luego realizan cultivos *in vivo* del alga inoculada con las bacterias de los consorcios mínimos resultantes y se demuestra un aumento relevante en el crecimiento de algas con la presencia bacteriana, además de la detección de metabolitos adicionales en el perfil metabolómico de los cultivos de alga [37]. Por lo tanto, resulta interesante hacer la comparación de la producción de metabolitos entre la comunidad de *M. pyrifera* y la de *E. siliculosus* con respecto a sus alcances metabólicos relacionados al crecimiento de biomasa de *M. pyrifera* y metabolitos que conforman el metaboloma de alga parda.

La comunidad bacteriana de *E. siliculosus* se compone en un 90 % de especies del filo taxonómico *Proteobacterias* (Tabla 4.4) y en la comunidad de *M. pyrifera* es de un 75 %, porcentajes que son relevantes en ambas comunidades. Por otro lado, la comunidad de *E. siliculosus* no posee especies de la clase taxonómica *Planctomycetota*, que representa un 15 % de la comunidad de *M. pyrifera*, pero se compone de una especie de la clase *Cytophagia*.

Se predijo la capacidad metabólica total de ambas comunidad en ausencia de un organismo huésped, es decir, el modelo de su respectiva alga, en el medio de cultivo definido

para este trabajo. Se obtiene que en total la comunidad de *M. pyrifer*a produce 1096 metabolitos, mientras que la de *E. siliculosus* produce solo 740, de los cuales 544 son comunes. Por lo tanto, del total de metabolitos producidos por la comunidad de *M. pyrifer*a, la mitad puede ser producida también por la otra comunidad, mientras que el resto es propio de la comunidad de *M. pyrifer*a. La diferencia entre la capacidad metabólica de las comunidades se puede atribuir a la cantidad de especies que las conforman, ya que hay una relación directa entre el tamaño de la comunidad y la producción de metabolitos. Esto también sucede con la cantidad de metabolitos que permiten adicionar a la capacidad metabólica de sus respectivas algas huésped, donde la comunidad de *E. siliculosus* añade 160 metabolitos [40] y la de *M. pyrifer*a añade 308, que es cerca del doble, al igual que el tamaño de la comunidad.

Se estudia el alcance de las comunidades con respecto a la producción de los 50 metabolitos de biomasa de *M. pyrifer*a, obteniendo que la comunidad de *E. siliculosus* puede producir 21 y la de *M. pyrifer*a puede producir 23, de los cuales 20 son comunes, revelando una gran similitud entre los alcances metabólicos. Ese metabolito que la comunidad de *E. siliculosus* puede producir que la otra comunidad no puede corresponde al alginato, un carbohidrato fundamental en la estructura de las algas pardas. A pesar de que este metabolito no es producido por el holobionte de *M. pyrifer*a debido a que no se encuentra definido en su GEM, el hecho de que la comunidad *E. siliculosus* sea capaz de producirlo revela la existencia de redes metabólicas que utilizando los nutrientes del medio de cultivo definido pueden alcanzar esto, además de especies bacterianas asociadas a un alga parda que las contengan, mostrando que la producción de alginato puede tener relación con la complementariedad metabólica entre alga y bacterias. Esto genera interés en indagar estas redes para tomarlas como referencia para una futura curación manual de los GEMs del holobionte y tomar algunas de estas bacterias como posibles candidatas para el estudio del holobionte de *M. pyrifer*a.

Por otro lado, se estudia el alcance de las comunidades con respecto a la producción de los 247 metabolitos que conforman el metaboloma de algas pardas [78], obteniendo que la comunidad de *E. siliculosus* puede producir 98 y la de *M. pyrifer*a puede producir 113, de los cuales 95 son comunes. Nuevamente poseen una gran similitud en los alcances, donde la comunidad de *E. siliculosus* es capaz de producir solo 3 metabolitos del metaboloma que la comunidad de *M. pyrifer*a no puede, correspondientes al 1-palmitoil-glicerol-3-P, manopiranososa y oxalato.

Las comunidades bacterianas asociadas a las algas *E. siliculosus* y *M. pyrifer*a poseen capacidades metabólicas distintas en cuanto a la cantidad total de metabolitos alcanzables, pero similares en cuanto al alcance de metabolitos de interés para el crecimiento de biomasa de *M. pyrifer*a y metaboloma de alga parda, a pesar de ser distintas en cuanto a la composición de especies y tamaño de la comunidad. La comunidad de *M. pyrifer*a produce una mayor cantidad de metabolitos objetivo que la de *E. siliculosus*, indicando que es la mejor opción en cuanto a la complementariedad metabólica con el alga. Sin embargo, la comunidad de *E. siliculosus* es capaz de producir 4 metabolitos objetivos adicionales (alginato, 1-palmitoil-glicerol-3-P, manopiranososa y oxalato), evidenciando que los organismos de esta comunidad poseen redes que podrían ayudar a mejorar el alcance metabólico del alga mediante interacciones metabólicas, lo que ayuda a generar propuestas para mejorar la calidad del modelamiento del holobionte de estudio a futuro, ya sea mediante el estudio de nuevas especies bacterianas que puedan complementar el metabolismo del alga o la curación manual de los GEMs de los organismos de la comunidad actual en base a las redes de la comunidad

de *E. siliculosus*.

#### 5.4.1. MiSCoTo como predictor de capacidad metabólica del sistema simbiótico y consorcios mínimos

La herramienta MiSCoTo permite explorar a fondo las interacciones metabólicas entre un organismo huésped y su comunidad microbiana asociada, debido a que predice las potenciales capacidades metabólicas del huésped que podrían desbloquearse mediante la contribución de uno o varios metabolitos o reacciones de otros organismos del sistema utilizando los sustratos disponibles en el medio [38]. La producibilidad se determina según el algoritmo de expansión de redes, que define que un metabolito se considera producible en dos casos: es un sustrato del medio de cultivo (*seed*) o es un producto de una reacción cuyos reactivos son producibles [143].

Además, esta herramienta utiliza las complementariedades metabólicas de los organismos para definir consorcios mínimos, que son un subconjunto de la comunidad microbiana que permiten al huésped alcanzar un objetivo determinado en presencia de la comunidad microbiana de menor tamaño [38]. Esto se logra mediante un problema de optimización basada en el criterio de minimización del tamaño de la comunidad, que considera al sistema como un metaorganismo, y el de minimización del costo total de síntesis, que considera un sistema compartimentado en el que las reacciones de transporte y de intercambios metabólicos poseen un coste energético [38].

Anteriormente se utilizó esta herramienta para estudiar la complementariedad metabólica entre organismos de un holobionte de características similares a las del que se estudia en el presente trabajo. En esa investigación se integró los GEMs de *Ectocarpus siliculosus* y de una comunidad bacteriana, donde se obtuvo que el alga aumenta su capacidad metabólica en 160 metabolitos gracias a las bacterias y se seleccionaron 6 consorcios mínimos que logran este alcance [40]. Luego, se realizaron cultivos *in vivo* de este holobionte para monitorear el crecimiento del alga y la presencia de metabolitos clave, donde se demuestra un aumento significativo en el crecimiento del alga inoculada con los consorcios seleccionados y la presencia de metabolitos clave que se predijo que serían producibles mediante un intercambio metabólico en el holobionte [40]. Por lo tanto, este estudio resulta ser un buen indicador de que la complementariedad metabólica que predice el software MiSCoTo se asemeja al comportamiento real de un cultivo con los organismos que estudia, por lo que se espera que el uso de esta herramienta puede entregar resultados relevantes acerca de la influencia de la comunidad bacteriana a la capacidad metabólica de *M. pyrifera* que permita conocer las posibles interacciones que ocurren en el holobionte.

Se utilizó MiSCoTo para simular el comportamiento metabólico del holobionte de *M. pyrifera* en el medio de cultivo definido previamente, mediante los archivos SBML de los GEMs construidos con Pathway Tools o con el Código C.1 para *targets* o *seeds*. Con ello, se obtuvieron varios conjuntos de metabolitos, correspondientes a los totales producibles por el alga sola y en presencia de la comunidad bacteriana, al igual que la producibilidad de los objetivos metabólicos definidos (*targets*). También se obtuvo los consorcios mínimos seleccionados para cada objetivo metabólico, que representan las especies más relevantes en el aumento de la capacidad metabólica del alga en el holobionte mediante potenciales interacciones metabólicas. Esta información entrega una evidente complementariedad de las redes metabólicas

por parte de los organismos del holobionte a nivel computacional, pero podría no tener un comportamiento biológico consistente con la realidad, sin embargo, se espera que algunas de estas interacciones ocurran en cultivo, como lo logró la predicción de Burgunter-Delamare *et al.*, 2020 [40].

MiSCoTo recibe como entrada un conjunto de archivos SBML, que representan las redes metabólicas de los organismos y en este caso, contienen su información genómica asociada. A partir de estos archivos se identifican los metabolitos y se hace un seguimiento de las redes en las que participan y de sus precursores para estudiar su producibilidad [38]. Hay una variedad de herramientas de reconstrucción de GEMs que tienen como salida un modelo en formato SBML, incluyendo Pathway Tools, lo que significa que estos archivos pueden estar elaborados en base a distintas bases de datos. Este detalle es clave en la compatibilidad de los GEMs para el estudio de la complementariedad metabólica, ya que si se estudian GEMs construidos en distintas bases de datos, los identificadores (IDs) de los componentes de la red no serán reconocidos y el resultado será incorrecto.

En este trabajo todos los GEMs fueron construidos con Pathway Tools, por lo que sus identificadores son compatibles, sin embargo, los archivos *seeds* y *target* de biomasa traían pequeñas diferencias en sus identificadores, los que tenían un “M\_” antes del nombre del metabolito o un “\_c” al final, para indicar que pertenece a la categoría de metabolito y que se define en el compartimento citosol. Estos detalles debieron ser modificadas para poder estudiar la complementariedad metabólica del holobionte correctamente. Para remediar esto existe el paquete de Python llamado PADMet, el cual combina la información genómica y metabólica que se utilizó para producir un GEM proveniente de varias herramientas de reconstrucción y proporciona un nuevo GEM que garantice la coherencia y la estandarización, en particular la compatibilidad de IDs [114].

En cuanto a los metabolitos que conforman el metaboloma de alga parda, fueron reportados con sus IDs basadas en la base de datos KEGG [78], por lo que tuvieron que ser mapeadas en la base de datos MetaCyc para poder ser compatibles con el resto de los archivos. Para ello se utilizó la herramienta MetaNetX [117], que permite pasar las IDs de una base de datos a otra, sin embargo, en este traspaso se perdieron más del 30 % de los metabolitos, ya que no se encuentran definidos en la base de datos MetaCyc o no lograron ser mapeados por algún otro error, siendo un porcentaje significativo de pérdida, lo que destaca las diferencias en el contenido de las distintas bases de datos.

Por otro lado, los archivos SBML basados en la base de datos MetaCyc tienen sus IDs alteradas con respecto a las que se encuentran directamente en la página web de la base, donde las alteraciones más comunes son que el signo “-” se escribe como “\_\_45\_\_” y el signo “+” se escribe como “\_\_43\_\_”. Esto está escrito en código ASCII, que es una forma de representar los caracteres para ser usados para el intercambio general de información entre sistemas de procesamiento de información [144]. Por lo tanto, se debe tener en cuenta este factor al momento de compatibilizar archivos o de buscar metabolitos en la página web de MetaCyc, ya sea para entender el contenido de los archivos que se trabajan o para construir archivos *seeds* y *target*.

Otra forma de estudiar la complementariedad metabólica es fusionando los GEMs de los

organismos para formar un único GEM que represente todo el holobionte, como si se tratara de un metaorganismos. Esto se realizó por Dittami *et al.*, 2014 para identificar las posibles complementariedades entre la especie bacteriana “*Ca. P. ectocarpi*” y el alga parda *Ectocarpus siliculosus* [17], mezclando el modelo borrador de EctoGEM [37] y el GEM de la bacteria mediante MeMerge (herramienta actualmente no disponible), con la idea de rellenar la red del alga con las reacciones y/o metabolitos de la bacteria. Utilizan el software Meneco para calcular la capacidad de la red para producir los metabolitos de crecimiento de biomasa a partir de los nutrientes del medio de cultivo Provasoli. Meneco es principalmente una herramienta para rellenar redes en GEMs borradores, con el proceso llamado *gap-filling*, mediante un problema de optimización, y permite calcular la capacidad metabólica de la red [76]. Se estudia la producibilidad de 50 metabolitos de crecimiento de biomasa de *E. siliculosus*, de los cuales el alga es capaz de producir 25 y en presencia de la comunidad bacteriana se vuelven producibles 8, entre ellos, ácido palmitoleico, palmitato, ácido esteárico e histidina.

# Capítulo 6

## Conclusión

Este trabajo logra cumplir con los objetivos propuestos, ya que se estudia la complementariedad metabólica entre el alga *Macrocystis pyrifera* y las bacterias asociadas al holobionte algal a través de la construcción e integración de modelos metabólicos a escala genómica (GEMs). Para ello, se realizó la anotación estructural y funcional de los genomas de la comunidad bacteriana (MAGs) con el software Prokka y luego la reconstrucción de los GEMs bacterianos con Pathway Tools. Estos GEMs representan la capacidad metabólica de las especies de la comunidad, al igual que el de *M. pyrifera*, por lo que al integrarlos con la herramienta MiSCoTo fue posible estudiar el beneficio de la interacción metabólica entre los organismos del holobionte con respecto al alcance del alga. Finalmente, se hizo una selección de consorcios mínimos que permitan al alga producir la mayor cantidad de metabolitos objetivo en asociación con la menor cantidad de especies bacterianas. Estos metabolitos objetivo consistieron en los metabolitos de biomasa de *M. pyrifera*, los que forman parte del metaboloma de algas pardas [78] y los metabolitos totales que se pueden producir.

A partir de la reconstrucción de los GEMs de las bacterias de la comunidad se obtiene que las especies de la comunidad bacteriana poseen una gran variabilidad genómica y metabólica, presentando una cantidad de genes, reacciones y metabolitos distintas en orden de magnitud, pero dentro del rango esperado, a excepción de la especie *Hyphomicrobiales bacterium*, que posee una cantidad de reacciones que supera al promedio del resto de especies en un 65 %, siendo más cercana al GEM de *M. pyrifera*. Se deduce que este error y la posible subestimación o sobrestimación de los componentes que conforman la red metabólica de los organismos se debe al *binning*, etapa que no fue abordada en este trabajo, donde se propagan errores a las etapas de anotación, dificultando la identificación de los genes, y a la construcción de los GEMs, evidenciando reacciones o metabolitos faltantes o erróneos.

Con respecto al estudio de la capacidad metabólica de *M. pyrifera* en el holobionte, se obtuvo que aumenta un 44 % (308 metabolitos) cuando se encuentra en presencia de la comunidad bacteriana, evidenciando la existencia de potenciales interacciones metabólicas entre los organismos del holobionte al complementar sus redes. Gracias a estas interacciones el alga es capaz de producir 5 metabolitos para su crecimiento que no es capaz de producir de manera individual, que corresponden a ácido oleico, histidina, lisina, manitol y  $\beta$ -caroteno. De igual forma, se vuelven producibles las vitaminas ribósido de nicotinamida, nicotinamida y nicotinato (vitaminas B3), riboflavina (B2), tiamina monofosfato (vitamina B1) y piridoxamina (vitamina B6), que son de gran interés como fuente nutricional. Sin embargo, hay

metabolitos que son importantes para su crecimiento que no son producibles por el alga, ni en presencia de la comunidad bacteriana ni de manera individual, de los que destacan cisteína, metionina,  $\delta$ -tocoferol, entre otros, y metabolitos que no están definidos en los modelos del holobionte, como el alginato,  $\beta$ -glucano y fucoxantina. Si bien en este trabajo se muestra que la red metabólica es complementada y aumenta la producción de metabolitos, los objetivos metabólicos no se alcanzan en su totalidad, ya que se produce el 57% (28) de los metabolitos de biomasa y el 53% (131) de los que conforman el metaboloma de algas pardas, por lo que el modelo integrado del holobionte no puede ser considerado funcional.

La selección de los consorcios mínimos logró conocer las especies bacterianas más relevantes en el holobionte en cuanto a su metabolismo, que son *Hyphomicrobiales bacterium*, *Planctomycetes bacterium*, *Bauldia litoralis*, *Cobetia amphilecti* y *Sphingorhabdus sp. M41*, ya que participan en la mayoría de las soluciones obtenidas. Además, se conocen las especies que son redundantes según el objetivo metabólico que se desea alcanzar, que corresponden a *Bauldia litoralis* y *Nitratireductor sp. XY-223* en la producción de metabolitos del metaboloma de algas pardas, al igual que los dos GEMs de *Nitratireductor sp. XY-223*, asociados a *M. pyrifera* hembra y macho, mientras que para la producción de metabolitos totales se obtiene que los modelos de *Phycisphaera mikurensis NBRC 102666* asociados a alga hembra y macho también son redundantes.

Estos resultados dan un primer acercamiento sobre el comportamiento metabólico de *M. pyrifera* en cuanto a la influencia que posee su comunidad bacteriana asociada con respecto a su alcance metabólico, en particular, su crecimiento. Si bien se logra aumentar su capacidad, no alcanza a ser un GEM funcional, mostrando que aún hay espacios que rellenar en la red, ya sea con más bacterias que no fueron consideradas o con curación manual que agrega la información faltante. Por otro lado, dan una idea de las especies bacterianas más relevantes dentro del holobionte, lo que podría ser de ayuda para diseñar prácticas de cultivo de macroalgas que consideren la presencia de comunidades microbianas para respaldar su crecimiento. Además, el desarrollo que permitan conocer en las interacciones metabólicas de comunidades computacionalmente, entrega un mayor poder de decisión al momento de realizar un cultivo *in vivo*, al predecir el metabolismo del sistema con antelación.

## 6.1. Trabajo futuro

El trabajo realizado puede dar pie a futuros trabajos que complementen el estudio de las interacciones metabólicas que ocurren en el holobionte con el fin de velar por la integridad del *Macrocystis pyrifera* y su función en el ecosistema marino. A continuación se mencionan propuestas para trabajos futuros:

- Realizar una curación manual del GEM de *M. pyrifera* luego de incorporar las reacciones y metabolitos aportados por la comunidad bacteriana para así alcanzar un modelo funcional del holobionte.
- Estudiar la interacción metabólica de *M. pyrifera* con otros microorganismos que podrían estar conformando la comunidad, como hongos u otras bacterias, con el fin de extender el conocimiento sobre la influencia del holobionte. Para ello, se deberían secuenciar y

reconocer nuevamente las especies que forman parte del holobionte y realizar la misma metodología descrita en este trabajo.

- De la misma forma, se propone el estudio metabólico de organismos patógenos que podrían estar afectando a *M. pyrifera* en su hábitat, ya que así se podrían llegar a conocer razones por las que el alga se ve afectada y proponer nuevas prácticas de control de patógenos y conservación del alga.
- Estudiar la variabilidad genómica y metabólica de la comunidad bacteriana en los distintos ambientes de Chile, debido a que el cambio de ambiente entre una región a otra puede afectar significativamente la composición de la comunidad, y con ello, el metabolismo y/o resistencia del alga.
- Obtener nuevos MAGs de la comunidad bacteriana a partir de secuencias extraídas de la costa chilena y reconstruir sus GEMs para aumentar las redes metabólicas del holobionte, con el fin de alcanzar una representación más completa y de mejor calidad del comportamiento metabólico de *M. pyrifera* en este lugar. Además, el GEM borrador de *M. pyrifera* aportado por colaboradores no presentaba una buena calidad, ya que le falta varias reacciones y metabolitos de gran importancia, por lo que rehacerlo podría reducir las posibles interacciones erróneas que podrían ser predichas.
- Diseñar propuestas de cultivos *in vivo* que permitan probar las predicciones obtenidas acerca de los metabolitos que se vuelven producibles en el holobionte. Para ello, habría que utilizar solo las bacterias que son cultivables y realizar las predicciones con este nuevo consorcio.

# Capítulo 7

## Glosario

Se presenta un glosario que proporciona definiciones clave de términos utilizados a lo largo del documento para tener una mejor comprensión. El glosario está organizado alfabéticamente para facilitar la búsqueda y comprensión de conceptos específicos.

- ***binning***: proceso de agrupación de *reads* en conjuntos que se cree que provienen del mismo organismo o similares.
- ***gap-filling***: su traducción al español corresponde a “relleno de brechas” o “relleno de lagunas”, que significa añadir componentes faltantes a una red metabólica con el fin de completarla.
- **GEM**: modelo metabólico a escala genómica, que en inglés es “Genome-Scale Model”.
- **MAG**: genoma ensamblado a partir de metagenómica, que en inglés es “Metagenome-Assembled Genome”.
- ***reads***: secuencia o fragmentos de ADN que se ha obtenido con técnicas de secuenciación.
- ***seed***: conjunto de componentes iniciales, en este caso, componentes que conforman el medio de cultivo en que se simulan los GEMs.
- ***scope***: alcance metabólico o metabolitos totales que son producibles por el GEM de *M. pyrifera* en presencia su comunidad bacteriana.
- ***target***: componentes que componen un objetivo metabólico o que se desea estudiar su producibilidad por uno o varios GEMs integrados.

# Capítulo 8

## Material suplementario

Se presenta material suplementario que complementa y amplía la información proporcionada en el cuerpo principal del documento. Este material incluye los archivos en formato SBML de los modelos metabólicos a escala genómica del alga *Macrocystis pyrifera* y de las bacterias asociadas a ella, los componentes que conforman el medio de cultivo y conjuntos de metabolitos objetivo. Además, se presentan los consorcios mínimos obtenidos como soluciones para cada objetivo metabólico. Este material se encuentra disponible en un repositorio de Google Drive ([Material Suplementario](#)). A continuación se describen los archivos:

- **Macrocystis\_pyrifera.sbml**: modelo metabólico a escala genómica de *M. pyrifera*.
- **Seed.sbml**: componentes que representan el medio de cultivo.
- **Target\_biomasa.sbml**: componentes de biomasa de *M. pyrifera*.
- **Target\_metaboloma.sbml**: componentes que conforman el metaboloma de algas pardas.
- **Target\_producibles.sbm**: componentes totales que se vuelven producibles por *M. pyrifera* en presencia de la comunidad bacteriana (predicho con la herramienta MiSCoTo).
- **Comunidad\_bacterias**: carpeta compuesta por los modelos metabólicos a escala genómica de las bacterias que conforman la comunidad asociada a *M. pyrifera*. Los nombres de estos archivos inician con “F” o “M”, que significa que esa especie está asociada a *M. pyrifera* hembra o a macho respectivamente.
- **Consortios\_minimos**: carpeta compuesta por carpetas que contienen los consorcios mínimos predichos por MiSCoTo.

La estructura de sus nombres es “**Consortio\_minimo\_TARGET\_solX**”, donde TARGET corresponde al objetivo metabólico al que pertenece y X el número de la solución a la que corresponde.

# Bibliografía

- [1] Cock, J. M., Peters, A. F., y Coelho, S. M., “Brown algae,” *Current Biology*, vol. 21, no. 15, pp. R573–R575, 2011.
- [2] Santelices, B., “The discovery of kelp forests in deep-water habitats of tropical regions,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 49, pp. 19163–19164, 2007.
- [3] Ravanal, M. C., Sharma, S., Gimpel, J., Reveco-Urzuá, F. E., Øverland, M., Horn, S. J., y Lienqueo, M. E., “The role of alginate lyases in the enzymatic saccharification of brown macroalgae, *Macrocystis pyrifera* and *Saccharina latissima*,” *Algal research*, vol. 26, pp. 287–293, 2017.
- [4] Purcell-Meyerink, D., Packer, M. A., Wheeler, T. T., y Hayes, M., “Aquaculture production of the brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Macrocystis pyrifera*: Applications in food and pharmaceuticals,” *Molecules*, vol. 26, no. 5, p. 1306, 2021.
- [5] Leyton, A., Lienqueo, M., y Shene, C., “*Macrocystis pyrifera*: Substrate for the production of bioactive compounds,” *Journal of Applied Phycology*, vol. 32, pp. 2335–2341, 2020.
- [6] Bixler, H. J. y Porse, H., “A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry,” *Journal of applied Phycology*, vol. 23, no. 3, pp. 321–335, 2011.
- [7] Tønnesen, H. H. y Karlsen, J., “Alginate in drug delivery systems,” *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 28, no. 6, pp. 621–630, 2002.
- [8] Camus, C., Ballerino, P., Delgado, R., Olivera-Nappa, Á., Leyton, C., y Buschmann, A. H., “Scaling up bioethanol production from the farmed brown macroalga *Macrocystis pyrifera* in Chile,” *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 10, no. 6, pp. 673–685, 2016.
- [9] Navarrete, I. A., Kim, D. Y., Wilcox, C., Reed, D. C., Ginsburg, D. W., Dutton, J. M., Heidelberg, J., Raut, Y., y Wilcox, B. H., “Effects of depth-cycling on nutrient uptake and biomass production in the giant kelp *Macrocystis pyrifera*,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 141, p. 110747, 2021.
- [10] Le, D. M., Desmond, M. J., Buschmann, A. H., Pritchard, D. W., Camus, C., Hurd, C. L., y Hepburn, C. D., “Reproduction, hatchery and culture applications for the giant kelp (*Macrocystis pyrifera*): a methodological appraisal,” *Applied Phycology*, vol. 3, no. 1, pp. 368–382, 2022.
- [11] Ingrid Espinoza León, “El valor de nuestros bosques de macroalgas,” 2023, <https://www.rewildingchile.org/news/el-valor-de-nuestros-bosques-de-macroalgas/>.
- [12] Westermeier, R., Patiño, D. J., Murúa, P., y Müller, D. G., “*Macrocystis* mariculture

- in Chile: growth performance of heterosis genotype constructs under field conditions,” *Journal of applied phycology*, vol. 23, pp. 819–825, 2011.
- [13] Layton, C., Coleman, M. A., Marzinelli, E. M., Steinberg, P. D., Swearer, S. E., Vergés, A., Wernberg, T., y Johnson, C. R., “Kelp forest restoration in Australia,” *Frontiers in Marine Science*, vol. 7, p. 74, 2020.
- [14] Gutierrez, A., Correa, T., Munoz, V., Santibanez, A., Marcos, R., Cáceres, C., y Buschmann, A. H., “Farming of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* in southern Chile for development of novel food products,” en *Eighteenth International Seaweed Symposium: Proceedings of the Eighteenth International Seaweed Symposium, held in Bergen, Norway, 20–25 June 2004*, pp. 33–41, Springer, 2007.
- [15] Correa, T., Gutiérrez, A., Flores, R., Buschmann, A. H., Cornejo, P., y Bucarey, C., “Production and economic assessment of giant kelp *Macrocystis pyrifera* cultivation for abalone feed in the south of Chile,” *Aquaculture research*, vol. 47, no. 3, pp. 698–707, 2016.
- [16] Zilber-Rosenberg, I. y Rosenberg, E., “Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution,” *FEMS microbiology reviews*, vol. 32, no. 5, pp. 723–735, 2008.
- [17] Dittami, S. M., Barbeyron, T., Boyen, C., Cambefort, J., Collet, G., Delage, L., Gobet, A., Groisillier, A., Leblanc, C., Michel, G., *et al.*, “Genome and metabolic network of “*Candidatus Phaeomarinobacter ectocarpus*” Ec32, a new candidate genus of *Alpha-proteobacteria* frequently associated with brown algae,” *Frontiers in genetics*, vol. 5, p. 241, 2014.
- [18] Ray, K., “Married to our gut microbiota,” *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 9, no. 10, pp. 555–556, 2012.
- [19] Turner, T. R., James, E. K., y Poole, P. S., “The plant microbiome,” *Genome biology*, vol. 14, no. 6, pp. 1–10, 2013.
- [20] Salaün, S., La Barre, S., Santos-Goncalvez, M. D., Potin, P., Haras, D., y Bazire, A., “Influence of exudates of the kelp *Laminaria digitata* on biofilm formation of associated and exogenous bacterial epiphytes,” *Microbial ecology*, vol. 64, pp. 359–369, 2012.
- [21] Wahl, M., Goecke, F., Labes, A., Dobretsov, S., y Weinberger, F., “The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms,” *Frontiers in microbiology*, vol. 3, p. 292, 2012.
- [22] de Oliveira, L. S., Tschoeke, D. A., Magalhães Lopes, A. C. R., Sudatti, D. B., Meirelles, P. M., Thompson, C. C., Pereira, R. C., y Thompson, F. L., “Molecular mechanisms for microbe recognition and defense by the red seaweed *Laurencia dendroidea*,” *Msphere*, vol. 2, no. 6, pp. 10–1128, 2017.
- [23] Burke, C., Thomas, T., Lewis, M., Steinberg, P., y Kjelleberg, S., “Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*,” *The ISME journal*, vol. 5, no. 4, pp. 590–600, 2011.
- [24] “Marine Agronomy of Seaweed Holobionts (MASH).”, <https://mileniomash.cl/mash/>.
- [25] Pedersen, M., “Identification of a cytokinin, 6-(3 methyl-2-butenylamino) purine, in sea water and the effect of cytokinins on brown algae,” *Physiologia Plantarum*, vol. 28, no. 1, pp. 101–105, 1973.

- [26] Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., y Smith, A. G., “Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria,” *Nature*, vol. 438, no. 7064, pp. 90–93, 2005.
- [27] Weigel, B. L., Miranda, K. K., Fogarty, E. C., Watson, A. R., y Pfister, C. A., “Functional insights into the kelp microbiome from metagenome-assembled genomes,” *Msystems*, vol. 7, no. 3, pp. e01422–21, 2022.
- [28] Minich, J. J., Morris, M. M., Brown, M., Doane, M., Edwards, M. S., Michael, T. P., y Dinsdale, E. A., “Elevated temperature drives kelp microbiome dysbiosis, while elevated carbon dioxide induces water microbiome disruption,” *PLoS One*, vol. 13, no. 2, p. e0192772, 2018.
- [29] Florez, J. Z., Camus, C., Hengst, M. B., y Buschmann, A. H., “A mesocosm study on bacteria-kelp interactions: importance of nitrogen availability and kelp genetics,” *Journal of Phycology*, vol. 57, no. 6, pp. 1777–1791, 2021.
- [30] Lachnit, T., Meske, D., Wahl, M., Harder, T., y Schmitz, R., “Epibacterial community patterns on marine macroalgae are host-specific but temporally variable,” *Environmental microbiology*, vol. 13, no. 3, pp. 655–665, 2011.
- [31] Dittami, S. M., Peters, A. F., West, J. A., Cariou, T., KleinJan, H., Burgunter-Delamare, B., Prechoux, A., Egan, S., y Boyen, C., “Revisiting australian *Ectocarpus subulatus* (Phaeophyceae) from the Hopkins River: distribution, abiotic environment, and associated microbiota,” *Journal of phycology*, vol. 56, no. 3, pp. 719–729, 2020.
- [32] Karimi, E., Geslain, E., KleinJan, H., Tanguy, G., Legeay, E., Corre, E., y Dittami, S. M., “Genome sequences of 72 bacterial strains isolated from *Ectocarpus subulatus*: a resource for algal microbiology,” *Genome Biology and Evolution*, vol. 12, no. 1, pp. 3647–3655, 2020.
- [33] KleinJan, H., Jeanthon, C., Boyen, C., y Dittami, S. M., “Exploring the cultivable *Ectocarpus* microbiome,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, p. 2456, 2017.
- [34] Tapia, J. E., González, B., Goulitquer, S., Potin, P., y Correa, J. A., “Microbiota influences morphology and reproduction of the brown alga *Ectocarpus sp.*,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, p. 197, 2016.
- [35] Dittami, S. M., Eveillard, D., y Tonon, T., “A metabolic approach to study algal-bacterial interactions in changing environments,” 2014.
- [36] Gu, C., Kim, G. B., Kim, W. J., Kim, H. U., y Lee, S. Y., “Current status and applications of genome-scale metabolic models,” *Genome biology*, vol. 20, pp. 1–18, 2019.
- [37] Prigent, S., Collet, G., Dittami, S. M., Delage, L., Ethis de Corny, F., Dameron, O., Eveillard, D., Thiele, S., Cambefort, J., Boyen, C., *et al.*, “The genome-scale metabolic network of *Ectocarpus siliculosus* (Ecto GEM): a resource to study brown algal physiology and beyond,” *The Plant Journal*, vol. 80, no. 2, pp. 367–381, 2014.
- [38] Frioux, C., Fremy, E., Trottier, C., y Siegel, A., “Scalable and exhaustive screening of metabolic functions carried out by microbial consortia,” *Bioinformatics*, vol. 34, no. 17, pp. i934–i943, 2018.
- [39] Levy, R., Carr, R., Kreimer, A., Freilich, S., y Borenstein, E., “NetCooperate: a network-based tool for inferring host-microbe and microbe-microbe cooperation,” *BMC bioinformatics*, vol. 16, no. 1, pp. 1–6, 2015.

- [40] Burgunter-Delamare, B., KleinJan, H., Frioux, C., Fremy, E., Wagner, M., Corre, E., Le Salver, A., Leroux, C., Leblanc, C., Boyen, C., *et al.*, “Metabolic complementarity between a brown alga and associated cultivable bacteria provide indications of beneficial interactions,” *Frontiers in Marine Science*, vol. 7, p. 85, 2020.
- [41] Thiele, I. y Palsson, B. Ø., “A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction,” *Nature protocols*, vol. 5, no. 1, pp. 93–121, 2010.
- [42] Eng, A. y Borenstein, E., “An algorithm for designing minimal microbial communities with desired metabolic capacities,” *Bioinformatics*, vol. 32, no. 13, pp. 2008–2016, 2016.
- [43] Julien-Laferrière, A., Bulteau, L., Parrot, D., Marchetti-Spaccamela, A., Stougie, L., Vinga, S., Mary, A., y Sagot, M.-F., “A combinatorial algorithm for microbial consortia synthetic design,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 29182, 2016.
- [44] Seemann, T., “Prokka: rapid prokaryotic genome annotation,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 14, pp. 2068–2069, 2014.
- [45] Karp, P. D., Paley, S. M., Krummenacker, M., Latendresse, M., Dale, J. M., Lee, T. J., Kaipa, P., Gilham, F., Spaulding, A., Popescu, L., *et al.*, “Pathway Tools version 13.0: integrated software for pathway/genome informatics and systems biology,” *Briefings in bioinformatics*, vol. 11, no. 1, pp. 40–79, 2010.
- [46] Johnson, C. H., Patterson, A. D., Idle, J. R., y Gonzalez, F. J., “Xenobiotic metabolomics: major impact on the metabolome,” *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 52, pp. 37–56, 2012.
- [47] Janga, S. C. y Babu, M. M., “Network-based approaches for linking metabolism with environment,” *Genome biology*, vol. 9, no. 11, pp. 1–5, 2008.
- [48] Almaas, E., Kovacs, B., Vicsek, T., Oltvai, Z., y Barabási, A.-L., “Global organization of metabolic fluxes in the bacterium *Escherichia coli*,” *Nature*, vol. 427, no. 6977, pp. 839–843, 2004.
- [49] Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z. N., y Barabási, A.-L., “The large-scale organization of metabolic networks,” *Nature*, vol. 407, no. 6804, pp. 651–654, 2000.
- [50] Borenstein, E., Kupiec, M., Feldman, M. W., y Ruppin, E., “Large-scale reconstruction and phylogenetic analysis of metabolic environments,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 38, pp. 14482–14487, 2008.
- [51] Ibarra, R. U., Edwards, J. S., y Palsson, B. O., “*Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve *in silico* predicted optimal growth,” *Nature*, vol. 420, no. 6912, pp. 186–189, 2002.
- [52] Lewis, N. E., Nagarajan, H., y Palsson, B. O., “Constraining the metabolic genotype–phenotype relationship using a phylogeny of *in silico* methods,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, no. 4, pp. 291–305, 2012.
- [53] Feist, A. M. y Palsson, B. O., “The biomass objective function,” *Current opinion in microbiology*, vol. 13, no. 3, pp. 344–349, 2010.
- [54] Johnson, C. H., Ivanisevic, J., y Siuzdak, G., “Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 17, no. 7, pp. 451–459, 2016.
- [55] Hamid, S. S., Wakayama, M., Ichihara, K., Sakurai, K., Ashino, Y., Kadowaki, R.,

- Soga, T., y Tomita, M., “Metabolome profiling of various seaweed species discriminates between brown, red, and green algae,” *Planta*, vol. 249, pp. 1921–1947, 2019.
- [56] Feist, A. M., Herrgård, M. J., Thiele, I., Reed, J. L., y Palsson, B. Ø., “Reconstruction of biochemical networks in microorganisms,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, no. 2, pp. 129–143, 2009.
- [57] Henry, C. S., DeJongh, M., Best, A. A., Frybarger, P. M., Linsay, B., y Stevens, R. L., “High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models,” *Nature biotechnology*, vol. 28, no. 9, pp. 977–982, 2010.
- [58] Karimi, E., Geslain, E., Belcour, A., Frioux, C., Aïte, M., Siegel, A., Corre, E., y Dittami, S. M., “Robustness analysis of metabolic predictions in algal microbial communities based on different annotation pipelines,” *PeerJ*, vol. 9, p. e11344, 2021.
- [59] Setubal, J. C., “Metagenome-assembled genomes: concepts, analogies, and challenges,” *Biophysical Reviews*, vol. 13, no. 6, pp. 905–909, 2021.
- [60] Yang, C., Chowdhury, D., Zhang, Z., Cheung, W. K., Lu, A., Bian, Z., y Zhang, L., “A review of computational tools for generating metagenome-assembled genomes from metagenomic sequencing data,” *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 19, pp. 6301–6314, 2021.
- [61] Stres, B. y Kronegger, L., “Shift in the paradigm towards next-generation microbiology,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 366, no. 15, p. fnz159, 2019.
- [62] Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J.-F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., Gies, E. A., *et al.*, “Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter,” *Nature*, vol. 499, no. 7459, pp. 431–437, 2013.
- [63] Nayfach, S., Shi, Z. J., Seshadri, R., Pollard, K. S., y Kyrpides, N. C., “New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome,” *Nature*, vol. 568, no. 7753, pp. 505–510, 2019.
- [64] Bernstein, D. B., Sulheim, S., Almaas, E., y Segrè, D., “Addressing uncertainty in genome-scale metabolic model reconstruction and analysis,” *Genome Biology*, vol. 22, pp. 1–22, 2021.
- [65] Schnoes, A. M., Brown, S. D., Dodevski, I., y Babbitt, P. C., “Annotation error in public databases: misannotation of molecular function in enzyme superfamilies,” *PLoS computational biology*, vol. 5, no. 12, p. e1000605, 2009.
- [66] Consortium, U., “UniProt: a hub for protein information,” *Nucleic acids research*, vol. 43, no. D1, pp. D204–D212, 2015.
- [67] Goswami, A. M., “Structural modeling and *in silico* analysis of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of human  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2,” *Meta gene*, vol. 5, pp. 162–172, 2015.
- [68] Fang, X., Lloyd, C. J., y Palsson, B. O., “Reconstructing organisms *in silico*: genome-scale models and their emerging applications,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 18, no. 12, pp. 731–743, 2020.
- [69] Mendoza, S. N., Olivier, B. G., Molenaar, D., y Teusink, B., “A systematic assessment of current genome-scale metabolic reconstruction tools,” *Genome biology*, vol. 20, no. 1,

pp. 1–20, 2019.

- [70] Vallenet, D., Labarre, L., Rouy, Z., Barbe, V., Bocs, S., Cruveiller, S., Lajus, A., Pascal, G., Scarpelli, C., y Medigue, C., “MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results,” *Nucleic acids research*, vol. 34, no. 1, pp. 53–65, 2006.
- [71] Kanehisa, M. y Goto, S., “KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes,” *Nucleic acids research*, vol. 28, no. 1, pp. 27–30, 2000.
- [72] Belcour, A., Frioux, C., Aite, M., Bretaudeau, A., Hildebrand, F., y Siegel, A., “Me-tage2Metabo, microbiota-scale metabolic complementarity for the identification of key species,” *Elife*, vol. 9, p. e61968, 2020.
- [73] Peters, A., Marie, D., Scornet, D., Kloareg, B., y Cock, J. M., “Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics,” *Journal of Phycology*, vol. 41, p. 226, 2005.
- [74] Florez, J. Z., Camus, C., Hengst, M. B., Marchant, F., y Buschmann, A. H., “Structure of the epiphytic bacterial communities of *Macrocystis pyrifera* in localities with contrasting nitrogen concentrations and temperature,” *Algal Research*, vol. 44, p. 101706, 2019.
- [75] Nègre, D., Aite, M., Belcour, A., Frioux, C., Brillet-Guéguen, L., Liu, X., Bordron, P., Godfroy, O., Lipinska, A. P., Leblanc, C., *et al.*, “Genome-scale metabolic networks shed light on the carotenoid biosynthesis pathway in the brown algae *Saccharina japonica* and *Cladosiphon okamuranus*,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 11, p. 564, 2019.
- [76] Prigent, S., Frioux, C., Dittami, S. M., Thiele, S., Larhlimi, A., Collet, G., Gutknecht, F., Got, J., Eveillard, D., Bourdon, J., *et al.*, “Meneco, a topology-based gap-filling tool applicable to degraded genome-wide metabolic networks,” *PLoS computational biology*, vol. 13, no. 1, p. e1005276, 2017.
- [77] Mataigne, V., Vannier, N., Vandenkoornhuyse, P., y Hacquard, S., “Multi-genome metabolic modeling predicts functional inter-dependencies in the *Arabidopsis* root microbiome,” *Microbiome*, vol. 10, no. 1, p. 217, 2022.
- [78] Belghit, I., Rasinger, J. D., Heesch, S., Biancarosa, I., Liland, N., Torstensen, B., Waagbø, R., Lock, E.-J., y Bruckner, C. G., “In-depth metabolic profiling of marine macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green algae,” *Algal research*, vol. 26, pp. 240–249, 2017.
- [79] Lieven, C., Beber, M. E., Olivier, B. G., Bergmann, F. T., Ataman, M., Babaei, P., Bartell, J. A., Blank, L. M., Chauhan, S., Correia, K., *et al.*, “Memote for standardized genome-scale metabolic model testing,” *Nature biotechnology*, vol. 38, no. 3, pp. 272–276, 2020.
- [80] Caspi, R., Billington, R., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, W. K., Paley, S., Subhraveti, P., y Karp, P. D., “The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes—a 2019 update,” *Nucleic acids research*, vol. 48, no. D1, pp. D445–D453, 2020.
- [81] Biancarosa, I., Belghit, I., Bruckner, C. G., Liland, N. S., Waagbø, R., Amlund, H., Heesch, S., y Lock, E.-J., “Chemical characterization of 21 species of marine macroalgae common in Norwegian waters: benefits of and limitations to their potential use in food and feed,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 98, no. 5, pp. 2035–2042,

2018.

- [82] Seebeck, F. P., “*In vitro* reconstitution of mycobacterial ergothioneine biosynthesis,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, no. 19, pp. 6632–6633, 2010.
- [83] Drozak, J., Veiga-da Cunha, M., Vertommen, D., Stroobant, V., y Van Schaftingen, E., “Molecular identification of carnosine synthase as atp-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1),” *Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 13, pp. 9346–9356, 2010.
- [84] Markovitz, P., Chuang, D., y Cox, R., “Familial hyperlysinemias. purification and characterization of the bifunctional amino adipic semialdehyde synthase with lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase activities.,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, no. 19, pp. 11643–11646, 1984.
- [85] Frey, P. A. y Reed, G. H., “Pyridoxal-5 $\prime$ -phosphate as the catalyst for radical isomerization in reactions of PLP-dependent aminomutases,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, vol. 1814, no. 11, pp. 1548–1557, 2011.
- [86] Domergue, F., Abbadi, A., Zähringer, U., Moreau, H., y Heinz, E., “*In vivo* characterization of the first acyl-coa  $\delta$ 6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*,” *Biochemical Journal*, vol. 389, no. 2, pp. 483–490, 2005.
- [87] Cahoon, E. B., Hall, S. E., Ripp, K. G., Ganzke, T. S., Hitz, W. D., y Coughlan, S. J., “Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content,” *Nature biotechnology*, vol. 21, no. 9, pp. 1082–1087, 2003.
- [88] Cheng, Z., Sattler, S., Maeda, H., Sakuragi, Y., Bryant, D. A., y DellaPenna, D., “Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes,” *The Plant Cell*, vol. 15, no. 10, pp. 2343–2356, 2003.
- [89] Kumar, M. y Kozłowski, P. M., “Electronic and structural properties of cob (I) alamin: Ramifications for b12-dependent processes,” *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 333, pp. 71–81, 2017.
- [90] Herrero, S., González, E., Gillikin, J. W., Véléz, H., y Daub, M. E., “Identification and characterization of a pyridoxal reductase involved in the vitamin B6 salvage pathway in *Arabidopsis*,” *Plant molecular biology*, vol. 76, pp. 157–169, 2011.
- [91] Havaux, M., Ksas, B., Szewczyk, A., Rumeau, D., Franck, F., Caffarri, S., y Triantaphyllidès, C., “Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress,” *BMC plant biology*, vol. 9, pp. 1–22, 2009.
- [92] Haase, I., Sarge, S., Illarionov, B., Laudert, D., Hohmann, H.-P., Bacher, A., y Fischer, M., “Enzymes from the haloacid dehalogenase (HAD) superfamily catalyse the elusive dephosphorylation step of riboflavin biosynthesis,” *ChemBioChem*, vol. 14, no. 17, pp. 2272–2275, 2013.
- [93] Fischer, M., Roßmisch, W., Saller, S., Illarionov, B., Richter, G., Rohdich, F., Eisenreich, W., y Bacher, A., “Evolution of vitamin B2 biosynthesis: structural and functional similarity between pyrimidine deaminases of eubacterial and plant origin,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 35, pp. 36299–36308, 2004.
- [94] Silberfeld, T., Rousseau, F., y de Reviers, B., “An updated classification of brown algae (*Ochrophyta*, *Phaeophyceae*),” *Cryptogamie, Algologie*, vol. 35, no. 2, pp. 117–156,

2014.

- [95] Machado, D., Andrejev, S., Tramontano, M., y Patil, K. R., “Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities,” *Nucleic acids research*, vol. 46, no. 15, pp. 7542–7553, 2018.
- [96] Heinken, A., Hertel, J., Acharya, G., Ravcheev, D. A., Nyga, M., Okpala, O. E., Hogan, M., Magnúsdóttir, S., Martinelli, F., Nap, B., *et al.*, “Genome-scale metabolic reconstruction of 7,302 human microorganisms for personalized medicine,” *Nature Biotechnology*, pp. 1–12, 2023.
- [97] Olson, N. D., Treangen, T. J., Hill, C. M., Cepeda-Espinoza, V., Ghurye, J., Koren, S., y Pop, M., “Metagenomic assembly through the lens of validation: recent advances in assessing and improving the quality of genomes assembled from metagenomes,” *Briefings in bioinformatics*, vol. 20, no. 4, pp. 1140–1150, 2019.
- [98] Meziti, A., Rodriguez-R, L. M., Hatt, J. K., Peña-Gonzalez, A., Levy, K., y Konstantinidis, K. T., “The reliability of metagenome-assembled genomes (MAGs) in representing natural populations: insights from comparing mags against isolate genomes derived from the same fecal sample,” *Applied and environmental microbiology*, vol. 87, no. 6, pp. e02593–20, 2021.
- [99] Pérez-Cobas, A. E., Gomez-Valero, L., y Buchrieser, C., “Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses,” *Microbial genomics*, vol. 6, no. 8, 2020.
- [100] Beier, S., Tappu, R., y Huson, D. H., “Functional analysis in metagenomics using MEGAN 6,” *Functional metagenomics: Tools and applications*, pp. 65–74, 2017.
- [101] Durot, M., Bourguignon, P.-Y., y Schachter, V., “Genome-scale models of bacterial metabolism: reconstruction and applications,” *FEMS microbiology reviews*, vol. 33, no. 1, pp. 164–190, 2008.
- [102] Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., y Hauser, L. J., “Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification,” *BMC bioinformatics*, vol. 11, pp. 1–11, 2010.
- [103] Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Stærfeldt, H.-H., Rognes, T., y Ussery, D. W., “RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes,” *Nucleic acids research*, vol. 35, no. 9, pp. 3100–3108, 2007.
- [104] Laslett, D. y Canback, B., “ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences,” *Nucleic acids research*, vol. 32, no. 1, pp. 11–16, 2004.
- [105] Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., y Nielsen, H., “SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions,” *Nature methods*, vol. 8, no. 10, pp. 785–786, 2011.
- [106] Kolbe, D. L. y Eddy, S. R., “Fast filtering for RNA homology search,” *Bioinformatics*, vol. 27, no. 22, pp. 3102–3109, 2011.
- [107] Pruitt, K. D., Tatusova, T., y Maglott, D. R., “NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins,” *Nucleic acids research*, vol. 35, no. suppl\_1, pp. D61–D65, 2007.
- [108] Lorenzi, H. A., Hoover, J., Inman, J., Safford, T., Murphy, S., Kagan, L., y Williamson,

- S. J., “The viral metagenome annotation pipeline (VMGAP): an automated tool for the functional annotation of viral metagenomic shotgun sequencing data,” *Standards in genomic sciences*, vol. 4, no. 3, pp. 418–429, 2011.
- [109] Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., *et al.*, “The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST),” *Nucleic acids research*, vol. 42, no. D1, pp. D206–D214, 2014.
- [110] Chaudhuri, R. R., Loman, N. J., Snyder, L. A., Bailey, C. M., Stekel, D. J., y Pallen, M. J., “x BASE2: a comprehensive resource for comparative bacterial genomics,” *Nucleic acids research*, vol. 36, no. suppl\_1, pp. D543–D546, 2007.
- [111] Olivier, B., “Metadraft [internet],” 2018.
- [112] King, Z. A., Lu, J., Dräger, A., Miller, P., Federowicz, S., Lerman, J. A., Ebrahim, A., Palsson, B. O., y Lewis, N. E., “BiGG models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models,” *Nucleic acids research*, vol. 44, no. D1, pp. D515–D522, 2016.
- [113] Wang, H., Marcišauskas, S., Sánchez, B. J., Domenzain, I., Hermansson, D., Agren, R., Nielsen, J., y Kerkhoven, E. J., “RAVEN 2.0: A versatile toolbox for metabolic network reconstruction and a case study on streptomyces coelicolor,” *PLoS computational biology*, vol. 14, no. 10, p. e1006541, 2018.
- [114] Aite, M., Chevallier, M., Frioux, C., Trottier, C., Got, J., Cortés, M. P., Mendoza, S. N., Carrier, G., Dameron, O., Guillaudeux, N., *et al.*, “Traceability, reproducibility and wiki-exploration for “à-la-carte” reconstructions of genome-scale metabolic models,” *PLoS computational biology*, vol. 14, no. 5, p. e1006146, 2018.
- [115] Dias, O., Rocha, M., Ferreira, E. C., y Rocha, I., “Reconstructing genome-scale metabolic models with merlin,” *Nucleic acids research*, vol. 43, no. 8, pp. 3899–3910, 2015.
- [116] Belcour, A., Girard, J., Aite, M., Delage, L., Trottier, C., Marteau, C., Leroux, C., Dittami, S. M., Sauleau, P., Corre, E., *et al.*, “Inferring biochemical reactions and metabolite structures to understand metabolic pathway drift,” *Iscience*, vol. 23, no. 2, 2020.
- [117] Moretti, S., Martin, O., Van Du Tran, T., Bridge, A., Morgat, A., y Pagni, M., “MetaNetX/MNXref—reconciliation of metabolites and biochemical reactions to bring together genome-scale metabolic networks,” *Nucleic acids research*, vol. 44, no. D1, pp. D523–D526, 2016.
- [118] Eng, A. y Borenstein, E., “An algorithm for designing minimal microbial communities with desired metabolic capacities,” *Bioinformatics*, vol. 32, no. 13, pp. 2008–2016, 2016.
- [119] Paix, B., Othmani, A., Debroas, D., Culioli, G., y Briand, J.-F., “Temporal covariation of epibacterial community and surface metabolome in the mediterranean seaweed holobiont *Taonia atomaria*,” *Environmental microbiology*, vol. 21, no. 9, pp. 3346–3363, 2019.
- [120] Croft, M. T., Warren, M. J., y Smith, A. G., “Algae need their vitamins,” *Eukaryotic cell*, vol. 5, no. 8, pp. 1175–1183, 2006.
- [121] Ortiz, J., Uquiche, E., Robert, P., Romero, N., Quitral, V., y Llantén, C., “Functional

- and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*,” European journal of lipid science and technology, vol. 111, no. 4, pp. 320–327, 2009.
- [122] Méndez, F., Rivero, A., Bahamonde, F., Gallardo, P., Frangopulos, M., Zolezzi, J., Inestrosa, N. C., y Mansilla, A., “Fatty acid composition of different morphological structures in the sub-antarctic kelps *Macrocystis pyrifera* (L.) C. agardh and *Lessonia flavicans* Bory of the Magellan Ecoregion: Nutritional and biomedical potentials,” Journal of Applied Phycology, pp. 1–14, 2023.
- [123] Vilcanqui, Y., Mamani-Apaza, L. O., Flores, M., Ortiz-Viedma, J., Romero, N., Mariotti-Celis, M. S., y Huamán-Castilla, N. L., “Chemical characterization of brown and red seaweed from southern Peru, a sustainable source of bioactive and nutraceutical compounds,” Agronomy, vol. 11, no. 8, p. 1669, 2021.
- [124] Remya, R., Samrot, A. V., Kumar, S. S., Mohanavel, V., Karthick, A., Chinnaiyan, V. K., Umapathy, D., y Muhibbullah, M., “Bioactive potential of brown algae,” Adsorption Science & Technology, vol. 2022, pp. 1–13, 2022.
- [125] Amengual, J., “Bioactive properties of carotenoids in human health,” 2019.
- [126] Saini, R. K., Mahomoodally, M. F., Sadeer, N. B., Keum, Y.-S., y Rengasamy, K. R., “Characterization of nutritionally important lipophilic constituents from brown kelp *Ecklonia radiata* (C. Ag.) J. Agardh,” Food Chemistry, vol. 340, p. 127897, 2021.
- [127] Bromke, M. A. y Hesse, H., “Phylogenetic analysis of methionine synthesis genes from *Thalassiosira pseudonana*,” SpringerPlus, vol. 4, no. 1, pp. 1–14, 2015.
- [128] Giordano, M. y Prioretti, L., “Sulphur and algae: metabolism, ecology and evolution,” The physiology of Microalgae, pp. 185–209, 2016.
- [129] Grillo, M. y Colombatto, S., “S-adenosylmethionine and its products,” Amino acids, vol. 34, pp. 187–193, 2008.
- [130] Lu, S. C., “S-adenosylmethionine,” The international journal of biochemistry & cell biology, vol. 32, no. 4, pp. 391–395, 2000.
- [131] Raimundo, S. C., Pattathil, S., Eberhard, S., Hahn, M. G., y Popper, Z. A., “ $\beta$ -1, 3-glucans are components of brown seaweed (Phaeophyceae) cell walls,” Protoplasma, vol. 254, pp. 997–1016, 2017.
- [132] Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K., y Nakamura, T., “Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae,” Journal of applied phycology, vol. 16, pp. 291–296, 2004.
- [133] Imbs, T. y Zvyagintseva, T., “Phlorotannins are polyphenolic metabolites of brown algae,” Russian Journal of Marine Biology, vol. 44, pp. 263–273, 2018.
- [134] Ferraro, P., Franzolin, E., Pontarin, G., Reichard, P., y Bianchi, V., “Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates,” Nucleic acids research, vol. 38, no. 6, pp. e85–e85, 2010.
- [135] Davis, T. A., Volesky, B., y Mucci, A., “A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae,” Water research, vol. 37, no. 18, pp. 4311–4330, 2003.
- [136] Ichikawa, S., Nozawa, S., Hanaoka, K., y Kaise, T., “Ingestion and excretion of arsenic compounds present in edible brown algae, textitHijikia fusiforme, by mice,” Food and

- chemical toxicology, vol. 48, no. 2, pp. 465–469, 2010.
- [137] Araie, H. y Shiraiwa, Y., “Selenium in algae,” *The physiology of microalgae*, pp. 281–288, 2016.
- [138] Monteverde, D., Gómez-Consarnau, L., Suffridge, C., y Sañudo-Wilhelmy, S. A., “Life’s utilization of b vitamins on early earth,” *Geobiology*, vol. 15, no. 1, pp. 3–18, 2017.
- [139] Smith, A. G., Croft, M. T., Moulin, M., y Webb, M. E., “Plants need their vitamins too,” *Current opinion in plant biology*, vol. 10, no. 3, pp. 266–275, 2007.
- [140] Tambasco-Studart, M., Titiz, O., Raschle, T., Forster, G., Amrhein, N., y Fitzpatrick, T. B., “Vitamin B6 biosynthesis in higher plants,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, no. 38, pp. 13687–13692, 2005.
- [141] Ryzhik, I., lindukh, , y Dobychna, , “The B-group vitamins in the red alga *palmaria palmat* (Barents Sea): Composition, seasonal changes and influence of abiotic factors,” *Algal Research*, vol. 59, p. 102473, 2021.
- [142] Wang, S., Chen, Y.-k., Ghonimy, A., Yu, T., Gao, Y.-s., Wu, Z.-c., Wang, Q.-j., y Zhang, D.-m., “L-carnitine supplementation improved population growth, photosynthetic pigment synthesis and antioxidant activity of marine *Chlorella sp.*,” *Aquaculture Reports*, vol. 17, p. 100394, 2020.
- [143] Handorf, T., Ebenhöf, O., y Heinrich, R., “Expanding metabolic networks: scopes of compounds, robustness, and evolution,” *Journal of molecular evolution*, vol. 61, pp. 498–512, 2005.
- [144] Cerf, V. G., “ASCII format for network interchange,” rep. tec., 1969.

# Anexos

## Anexo A. Especies bacterianas identificadas asociadas a *Macrocystis Pyrifera*

En el proyecto Phaeoexplorer <sup>8</sup> se identificaron 20 especies bacterianas asociadas al alga *Macrocystis pyrifera*, 14 asociadas al alga hembra y 6 a macho, y poseen 3 especies en común. En la Tabla A.1 se muestra el listado de las especies identificadas.

Tabla A.1: Especies bacterianas identificadas que pertenecen al holobionte de *M. pyrifera* hembra y macho. Las bacterias asociadas a ambos sexos se encuentran destacadas en negrita.

Sexo	Especies	Clase
Hembra	<i>Alphaproteobacteria bacterium</i>	<i>Alphaproteobacterias</i>
	<i>Alphaproteobacteria bacterium bin95</i>	
	<i>Bauldia litoralis</i>	
	<i>Hyphomicrobiales bacterium</i>	
	<i>Hyphomonas sp. L-53-1-40</i>	
	<b><i>Labrenzia sp. DG1229</i></b>	
Hembra	<b><i>Nitratireductor sp. XY-223</i></b>	<i>Gammaproteobacteria</i>
	<i>Sphingorhabdus sp. M41</i>	
	<i>Cobetia amphilecti</i>	
	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i>	
Hembra	<i>Haliea salexigens DSM 19537</i>	<i>Planctomycetota</i>
	<i>Oleiphilus sp.</i>	
	<b><i>Phycisphaera mikurensis NBRC 102666</i></b>	
Macho	<i>Planctomycetes bacterium</i>	<i>Planctomycetota</i>
	<b><i>Labrenzia sp DG1229</i></b>	
	<i>Maritalea myrionectae</i>	
	<b><i>Nitratireductor sp. XY-223</i></b>	
	<i>Mariniblastus fucicola</i>	
Macho	<b><i>Phycisphaera mikurensis NBRC 102666</i></b>	<i>Planctomycetota</i>
	<i>Planctomycetaceae bacterium GA0077529</i>	

<sup>8</sup> Dittami S. y Markov G., Comunicación personal, 2023

## Anexo B. Objetivos metabólicos

Las capacidades metabólicas de alga *Macrocystis pyrifera* y su comunidad bacteriana asociada son estudiadas con respecto a objetivos metabólicos, que corresponden a conjuntos de metabolitos que se espera sean producibles en el holobionte. Estos conjuntos corresponden a los metabolitos de biomasa de *M. pyrifera*, los que forman parte del metaboloma de algas pardas [78] y los metabolitos totales que el alga es capaz de producir en su integración con el holobionte.

### B.1. Metabolitos encargados del crecimiento de biomasa de *Macrocystis pyrifera*

Un colaborador <sup>9</sup> identificó 50 metabolitos necesarios para el crecimiento de biomasa del alga *M. pyrifera*, que se muestran en la Tabla B.1 junto con su categoría asignada. También se encuentran en Material suplementario (Tabla S2) con sus IDs de MetaCyc utilizadas en los modelos y su producibilidad.

Tabla B.1: Metabolitos de biomasa de *M. pyrifera*.

Nombre	Categoría	Nombre	Categoría
ácido oleico	ácido graso	treonina	aminoácido
ácido mirístico	ácido graso	tirosina	aminoácido
ácido palmitoleico	ácido graso	valina	aminoácido
palmitato	ácido graso	cisteína	aminoácido
ácido esteárico	ácido graso	metionina	aminoácido
ácido linoleico	ácido graso	manitol	carbohidrato
ácido linoénico	ácido graso	alginato	carbohidrato
CTP	ácido nucléico	callosa	carbohidrato
DATP	ácido nucléico	Beta-caroteno	otro
DCTP	ácido nucléico	arsenato	otro
DGTP	ácido nucléico	Cd <sup>+2</sup>	otro
UTP	ácido nucléico	floroglucinol	otro
DTTP	ácido nucléico	fucoxantina	otro
histidina	aminoácido	Hg <sup>+2</sup>	otro
lisina	aminoácido	I <sub>2</sub>	otro
arginina	aminoácido	Pb <sup>+2</sup>	otro
glutamato	aminoácido	Se <sup>-2</sup>	otro
glicina	aminoácido	delta-tocoferol	vitamina
isoleucina	aminoácido	alpha-tocoferol	vitamina
alanina	aminoácido	beta-tocoferol	vitamina
aspartato	aminoácido	alfa-Tocotrienol	vitamina
leucina	aminoácido	gamma-Tocoferol	vitamina
fenilalanina	aminoácido	adenosilcobalamina	vitamina
prolina	aminoácido	cianocobalamina	vitamina
serina	aminoácido	cob(I)alamin	vitamina

<sup>9</sup> Espinoza M., Comunicación personal, 2023

## B.2. Metabolitos del metaboloma de algas pardas

Belghit *et al.*, (2017) [78], estudió el metaboloma de 11 especies de algas pardas, reportando un total de 391 metabolitos. De ellos, 247 pudieron ser identificados en MetaCyc [80], que corresponde a la base de datos en la que se construyen los recursos utilizados para el desarrollo de este trabajo. En la Tabla B.2 se muestran estos metabolitos junto con su categoría asignada. También se encuentran en Material suplementario (Tabla S3) con sus IDs de MetaCyc utilizadas en los modelos y su producibilidad.

Tabla B.2: Metabolitos que conforman el metaboloma de algas pardas [78] y su respectiva categoría.

Nombre	Categoría	Nombre	Categoría
1-myristoylglycerol (14:0)	ácido graso	4-acetamidobutanoate	aminoácido
1-palmitoyl-GPA (16:0)	ácido graso	4-guanidinobutanoate	aminoácido
2-hydroxyglutarate	ácido graso	4-hydroxybutyrate (GHB)	aminoácido
2-hydroxystearate	ácido graso	4-imidazoleacetate	aminoácido
3-hydroxybutyrate (BHBA)	ácido graso	4-methyl-2-oxopentanoate	aminoácido
3-hydroxypropanoate	ácido graso	5-methylthioadenosine (MTA)	aminoácido
acetylcarnitine (C2)	ácido graso	5-oxoproline	aminoácido
adipate	ácido graso	agmatine	aminoácido
arachidonate (20:4n6)	ácido graso	alanine	aminoácido
azelate (nonanedioate; C9)	ácido graso	arginine	aminoácido
beta-sitosterol	ácido graso	argininosuccinate	aminoácido
campesterol	ácido graso	asparagine	aminoácido
choline	ácido graso	aspartate	aminoácido
dihomolinoleate (20:2n6)	ácido graso	betaine	aminoácido
dihomolinolenate (20:3n3 or 3n6)	ácido graso	betonidine	aminoácido
docosadienoate (22:2n6)	ácido graso	butyrylcarnitine (C4)	aminoácido
eicosapentaenoate (EPA; 20:5n3)	ácido graso	citruilline	aminoácido
erucate (22:1n9)	ácido graso	cystathionine	aminoácido
fucosterol	ácido graso	cysteine	aminoácido
glutarate (pentanedioate)	ácido graso	cysteine sulfinic acid	aminoácido
glycerol	ácido graso	dimethylarginine (ADMA + SDMA)	aminoácido
glycerophosphoethanolamine	ácido graso	dimethylglycine	aminoácido
glycerophosphoglycerol	ácido graso	ergothioneine	aminoácido
glycerophosphorylcholine (GPC)	ácido graso	gamma-aminobutyrate (GABA)	aminoácido
linoleate (18:2n6)	ácido graso	gamma-glutamylcysteine	aminoácido
linolenate (18:3n3 or 3n6)	ácido graso	glutamate	aminoácido
malonate	ácido graso	glutamine	aminoácido
myristate (14:0)	ácido graso	glutathione, oxidized (GSSG)	aminoácido
myristoleate (14:1n5)	ácido graso	glutathione, reduced (GSH)	aminoácido
palmitate (16:0)	ácido graso	glycine	aminoácido
palmitoleate (16:1n7)	ácido graso	glycylleucine	aminoácido
pentadecanoate (15:0)	ácido graso	histamine	aminoácido
phosphoenolpyruvate (PEP)	ácido graso	histidine	aminoácido
sphinganine	ácido graso	histidinol	aminoácido
stearidonate (18:4n3)	ácido graso	homoarginine	aminoácido
suberate (octanedioate)	ácido graso	homoserine (homoserine lactone)	aminoácido
1-aminocyclopropanecarboxylic acid	aminoácido	hypotaaurine	aminoácido
1-methylguanidine	aminoácido	imidazole lactate	aminoácido
2,3-dihydroxyisovalerate	aminoácido	isoleucine	aminoácido
2-aminoadipate	aminoácido	leucine	aminoácido
2-aminobutyrate	aminoácido	lysine	aminoácido
2-hydroxyadipate	aminoácido	methionine	aminoácido
2-isopropylmalate	aminoácido	methionine sulfoxide	aminoácido
3-methyl-2-oxobutyrate	aminoácido	N-acetylglutamate	aminoácido
3-methyl-2-oxovalerate	aminoácido	N-acetylglutamine	aminoácido

Nombre	Categoría	Nombre	Categoría
3-sulfo-L-alanine	aminoácido	N-acetylhistidine	aminoácido
N-acetylmethionine	aminoácido	isocitrate	carbohidrato
N-acetylphenylalanine	aminoácido	isomaltose	carbohidrato
N-acetylputrescine	aminoácido	itaconate (methylenesuccinate)	carbohidrato
N-acetyltryptophan	aminoácido	lactate	carbohidrato
N-alpha-acetylmethionine	aminoácido	malate	carbohidrato
N-formylmethionine	aminoácido	maleate	carbohidrato
N-methylalanine	aminoácido	maltose	carbohidrato
N-methylglutamate	aminoácido	maltotetraose	carbohidrato
N-methyltryptophan	aminoácido	maltotriose	carbohidrato
N-monomethylarginine	aminoácido	mannitol/sorbitol	carbohidrato
N6,N6,N6-trimethyllysine	aminoácido	mannose	carbohidrato
N6-acetyllysine	aminoácido	myo-inositol	carbohidrato
ornithine	aminoácido	oxalate (ethanedioate)	carbohidrato
phenethylamine	aminoácido	pyruvate	carbohidrato
phenylalanine	aminoácido	ribonate (ribonolactone)	carbohidrato
phenyllactate (PLA)	aminoácido	ribose	carbohidrato
phenylpyruvate	aminoácido	scyllo-inositol	carbohidrato
phosphoethanolamine (PE)	aminoácido	succinate	carbohidrato
pipecolate	aminoácido	sucrose	carbohidrato
proline	aminoácido	tartronate (hydroxymalonate)	carbohidrato
propionylcarnitine (C3)	aminoácido	trans-aconitate	carbohidrato
S-adenosylhomocysteine (SAH)	aminoácido	trehalose	carbohidrato
S-carboxymethyl-L-cysteine	aminoácido	UDP-glucose	carbohidrato
S-methylglutathione	aminoácido	UDP-N-acetylglucosamine	carbohidrato
saccharopine	aminoácido	15-HETE	nucleótido
sarcosine (N-Methylglycine)	aminoácido	2'-deoxyadenosine	nucleótido
serine	aminoácido	2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate	nucleótido
spermidine	aminoácido	2'-deoxycytidine	nucleótido
stachydrine	aminoácido	dCMP	nucleótido
sulfate*	aminoácido	2'-deoxyguanosine	nucleótido
taurine	aminoácido	2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)	nucleótido
taurocyamine	aminoácido	2'-deoxyinosine	nucleótido
threonine	aminoácido	2'-deoxyuridine	nucleótido
hydroxyproline	aminoácido	3-aminoisobutyrate	nucleótido
trans-urocanate	aminoácido	3-ureidopropionate	nucleótido
tryptamine	aminoácido	5-hydroxymethyluracil	nucleótido
tryptophan	aminoácido	8-hydroxyguanine	nucleótido
tyramine	aminoácido	adenine	nucleótido
tyrosine	aminoácido	adenosine	nucleótido
valine	aminoácido	2'-AMP	nucleótido
1-kestose	carbohidrato	adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)	nucleótido
2-methylcitrate	carbohidrato	3'-AMP	nucleótido
3-phosphoglycerate	carbohidrato	adenosine-2',3'-cyclic monophosphate	nucleótido
6-phosphogluconate	carbohidrato	adenylosuccinate	nucleótido
alpha-ketoglutarate	carbohidrato	allantoic acid	nucleótido
cis-aconitate	carbohidrato	allantoin	nucleótido
citramalate	carbohidrato	beta-alanine	nucleótido
citrate	carbohidrato	cytidine	nucleótido
erythritol	carbohidrato	cytidine 2',3'-cyclic monophosphate	nucleótido
fructose	carbohidrato	3'-CMP	nucleótido
fumarate	carbohidrato	CMP	nucleótido
galactonate	carbohidrato	cytosine	nucleótido
gluconate	carbohidrato	ectoine	nucleótido
glucose	carbohidrato	guanine	nucleótido
glycerate	carbohidrato	guanosine	nucleótido
5'- GMP	nucleótido	caffeate	otro
guanosine-2',3'-cyclic monophosphate	nucleótido	deoxycarnitine	otro

Nombre	Categoría	Nombre	Categoría
hypoxanthine	nucleótido	dihydrobiopterin	otro
inosine	nucleótido	FMN	otro
inosine 5'-monophosphate (IMP)	nucleótido	nicotinate ribonucleoside	otro
N-carbamoylaspartate	nucleótido	quinolinate	otro
1-methyladenosine	nucleótido	salicin	otro
nicotinamide ribonucleotide (NMN)	nucleótido	threonate	otro
orotate	nucleótido	trigonelline (N <sup>1</sup> -methylnicotinate)	otro
pseudouridine	nucleótido	trimethylamine N-oxide	otro
thymidine	nucleótido	alpha-tocopherol	vitamina
TMP	nucleótido	carnitine	vitamina
uracil	nucleótido	delta-tocopherol	vitamina
urate	nucleótido	nicotinamide	vitamina
uridine	nucleótido	nicotinamide riboside	vitamina
uridine 3'-monophosphate (3'-UMP)	nucleótido	nicotinate	vitamina
UMP	nucleótido	pantothenate (Vitamin B5)	vitamina
uridine-2',3'-cyclic monophosphate	nucleótido	pyridoxal	vitamina
xanthine	nucleótido	pyridoxamine	vitamina
3-hydroxy-3-methylglutarate	otro	pyridoxine (Vitamin B6)	vitamina
acetylphosphate	otro	riboflavin (Vitamin B2)	vitamina
benzene-1,3,5-triol	otro	thiamin monophosphate	vitamina
biopterin	otro		

### B.3. Metabolitos totales producibles por *Macrocystis pyrifer* en presencia de la comunidad bacteriana

Los metabolitos que se vuelven producibles por el alga al estar en presencia de la comunidad bacteriana de estudio fueron obtenidos con MiSCoTo (Sección 4.2), resultando un total de 308 metabolitos, los que se muestran en la Tabla B.3. También se encuentran en Material suplementario (Tabla S4) con sus IDs de MetaCyc utilizadas en los modelos y su producibilidad.

Tabla B.3: Metabolitos totales que se vuelven producibles por *Macrocystis pyrifer* en presencia de la comunidad bacteriana.

Nombre	Nombre
5-deoxy-D-ribulose 1-phosphate	catechol
(2R)-ethylmalonyl-CoA	L-idonate
UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-L-lysyl-D-alanine	N1-acetylspermidine
4-(2'-carboxyphenyl)-4-oxobutyryl-CoA	lipid X ( <i>P. putida</i> )
UDP-4-amino-4-deoxy-beta-L-arabinopyranose	CDP-4-dehydro-6-deoxy-alpha-D-glucose
(1E,3E)-4-hydroxybuta-1,3-diene-1,2,4-tricarboxylate	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide
lipid X ( <i>H. pylori</i> )	(2E,11Z)-icosa-2,11-dienoyl-CoA
3-oxo-dodecanoate	3-amino-1-hydroxyacetone 1-phosphate
hydrogen cyanide	O-aminobenzaldehyde
5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradecy-D-glycero-D-galactononulopyranosonate	all-trans-nonaprenyl diphosphate
indole	beta-zeacarotene
coproporphyrin III	CDP-4-dehydro-3,6-dideoxy-alpha-D-glucose
5-amino-6-(D-ribitylamino)uracil	3R-hydroxy-(11Z)-eicos-11-enoyl-CoA
alpha-Kdo-(2->4)-alpha-Kdo-(2->6)-lipid IVA ( <i>H. pylori</i> )	3-oxoadipate
FAD	carosine
UDP-3-O-[(3R)-3-hydroxyhexanoyl]-N-acetyl-alpha-D-glucosamine	5-dehydro-4-deoxy-D-glucarate
FADH2	3-aminopropanal
alpha-D-Man-(1->3)-alpha-D-GlcNAc-PP-undecaprenol	trans-4-hydroxy-L-proline
formamide	lipid X ( <i>E. coli</i> )
citraconate	(2Z,4E)-2-hydroxy-6-oxonona-2,4-diene-1,9-dioate
ferroheme oP2	(1R,2R)-cyclohexa-3,5-diene-1,2-diol
(indol-3-yl)acetate	(3E)-2-oxopent-3-enoate
5-amino-1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)imidazole	beta-D-GlcNAc-(1->4)-Mur2Ac(oyl-L-Ala-gamma-D-Glu-DAP-D-Ala-D-Ala)-PP-Und
ectoine	(1S)-1-phenylethane-1,2-diol
4-hydroxy-5-methyl-2-methylene-3(2H)-furanone	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate
1-pyrroline	alpha-D-Man-(1->3)-alpha-D-Man-(1->3)-alpha-D-Man-(1->3)-alpha-D-GlcNAc-PP-Und
(indol-3-yl)pyruvate	coproporphyrinogen III
L-sorbopyranose	2-hydroxy-2-methylpropanenitrile
spermidine	D-tagaturonate
protoporphyrinogen IX	1,2-dioleoylglycerol
2-(formamido)-N1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)acetamide	thiamine phosphate
phenylacetyl-CoA	N-Formyl-L-kynurenine
phenylacetate	alpha-Kdo-(2->4)-alpha-Kdo-(2->6)-lipid IVA ( <i>E. coli</i> )
formyl-L-isoglutamine	(8S)-8-amino-7-oxononanoate
(11Z)-3-oxoicosa-11-enoyl-CoA	keto-D-fructose
N2-succinyl-L-glutamate 5-semialdehyde	salicylate
(2S,3S)-2-methylcitrate	tryptamine
(indol-3-yl)acetonitrile	a pimeloyl-[acp]
D-sorbitol	4-hydroxy-L-threonine
1-(3-aminopropyl)-pyrrolinium	3-hydroxypropanoate

Nombre	Nombre
beta-D-mannopyranose	Und-PP-Mur2Ac-L-Ala-gamma-D-Glu-DAP-D-Ala-D-Ala
preQ1	(S)-3-aminobutanoyl-CoA
2-oxopent-4-enoate	adenosine 3',5'-bisphosphate
thiamine diphosphate	1-keto-D-chiro-inositol
alpha-D-Man-(1->3)-alpha-D-Man-(1->3)-alpha-D-GlcNAc-PP-Und	D-arabinofuranose 5-phosphate
glycolaldehyde	alpha-Kdo-(2->4)-alpha-Kdo-(2->6)-(octadecanoyl)-lipid IVA (H. pylori)
norspermidine	L-2,4-diaminobutanoate
4-hydroxyphenylglyoxylate	3-hydroxypropanoyl-CoA
demethylspheroidene	1-piperidine 6-carboxylate
(S)-lactaldehyde	4-hydroxy-3-octaprenylbenzoate
homocarnosine	alpha-Kdo-(2->4)-alpha-Kdo-(2->6)-(lauroyl)-lipid IVA (P. putida)
trans-3-hydroxy-L-proline	1-(2-carboxyphenylamino)-1-deoxy-D-ribose 5-phosphate
Und-PP-Mur2Ac-L-Ala-gamma-D-Glu-L-Lys-D-Ala	3-dehydro-4-phospho-D-erythronate
L-tryptophan	2-octaprenylphenol
alpha-Kdo-(2->4)-alpha-Kdo-(2->6)-(lauroyl)-lipid IVA (E. coli)	N2-succinylglutamate
L-lysine	tartronate semialdehyde
2-epi-5-epi-valiolone 7-phosphate	1-oleoyl-sn-glycerol 3-phosphate
CMP-N-acetyl-beta-neuraminatate	N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal
4-imidazolone-5-propanoate	protoheme
4-aminobutanal	(1S,2R)-1-C-(indol-3-yl)glycerol 3-phosphate
meso-diaminopimelate	alpha-Kdo-(2->4)-alpha-Kdo-(2->6)-lipid IVA (P. putida)
(S)-4-hydroxymandelonitrile	3,4-didehydrohodopin
2-oxoadipate	2-dehydro-3-deoxy-L-rhamnonate
lipid A disaccharide (E. coli)	7-chloro-L-tryptophan
(2S,4S)-4-hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA
3-[(1-carboxyvinyl)oxy]benzoate	Und-PP-beta-D-GlcNAc-(1->4)-Mur2Ac-L-Ala-gamma-D-Glu-L-Lys-D-Ala
aldehydo-D-galacturonate	(2S)-methylsuccinyl-CoA
4-phospho-D-erythronate	2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxy-alpha-D-mannopyranose
uroporphyrinogen-I	glutarate semialdehyde
formaldehyde	(4-hydroxyphenyl)acetate
(4,5-dihydro-5-oxofuran-2-yl)-acetate	(R)-methylmalonyl-CoA
lipid A disaccharide (H. pylori)	protoporphyrin IX
3-oxo-5,6-didehydrosuberyl-CoA semialdehyde	5-deoxy-alpha-D-ribose 1-phosphate
FMNH2	2-methyl-6-all-trans-nonaprenyl-1,4-benzoquinol
4-hydroxybenzoate	UDP-2-N-[(3R)-3-hydroxyoctadecanoyl]-3-O-[(3R)-3-hydroxyhexadecanoyl]-alpha-D-glucosamine
1-propanal	2-epi-5-epi-valiolone
alpha-D-GlcNAc-PP-Und	5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxylate
nicotinate	preuroporphyrinogen
(7R,8S)-8-amino-7-(carboxyamino)nonanoate	4-phosphoxy-L-threonine
2-nonaprenylphenol	methylmalonate semialdehyde
5-dehydro-D-gluconate	carbon monoxide
1D-chiro-inositol	4-oxoglutaramate
3,4-dihydroxy-5-all-trans-decaprenylbenzoate	1-oleoyl-2-lyso-glycerone phosphate
5-hydroxyectoine	2-hydroxy-4-oxobutane-1,2,4-tricarboxylate
coproporphyrinogen I	riboflavin
2-hydroxycyclohepta-1,4,6-triene-1-carboxyl-CoA	2-(alpha-hydroxyethyl)thiamine diphosphate
D-arabinitol	D-aspartate
D-ribulose	D-mannopyranose
4-hydroxy-3-decaprenylbenzoate	gamma-carotene
5-hydroxy-L-tryptophan	(2Z,4E,7E)-2-hydroxy-6-oxonona-2,4,7-triene-1,9-dioate
1-pyrroline-2-carboxylate	5'-phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole
histidinal	L,L-diaminopimelate

Nombre	Nombre
7,8-dihydro-8-oxoguanine	3,4-dihydroxy-5-all-trans-octaprenylbenzoate
1-18:1-2-18:1-phosphatidylethanolamine	N-acetyl-D-muramate
4-hydroxy-3-hexaprenylbenzoate	(E)-(4-aminobutylidene)(3-aminopropyl)amine
(2S)-4-acetamido-2-aminobutanoate	4-hydroxy-3-nonaprenylbenzoate
UDP-2-N-[(3R)-3-hydroxydodecanoyl]-3-O-[(3R)-3-hydroxydecanoyl]-alpha-D-glucosamine	2-hydroxy-2-methylpropanoate
N6-(D-glucosyl)-L-lysine	6,7-dimethyl-8-(1-D-ribityl)lumazine
tetrahydropteroate	(2Z)-2-hydroxypenta-2,4-dienoate
(7R,8S)-diaminononanoate	acryloyl-CoA
1-(oleoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	(S)-4-hydroxy-2-oxohexanoate
UDP-3-O-[(3R)-3-hydroxydecanoyl]-alpha-D-glucosamine	(indol-3-yl)ethanol
3-oxo-5,6-didehydrosuberil-CoA	bisoleoyl phosphatidate
propanoyl-CoA	D-ribose 1-phosphate
(S)-2-amino-6-oxohexanoate	uroporphyrinogen-III
(R)-citramalate	2-hydroxy-5-carboxymethylmuconate semialdehyde
1,5-diazabicyclononane	CMP-3-deoxy-beta-D-manno-octulosonate
D-sedoheptulose 1-phosphate	N-formimino-L-glutamate
N2-formyl-N1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)glycinamide	(S)-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate
4-hydroxybenzaldehyde	(2Z)-2,4-dihydroxypent-2-enoate
(2Z,4E)-2-aminomuconate	histidinol
oleate	UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-L-lysine
3-oxohexanoate	sn-glycero-3-phosphoethanolamine
2-aminoacetaldehyde	(3E)-2-oxohex-3-enedioate
pyridoxamine	L-isoglutamine
keto-L-sorbose	(S)-4-hydroxy-2-oxopentanoate
UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine	3,4-dihydroxy-5-all-trans-nonaprenylbenzoate
3-oxooctanoate	2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate
N-(5-phosphoribosyl)-anthranilate	(3R)-3-hydroxy-2-oxo-4-phosphoxybutanoate
L-2-aminoadipate	D-galactopyranuronate
4-(beta-D-ribofuranosyl)hydroxybenzene 5'-phosphate	L-beta-lysine
glutarate	urocanate
2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate 6-phosphate	aldehydo-D-mannose
(11Z)-icosenoyl-CoA	O-phospho-L-homoserine
di-trans,octa-cis-undecaprenyl phosphate	7,8-dihydropyrimidin
(S)-methylmalonyl-CoA	4-methyl-3-oxoadipate
D-proline	styrene oxide
2-methylfumaryl-CoA	rhodopin
D-glucono-1,5-lactone	methanol
2-decaprenylphenol	propane-1,3-diamine
L-aspartate 4-semialdehyde	L-saccharopine
Mg-protoporphyrin	alpha-D-mannopyranose
L-homoserine	UDP-3-O-[(3R)-3-hydroxy-hexadecanoyl]-alpha-D-glucosamine
O-acetyl-L-homoserine	(R)-3-hydroxybutanoate
riboflavin cyclic-4',5'-phosphate	serotonin
glutaryl-CoA	ferroheme o
phenol	isatinate
Fe-coproporphyrin III	N6-acetyl-L-lysine
D-tagatofuranose 6-phosphate	UDP-2-N,3-O-bis[(3R)-3-hydroxytetradecanoyl]-alpha-D-glucosamine
nicotinamide	D-mannitol 1-phosphate
lipid A disaccharide (P. putida)	UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelate
L-histidine	3-deoxy-alpha-D-manno-2-octulosonate
oleoyl-CoA	D-mannitol
propanoate	2-oxepin-2(3H)-ylideneacetyl-CoA

Nombre	Nombre
D-erythro-7,8-dihydroneopterin	UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine
FMN	N-succinyl-L,L-2,6-diaminopimelate
pyridoxamine 5'-phosphate	D-erythrose
enolpyruvoyl-2-diphospho-5'-guanosine	L-iditol
L-alpha-amino-epsilon-keto-pimelate	dethiobiotin
UDP-3-O-[(3R)-3-hydroxymyristoyl]-alpha-D-glucosamine	2-methylacetoacetyl-CoA
5-formamido-1-(5-phospho-D-ribose)-imidazole-4-carboxamide	(1E)-4-oxobut-1-ene-1,2,4-tricarboxylate
Und-PP-Mur2Ac-L-Ala-gamma-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala	(3,4-dihydroxyphenyl)acetate
Und-PP-beta-D-GlcNAc-(1->4)-MurNAc-L-Ala-gamma-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala	D-tagatofuranose 1,6-bisphosphate
(indol-3-yl)acetaldehyde	(3R)-3-hydroxyhexadecanoyl-[acp]

## Anexo C. Generación de archivo *target* a partir de una lista de metabolitos

El Código C.1 corresponde a un script de Python que se utiliza para generar un nuevo archivo *target* en formato SBML (`new_target.SBML`) a partir de una lista de metabolitos en un archivo de texto (`metabolitos.txt`). En este trabajo se utilizó para crear un *target* con los metabolitos encargados del crecimiento de biomasa, los que forman parte del metaboloma de alga parda y los metabolitos totales que el alga es capaz de producir en su integración con el holobionte.

Código C.1: Script para generar archivo *target* en formato SBML

```
1 met=[]
2 with open('metabolitos.txt','r') as file:
3     for line in file:
4         met+=[line.strip()[:-1]]
5     n=len(met)
6     print(n)
7     file.close()
8
9 with open('new_target.SBML','w') as target:
10    target.write('<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>'+'\n'+<sbml xmlns="http://
    ↪ www.sbml.org/sbml/level2" level="2" version="1">'+'\n'+<model id="Target">'+
    ↪ \n'+<listOfCompartments>'+'\n'+<compartment id="c"/>'+'\n'+</
    ↪ listOfCompartments>'+'\n'+<listOfSpecies>'+'\n')
11    for i in range(0,n):
12        target.write('<species id='+met[i]+' compartment="c"/>'+'\n')
13    target.write('</listOfSpecies>'+'\n'+</model>'+'\n'+</sbml>')
14    target.close()
```

## Anexo D. Instalación de herramientas

### D.1. Prokka

Prokka es un paquete de Bioconda que está disponible para los sistemas operativos basados en Unix (MacOS y Linux), por tanto, se utiliza el Subsistema de Windows para Linux (WSL), que permite ejecutar herramientas de la línea de comandos de Linux directamente en Windows, en este caso se utiliza Ubuntu 22.04. Para instalar este paquete, primero se descarga e instala Ubuntu 22.04 LTS desde su página web<sup>10</sup> o en Microsoft Store y se descarga el instalador de Anaconda en su versión para Linux desde su página web<sup>11</sup>, que debe guardarse en la carpeta Ubuntu.

Para instalar y configurar Bioconda se utilizan los siguientes códigos desde la ventana de comandos de Ubuntu:

Código D.1: Instalación de Bioconda

```
1 bash Anaconda3-2023.09-0-Linux-x86_64.sh #Nombre del instalador descargado
2 conda config --add channels bioconda
3 conda config --add channels conda-forge
4 conda config --show channels #Verificar los canales cargados
```

Finalmente se instala Prokka con los siguientes comandos:

Código D.2: Instalación de Prokka

```
1 conda create -n prokka -c bioconda -c conda-forge
2 conda install -c bioconda prokka
```

Para más información acerca del uso de la herramienta se puede consultar su repositorio de GitHub<sup>12</sup>.

### D.2. Pathway Tools

La instalación de Pathway Tools requiere obtener la licencia académica, que se solicita a través de su página web<sup>13</sup>, ingresando la información académica y de contacto del solicitante. La respuesta puede demorar unos días y se entrega por correo electrónico. Una vez conseguida la licencia se descarga el instalador para Windows (.exe) y se deben seguir los pasos de la guía oficial de instalación<sup>14</sup>. Adicionalmente, se requiere instalar los ejecutables de BLAST<sup>15</sup> en el dispositivo.

<sup>10</sup> Ubuntu <https://ubuntu.com/download/desktop>

<sup>11</sup> Anaconda <https://www.anaconda.com/download>

<sup>12</sup> GitHub Prokka <https://github.com/tseemann/prokka>

<sup>13</sup> Licencia Pathway Tools <https://bioinformatics.ai.sri.com/ptools/licensing/ptools-license-intermediate.shtml>

<sup>14</sup> Guía de instalación <https://bioinformatics.ai.sri.com/ptools/installation-guide/released/windows.html>

<sup>15</sup> Ejecutables BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/doc/blast-help/downloadblastdata.html>

## Anexo E. Documentación de problema en el uso de herramienta Memote

El uso de la herramienta Memote puede ser interrumpida por el error “`ImportError: Failed to initialize: Bad git executable.`”, que se puede solucionar con el siguiente comando:

```
1 set GIT_PYTHON_REFRESH=quiet
```

Para más información acerca del uso del paquete se puede consultar su repositorio de GitHub<sup>16</sup>.

## Anexo F. Reparación de archivos GenBank

Los archivos GenBank (`.gbk`) generados tras la anotación de los genomas con Prokka presentan una anomalía en los identificadores de genes (LOCUS). Consiste en que el nombre del gen se encuentra unido al número de pares de bases, que debieran estar separados con un espacio. Esta anomalía se presenta en todos los genes de cada archivo `.gbk` generado con Prokka. A continuación se muestra un ejemplo de la configuración que presenta la anomalía (F.1) y la configuración correcta (F.2).

Código F.1: Configuración incorrecta (anomalía)

```
1 LOCUS      BSI__Mpyr_F_CT1__k141_103606 3266 bp  DNA linear      11-APR-2023
```

Código F.2: Configuración correcta

```
1 LOCUS      BSI__Mpyr_F_CT1__k141_1036063266 bp  DNA linear      11-APR-2023
```

Se solucionó este problema creando un script de Python (Código F.3) que genera un nuevo archivo GenBank con los identificadores modificados. Para ello, se lee el nombre de los genes del MAG correspondiente y se compara con el del archivo GenBank generado con Prokka, con el fin de identificar dónde debiera estar el espacio y se agrega.

Código F.3: Script para reparar archivos GenBank

```
1 import sys
2 import os
3
4 def get_name(line):
5     name = ''
6     line = line[1:]
7     for word in line:
8         if word != ' ' and word != '\n':
9             name += word
10        else:
11            break
12    return name
```

<sup>16</sup> GitHub Memote <https://github.com/opencobra/memote>

```

13
14 def get_id_gen(file_name, gender):
15     name_list = []
16     with open(f'{gender}\ {file_name}.fasta', 'r') as file:
17         for line in file:
18             if line[0] == '>':
19                 name_list.append(get_name(line))
20         file.close()
21     return name_list
22
23 def add_space(line, name):
24     index = line.rfind(name)
25     if index != '-1':
26         index += len(name)
27         if line[index] != ' ':
28             line = line[:index] + ' ' + line[index:]
29         return line
30     else:
31         return 'not found'
32
33 def set_gen_notation_name(file_name, name_list):
34     current_id = 0
35     new_file = ''
36     log = ''
37     with open(f'..\Prokka Annotation\ {file_name}\ {file_name}.gbk', 'r') as file:
38         for line in file:
39             if line[:5] == 'LOCUS':
40                 result = add_space(line, name_list[current_id])
41                 if result != 'not found':
42                     log += f'{name_list[current_id]} encontrado' + '\n'
43                     line = result
44                 else:
45                     log += f'{name_list[current_id]} no fue encontrado' + '\n'
46                     current_id += 1
47                 new_file += line
48             if current_id == len(name_list):
49                 text = f'\tTodos los gen_id fueron encontrados: {current_id}'
50                 log += text
51                 print(text)
52             file.close()
53
54     if not os.path.exists(f'..\Prokka Edited\ {file_name}'):
55         os.mkdir(f'..\Prokka Edited\ {file_name}')
56     with open(f'..\Prokka Edited\ {file_name}\ {file_name}.gbk', 'w') as file:
57         file.write(new_file)
58         file.close()
59     print(f'\tArchivo editado')
60
61     with open(f'..\Prokka Edited\ {file_name}\log.txt', 'w') as file:
62         file.write(log)
63         file.close()
64     print(f'\tLog creado\n')

```

```

65 file_list = os.listdir('M')
66 file_list += os.listdir('F')
67
68
69 print(file_list)
70 for file_id_gen_name in file_list:
71     if file_id_gen_name[-5:] == 'fasta':
72         file_id_gen_name = file_id_gen_name[:-6]
73         print(file_id_gen_name)
74         gender = file_id_gen_name[-1]
75         file_gen_notation = file_id_gen_name[-1] + '_' + file_id_gen_name.upper()[len(
↪ file_id_gen_name)-2]
76
77         gen_name_list = get_id_gen(file_id_gen_name, gender)
78         print(f'\tLa cantidad de id de contigs es: {len(gen_name_list)}')
79
80         set_gen_notation_name(file_gen_notation, gen_name_list)
81 print('script finalizado')

```

Localmente los MAGs se encuentran en carpetas separadas por sexo (**gender**) y los archivos generados con Prokka se encuentran en carpetas según el nombre de la bacteria (**file\_name**). Al agregar los espacios faltantes, se genera un nuevo archivo GenBank editado (**.gbk**), ubicándolo en una nueva carpeta llamada “**Prokka Edited**”. Para ejecutar este script y reconozca los documentos es necesario tener los documentos separados por carpetas como se indicó.

Este error no genera problemas en la etapa de generación de GEMs debido a que se reconocen de manera correcta los genes, pero de todas formas se desea arreglar, ya que se desconoce si podría generar problemas en otras situaciones.

## Anexo G. Generación de PGDB con PathoLogic

La generación de PGDBs con el componente PathoLogic de Pathway Tools se inicia ejecutando el acceso directo **Tier1-v25.5 Lisp** (este nombre depende de la versión). Aparecerá una consola que permite abrir la ventana de navegación (Navigator Window) escribiendo el comando (pt), que muestra un resumen de las bases de datos generadas.

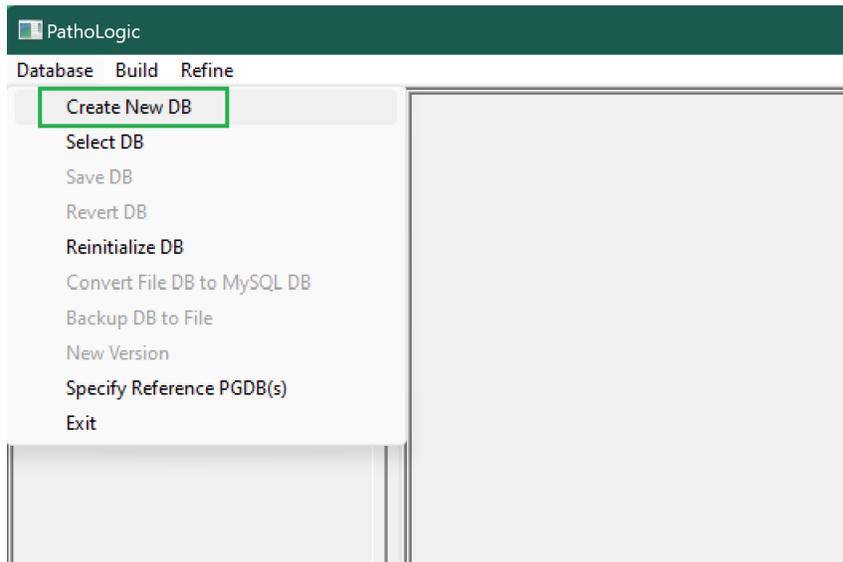
La ventana de PathoLogic se abre pinchando en “Tools” y luego en “PathoLogic”, como se muestra en la imagen.

The screenshot shows the Pathway Tools interface. At the top, there is a menu bar with options: File, Overviews, Pathway, Reaction, Protein, RNA, Gene, Compound, Chromosome, SmartTables, Omics, Tools, and Help. Below the menu bar, the current database is identified as 'Escherichia coli K-12 substr. MG1655'. Navigation buttons for Home, Back, Forward, and History are visible. The main window displays 'Pathway Tools -- Available Datab' with a table listing various organisms and their associated pathways and genes. A 'Tools' menu is open on the right side, with 'PathoLogic...' highlighted. At the bottom, there is a 'Quick Search' field and a 'Command:' field containing the text 'KB name=M\_LABREZIA\_SP\_DG1229BASE, format=V4-FASL' and '31413 frames loaded]'. A 'Copyright Notice' button is also present.

Organisms	Pathways	Genes (ORF %)	G
<i>Alphaproteobacteria bacterium bin95 strain</i>			
<i>Alphaproteobacteria bacterium strain</i>			
<i>Bauldia litoralis strain</i>			
<i>Cobetia amphilecti strain</i>			
<i>Escherichia coli K-12 substr. MG1655</i>	365	4,692 (11.0%)	
<i>Hyphomicrobiales bacterium strain</i>			
<i>Hyphomonas sp. L-53-1-40 strain</i>			
<i>Labrenzia sp. DG1229 strain</i>			
<i>Labrenzia sp. DG1229 strain</i>			
<i>Mariniblastus fucicola strain</i>			
<i>Maritalea myrionectae strain</i>			
MetaCyc	3,085	15,112 (0.5%)	
<i>Nitratireductor sp. XY-223 strain</i>			
<i>Nitratireductor sp. XY-223 strain</i>			
<i>Phycisphaera mikurensis strain</i>			
<i>Planctomycetaceae bacterium Ga0077529 strain</i>			
<i>Planctomycetes bacterium strain</i>			

Posteriormente se pincha en “DataBase” y en “Create New DB”, que abre una ventana para ingresar la información requerida para generar una nueva base de datos PGDB. Se selecciona como entrada el archivo anotado en formato GenBank (.gbk) o GFF (.gff) y se otorga un identificador a la base de datos del organismo (Organism/Project ID). Luego, se selecciona la taxonomía del organismo dentro de la tabla o ingresando la NCBI Taxonomy ID<sup>17</sup>. Esto se muestra ejemplificado en las siguientes imágenes.

<sup>17</sup> Esta información se puede encontrar en la siguiente página web, ingresando la taxonomía del organismo.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>

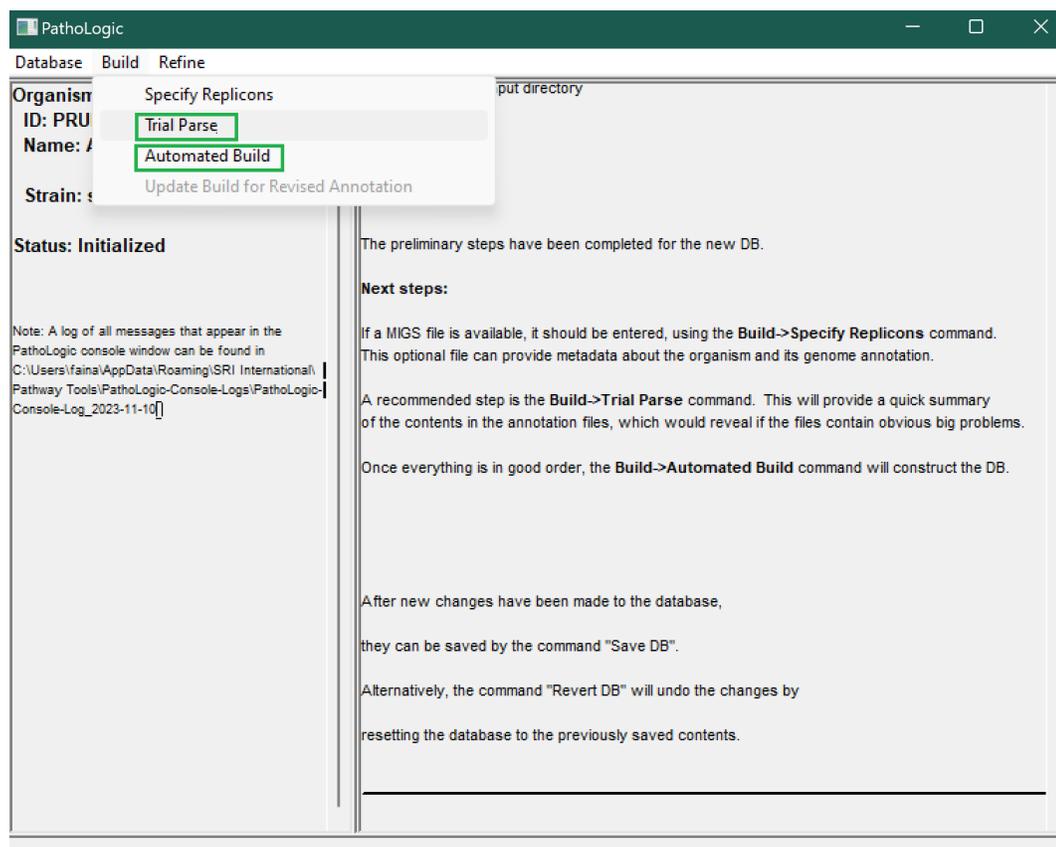


The screenshot shows the 'PathoLogic Project Information' dialog box. It contains several sections for entering project details:

- Database (required):** A text area with instructions: "The simplest (and recommended) mode of building a database is to provide one file (such as .gbff or .gff) that contains all of a genome's functional annotation and nucleotide sequence, including multiple replicons. Alternatively, a directory of annotation files can be chosen, where each file covers one replicon. Using the directory mode will often require more preparatory work by the user." Below this, 'Input File Mode\*' is set to 'Single File'. A 'Please select an annotation file...' note follows. The 'Single File\*' section has a 'Select File:' button and a text field containing 'C:\Users\faina\Escritorio\F\_ALPHAPROTEOBACTERIA\_BACTERIUM.gbkk'.
- Organism/Project ID\*:** A text field containing 'APB1'.
- Version\*:** A text field containing '1.0'.
- DB Storage Type\*:** A dropdown menu set to 'File'.
- Taxonomy (required):**
  - Full Species Name:** A text field containing 'Alphaproteobacteria bacterium'.
  - Strain:** A text field containing 'strain'.
  - Genome Source:** A text field with a note: "This information will be appended to the organism name if needed to distinguish this genome from other sequenced genomes for the same organism. Example value: name of laboratory that performed the sequencing."
  - NCBI taxonomy ID:** A text field containing '1913988'.
  - Rank:** A text field containing 'species'.
  - Phylogenetic Classification:** A text field containing 'cellular organisms -> Bacteria <bacteria> -> Proteobacteria -> Alphaproteobacteria -> unclassified Alphaproteobacteria -> Alphaproteobacteria bacterium'.
  - Default Codon Table:** A dropdown menu set to '11 - Bacterial, Archaeal and Plant Plastid (same as Standard, except for alternate initiation codons)'.
- Credits (optional):** A section with instructions: "Once the database has been saved, credit information can be entered at any time using the PGDB Info Editor. Information types that can be edited include authors, institutions, publications, and project URL. The PGDB Info Editor is reached by right-clicking on the organism name in the title of the database summary page, in the Navigator."

At the bottom of the dialog box, there are 'OK' and 'Cancel' buttons.

Para comprobar que la base de datos se creó de forma correcta, Pathway Tools recomienda pinchar “Build” y luego “Trial Parse”. Una vez finalizado este paso, se construye la PGDB pinchando en “Build” y en “Automated Build”, como se muestra en la siguiente imagen.



Este procedimiento puede tardar varios minutos y puede abrir ventanas de alerta (Warning), pero no impiden la generación de la base de datos. Una vez finalizado, la ventana principal de Pathway Tools muestra el resumen de la base de datos creada, ejemplificado en la siguiente imagen.

Pathway Tools version 26.5

File Overviews Pathway Reaction Protein RNA Gene Compound Chromosome SmartTables Omics Tools Help

Planctomycetes bacterium strain Home Back Forward History Next Answer Clone Save DB

## Pathway Tools -- Available Databases

Organisms	Pathways	Genes (ORF %)	Genome Size (bp)	Citations	Source	Version
<b><i>Alphaproteobacteria bacterium bin95 strain</i></b>	341	4,349 (41.9%)	4,592,164	92	User	1.0
<i>Alphaproteobacteria bacterium strain</i>	283	3,753 (46.6%)	3,878,180	101	User	1.0
<i>Bauldia litoralis strain</i>	372	4,723 (46.4%)	4,974,937	88	User	1.0
<i>Cobetia amphilecti strain</i>	319	3,379 (35.8%)	3,976,172	84	User	1.0
<i>Escherichia coli K-12 substr. MG1655</i>	365	4,692 (11.0%)	4,641,652	42700	Built-In	26.5
<i>Hyphomicrobiales bacterium strain</i>	505	16,755 (45.2%)	17,562,055	89	User	1.0
<i>Hyphomonas sp. L-53-1-40 strain</i>	273	3,461 (49.8%)	3,540,406	92	User	1.0
<i>Labrenzia sp. DG1229 strain</i>	414	6,256 (47.8%)	6,717,030	77	User	1.0
<i>Labrenzia sp. DG1229 strain</i>	422	6,486 (48.3%)	6,963,572	72	User	1.0
<i>Mariniblastus fucicola strain</i>	236	5,735 (69.6%)	7,176,414	93	User	1.0
<i>Maritalea myrionectae strain</i>	306	3,395 (41.8%)	3,414,020	77	User	1.0
<i>MetaCyc</i>	3,085	15,112 ( 0.5%)	0	74200	Built-In	26.5
<i>Nitratireductor sp. XY-223 strain</i>	401	5,497 (44.3%)	5,930,086	76	User	1.0
<i>Nitratireductor sp. XY-223 strain</i>	402	5,532 (44.7%)	5,972,429	69	User	1.0
<i>Phycisphaera mikurensis strain</i>	208	3,445 (60.9%)	3,938,782	80	User	1.0
<i>Planctomycetaceae bacterium Ga0077529 strain</i>	120	2,475 (68.9%)	2,784,584	73	User	1.0
<i>Planctomycetes bacterium strain</i>	222	4,940 (64.6%)	6,555,699	70	User	1.0

Copyright Notice

Quick Search   Current organism for menu-bar commands is now Planctomycetes bacterium strain  
 Command: Show Organism Summary  
 Command: █

## Anexo H. Composición del medio de cultivo

En la Tabla H.1 se muestran los metabolitos que conforman el medio de cultivo (*seed*) utilizado para hacer las predicciones de producción de metabolitos y consorcios mínimos. El detalle de los identificadores de cada uno de estos compuestos se muestra en la Tabla S1 y el archivo *seed* se encuentra adjunto en Material suplementario en formato SBML.

Tabla H.1: Metabolitos que componen el medio de cultivo utilizado (*seed*).

Nombre	Nombre
Oxidized electron carrier	GTP
Soluble acyl-carrier protein	HCL
ADP	H2
Ammonia	Hydrogen peroxide
Ammonium	K+
AMP	Mg+2
ATP	Mn+2
Biotin	Na+
Ca+2	NAD+ / NADP+
CO2	NAD
Cl-	NADH / NADPH
Coenzyme A	NADH
Sodium nitrate	NADP
Dihydrogen phosphate	NADPH
Molybdate	nitrate
Cobalt chloride	O2
Manganese chloride	Phosphate
Cu+	Diphosphate
Cu+2	Proton
Reduced two electron carrier	Sulfate
EDTA	Thiamine
Fe+2	UDP
GDP	Agua
Glycerol 3-phosphate	ZN+2

# Anexo I. Comparación en el número de genes en GEMs bacterianos

Los GEMs bacterianos poseen una gran diferencia entre la cantidad de genes codificantes y no codificantes, tal como se muestra en la Figura I.1.

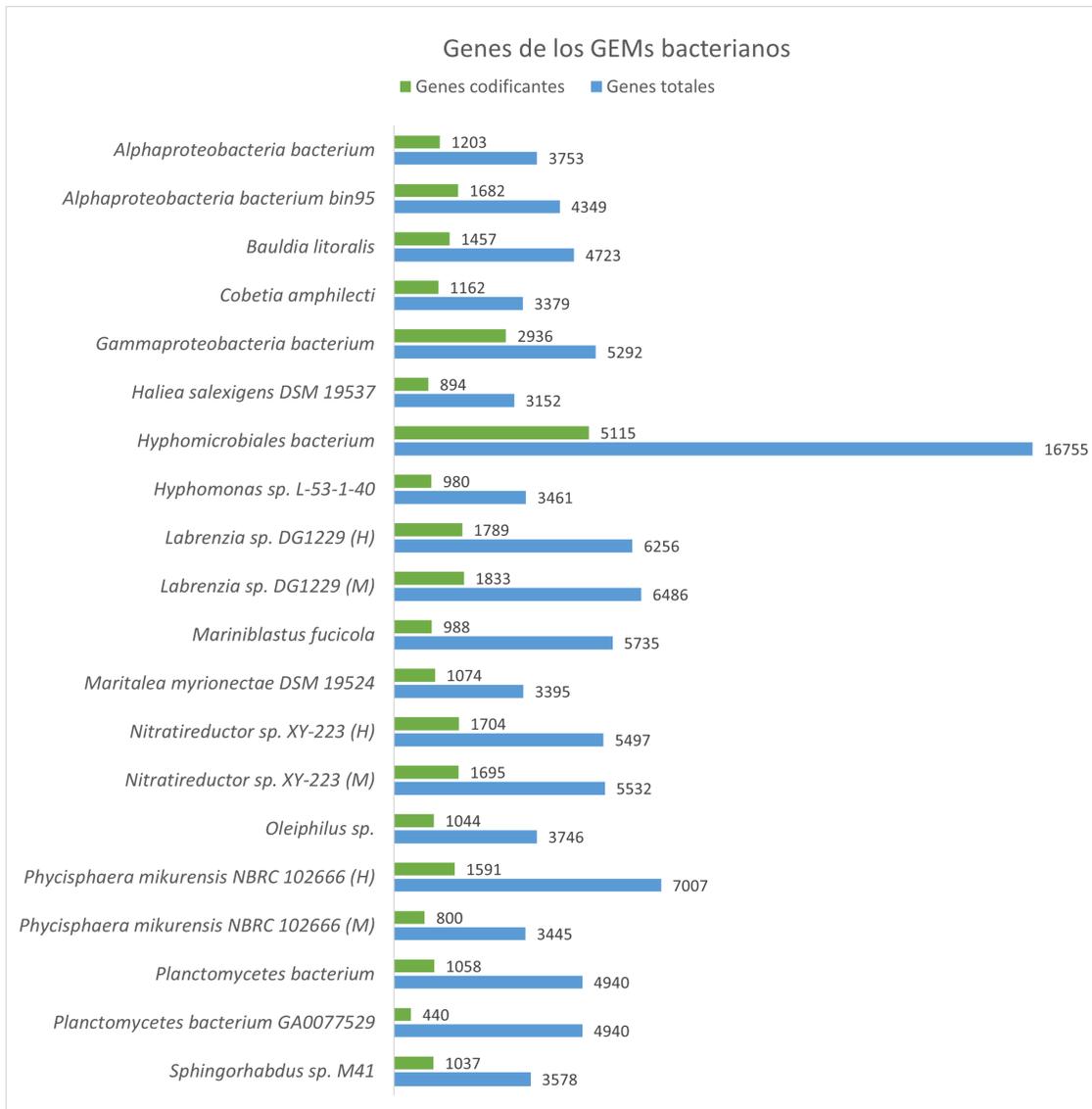


Figura I.1: Genes codificantes y no codificantes en GEMs de bacterias.

## Anexo J. Presencia de metabolitos no producibles en los GEMs

Al calcular la capacidad metabólica del alga en su integración con el holobionte se analizó la producibilidad de los metabolitos definidos como objetivos metabólicos, que corresponden a los encargados del crecimiento de biomasa de *M. pyrifera* y los que conforman el metaboloma de alga parda [78]. Con esto se logró identificar los metabolitos que no son producibles en el holobionte, por lo que se determinan cuáles de ellos están definidos en los GEMs y cuáles no.

### J.1. Metabolitos de biomasa de *M. pyrifera*

De los 50 metabolitos encargados del crecimiento de biomasa del alga, 22 de ellos no son producibles, ya sea de manera individual y en presencia de la comunidad bacteriana. En la Tabla J.1 se muestran estos metabolitos y se indica si se encuentran o no definidos en los GEMs de alga y bacterias.

Tabla J.1: Análisis de presencia de los metabolitos que forman la biomasa de *M. pyrifera* que no son producibles por el alga en los GEMs utilizados.

Nombre	¿Definido en GEM alga?	¿Definido en GEMs
ácido linoleico	SI	SI
ácido linoénico	SI	SI
DTTP	SI	SI
cisteína	SI	SI
metionina	SI	SI
alginato	NO	NO
callosa	NO	NO
arsenato	NO	SI
Cd <sup>+2</sup>	SI	SI
floroglucinol	NO	NO
fucoxantina	NO	NO
Hg <sup>+2</sup>	NO	SI
I <sub>2</sub>	NO	NO
Pb <sup>+2</sup>	NO	NO
Se <sup>-2</sup>	SI	SI
alpha-tocoferol	SI	NO
beta-tocoferol	SI	NO
alpha-Tocotrienol	SI	NO
gamma-Tocoferol	SI	NO
adenosilcobalamina	SI	SI
cianocobalamina	SI	NO
cob(I)alamin	SI	SI

## J.2. Metabolitos que forman parte del metaboloma de algas pardas

De los 247 metabolitos que conforman el metaboloma de alga parda mencionados anteriormente, 116 de ellos no son producibles, ya sea de manera individual y en presencia de la comunidad bacteriana. En la Tabla J.2 se muestran estos metabolitos y se indica si se encuentran o si definidos en los GEMs de alga y bacterias.

Tabla J.2: Análisis de presencia de los metabolitos que conforman el metaboloma de algas pardas que no son producibles por el alga en los GEMs utilizados.

Nombre	¿Definido en GEM alga?	¿Definido en GEMs bacterias?
1-myristoylglycerol (14:0)	NO	SI
2-hydroxyglutarate	NO	NO
2-hydroxystearate	NO	NO
acetylcarnitine (C2)	SI	NO
arachidonate (20:4n6)	SI	SI
azelate (nonanedioate; C9)	NO	NO
beta-sitosterol	NO	NO
campesterol	NO	SI
choline	SI	SI
dihomolinoleate (20:2n6)	NO	NO
dihomolinolenate (20:3n3 or 3n6)	SI	NO
docosadienoate (22:2n6)	NO	NO
eicosapentaenoate (EPA; 20:5n3)	SI	SI
erucate (22:1n9)	NO	NO
fucosterol	NO	NO
glycerophosphoglycerol	SI	SI
glycerophosphorylcholine (GPC)	SI	SI
linoleate (18:2n6)	SI	SI
linolenate (18:3n3 or 3n6)	NO	NO
malonate	NO	SI
myristoleate (14:1n5)	NO	NO
pentadecanoate (15:0)	NO	NO
stearidonate (18:4n3)	NO	NO
suberate (octanedioate)	NO	NO
1-aminocyclopropanecarboxylic acid	SI	SI
1-methylguanidine	NO	NO
2-aminobutyrate	NO	NO
2-hydroxyadipate	NO	NO
3-sulfo-L-alanine	SI	SI
4-acetamidobutanoate	NO	NO
4-imidazoleacetate	NO	NO
5-methylthioadenosine (MTA)	SI	SI
betaine	SI	SI
betonicine	NO	SI
butyrylcarnitine (C4)	SI	NO

Nombre	¿Definido en GEM alga?	¿Definido en GEMs bacterias?
cystathionine	SI	SI
cysteine	SI	SI
cysteine sulfinic acid	SI	SI
dimethylarginine (ADMA + SDMA)	SI	SI
dimethylglycine	SI	SI
ergothioneine	SI	SI
gamma-glutamylcysteine	SI	SI
glutathione, oxidized (GSSG)	SI	SI
glutathione, reduced (GSH)	SI	SI
glycylleucine	NO	NO
histamine	NO	NO
homoarginine	NO	NO
hypotaurine	SI	SI
imidazole lactate	SI	SI
methionine	SI	SI
methionine sulfoxide	SI	SI
N-acetylglutamine	NO	NO
N-acetylhistidine	NO	NO
N-acetylmethionine	SI	SI
N-acetylphenylalanine	NO	NO
N-acetyltryptophan	NO	NO
N-formylmethionine	NO	NO
N-methylalanine	NO	NO
N-methylglutamate	NO	SI
N-methyltryptophan	SI	NO
N-monomethylarginine	NO	NO
N6,N6,N6-trimethyllysine	SI	NO
phenyllactate (PLA)	SI	SI
pipecolate	SI	SI
propionylcarnitine (C3)	SI	NO
S-adenosylhomocysteine (SAH)	SI	SI
S-carboxymethyl-L-cysteine	NO	NO
S-methylglutathione	NO	SI
sarcosine (N-Methylglycine)	NO	NO
stachydrine	NO	SI
sulfate*	NO	NO
taurine	SI	SI
taurocyamine	NO	NO
1-kestose	NO	NO
citramalate	NO	SI
isocitrate	NO	NO
isomaltose	SI	SI
itaconate (methylenesuccinate)	SI	SI
maltose	SI	SI
maltotetraose	NO	NO
maltotriose	SI	SI

Nombre	¿Definido en GEM alga?	¿Definido en GEMs bacterias?
oxalate (ethanedioate)	SI	SI
ribonate (ribonolactone)	NO	NO
tartronate (hydroxymalonate)	NO	NO
trans-aconitate	SI	SI
trehalose	NO	SI
15-HETE	NO	NO
3-aminoisobutyrate	NO	NO
5-hydroxymethyluracil	SI	NO
2'-AMP	NO	NO
3'-AMP	NO	SI
adenosine-2',3'-cyclic monophosphate	NO	SI
cytidine 2',3'-cyclic monophosphate	NO	SI
3'-CMP	NO	SI
guanosine-2',3'-cyclic monophosphate	NO	SI
1-methyladenosine	NO	NO
pseudouridine	SI	SI
thymidine	SI	SI
TMP	SI	SI
urate	NO	NO
uridine 3'-monophosphate (3'-UMP)	NO	SI
uridine-2',3'-cyclic monophosphate	NO	SI
3-hydroxy-3-methylglutarate	NO	NO
benzene-1,3,5-triol	NO	NO
biopterin	NO	NO
caffeate	NO	NO
deoxycarnitine	SI	SI
dihydrobiopterin	NO	SI
FMN	SI	SI
salicin	NO	NO
threonate	NO	SI
trigonelline (N'-methylnicotinate)	NO	NO
trimethylamine N-oxide	NO	SI
alpha-tocopherol	SI	NO
carnitine	SI	SI
pantothenate (Vitamin B5)	SI	SI

### J.3. Vitaminas totales

La unión entre las vitaminas de crecimiento de biomasa de *M. pyrifera* y las de que conforman el metaboloma de alga parda generan un conjunto de 18 vitaminas, de las cuales 9 no son producibles por el alga, ya sea de manera individual y en presencia de la comunidad bacteriana. en la Tabla J.3 se muestran estas vitaminas y se indica si se encuentran o no definidas en los GEMs del alga y bacterias.

Tabla J.3: Análisis de presencia de vitaminas totales de *M. pyrifera* que no son producibles por el alga en los GEMs utilizados.

Nombre	¿Definido en GEM alga?	¿Definido en GEM bacterias?
alpha-tocopherol	SI	NO
beta-tocopherol	SI	NO
alpha-Tocotrienol	SI	NO
gamma-Tocopherol	SI	NO
adenosilcobalamina	SI	SI
cianocobalamina	SI	NO
carnitine	SI	SI
cob(I)alamin	SI	SI
pantothenate	SI	SI

## Anexo K. Vías metabólicas de interés

Se realizó una inspección manual de las reacciones metabólicas en las que participan los metabolitos deseados para conocer los motivos de su producción. Para una mejor comprensión, en esta sección se muestran algunas de las vías metabólicas de la base de datos MetaCyc en las que forman parte [80]. Se detallan los identificadores (IDs) de las reacciones y las vías metabólicas.

- **Ácido oleico:** La reacción de interés corresponde a la 3.1.2.2 (RXN-9666) y forma parte de la biosíntesis de ácido oleico, mostrada en la Figura K.1 (PWY-5996).

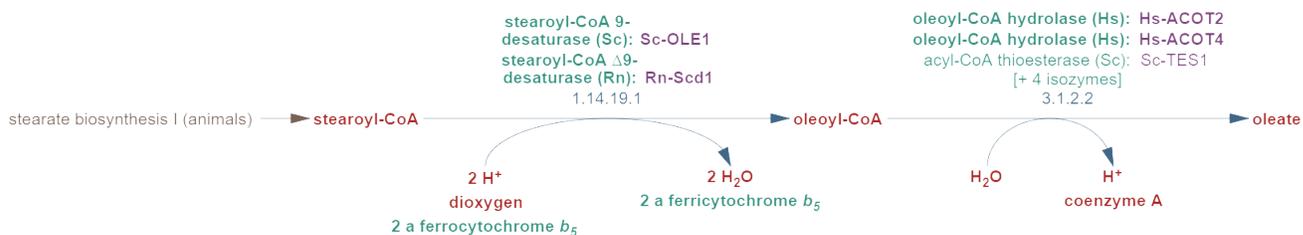


Figura K.1: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de ácido oleico [80].

- **Histidina:** La histidina se produce en la reacción 1.1.1.23 (HISTALDEHYD-RXN) que forma parte de la biosíntesis de histidina (HISTSYN-PWY), mostrada en la Figura K.2. La reacción aportada por la comunidad bacteriana a esta vía es la 3.1.3.15 (HISTIDPHOS-RXN).

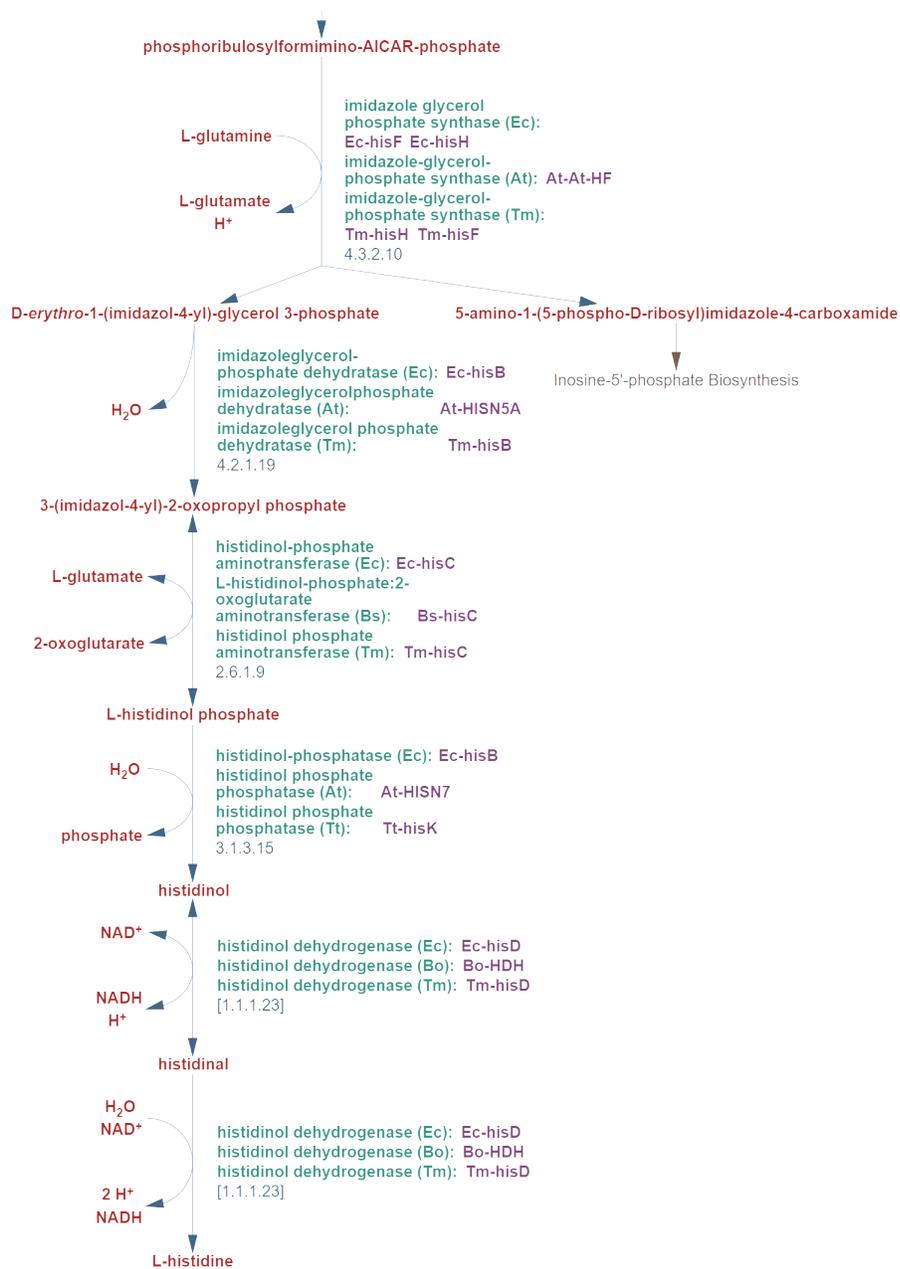


Figura K.2: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de histidina [80].

- **Lisina:** La lisina se produce en la reacción 4.1.1.20 (DIAMINOPIMDECARB-RXN) que forma parte de la biosíntesis de lisina (PWY-5097), mostrada en la Figura K.3. Las reacciones aportadas por la comunidad bacteriana a esta vía son 1.2.1.11 (ASPARTATE-SEMIALDEHYDE-DEHYDROGENASE-RXN) y 5.1.1.7 (DIAMINOPIMEPIM-RXN).



Figura K.3: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de lisina [80].

- **Manitol:** El manitol se produce en la reacción 3.1.3.22 (MANNITOL-1-PHOSPHATASE-RXN) que forma parte del ciclo del manitol (PWY-6531), mostrado en la Figura K.4. La reacción aportada por la comunidad bacteriana es 1.1.1.17 (MANNPDEHYDROG-RXN).

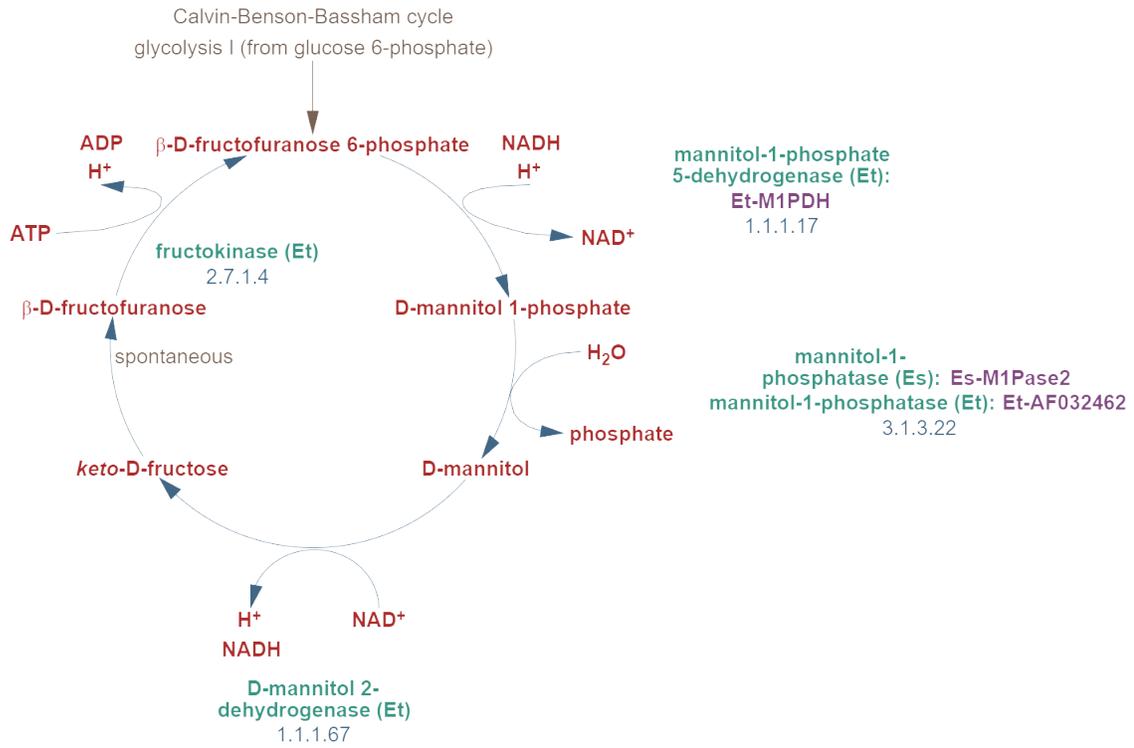


Figura K.4: Vía metabólica correspondiente al ciclo del manitol [80].



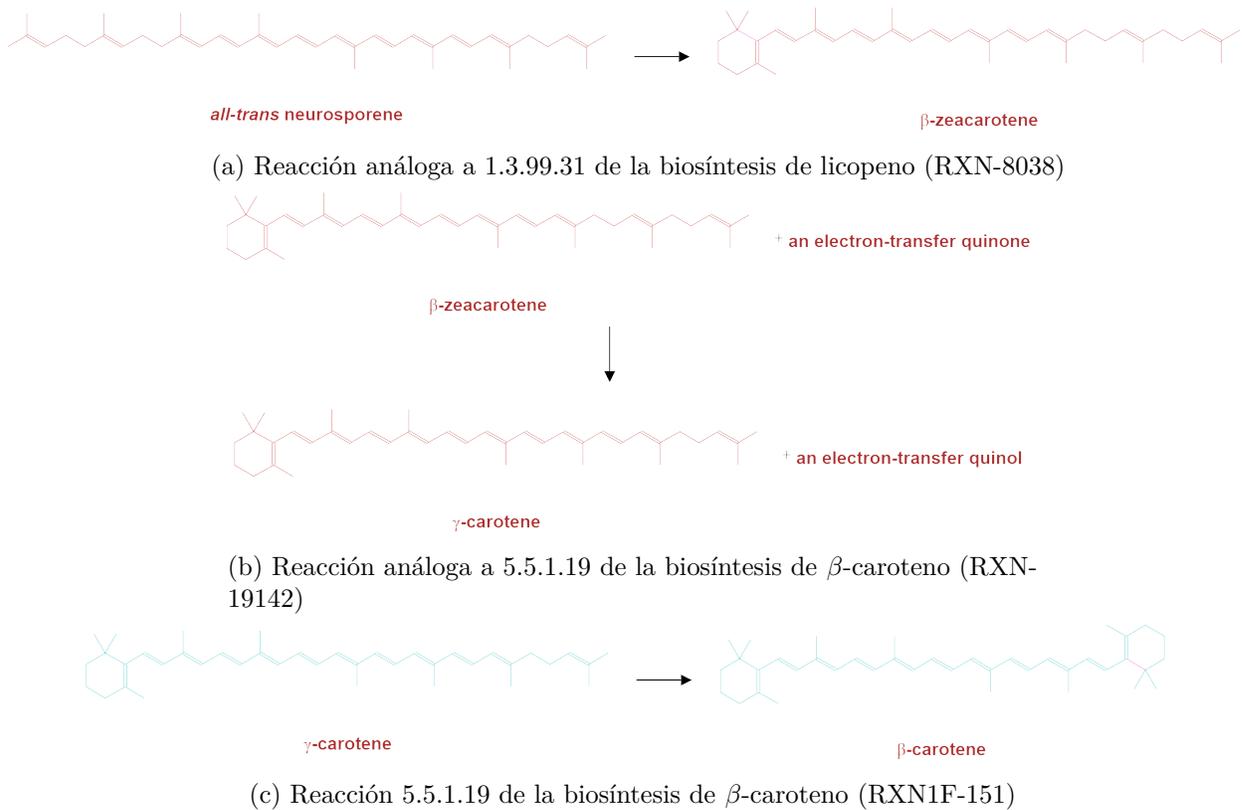


Figura K.6: Reacciones presentes en los GEMs utilizados que permiten la producción de  $\beta$ -caroteno [80].

- **Ácidos linoleico y linolénico:** Los ácidos linoleico y linolénico son producidos en la reacción genérica 3.1.2.20 (THIOESTER-RXN) que forma parte de la vía metabólica de la hidrólisis de acetil-CoA (PWY-5148).

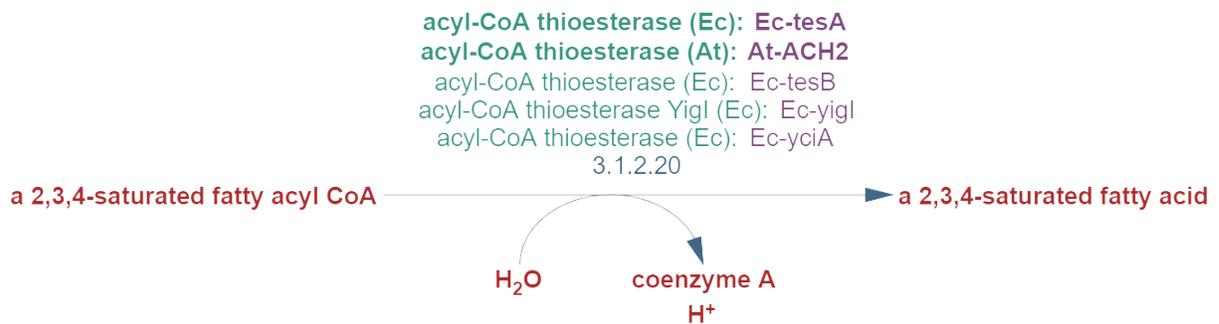


Figura K.7: Vía metabólica correspondiente a la hidrólisis de acetil-CoA [80].

- **Cisteína:** El GEM de *M. pyrifera* contiene tres vías metabólicas para la biosíntesis de cisteína. En una vía inicia con homocisteína y la cisteína se produce en la reacción 4.4.1.1 (Figura K.8) y en otra es una vía que pertenece a mycobacterias, donde la cisteína se produce en la reacción 2.5.1.113 (Figura K.9). En la última, la producción de cisteína inicia con L-serina y ocurre en la reacción 2.5.1.47 (ACSERLY-RXN), presente solo los GEMs bacterianos (Figura K.10).

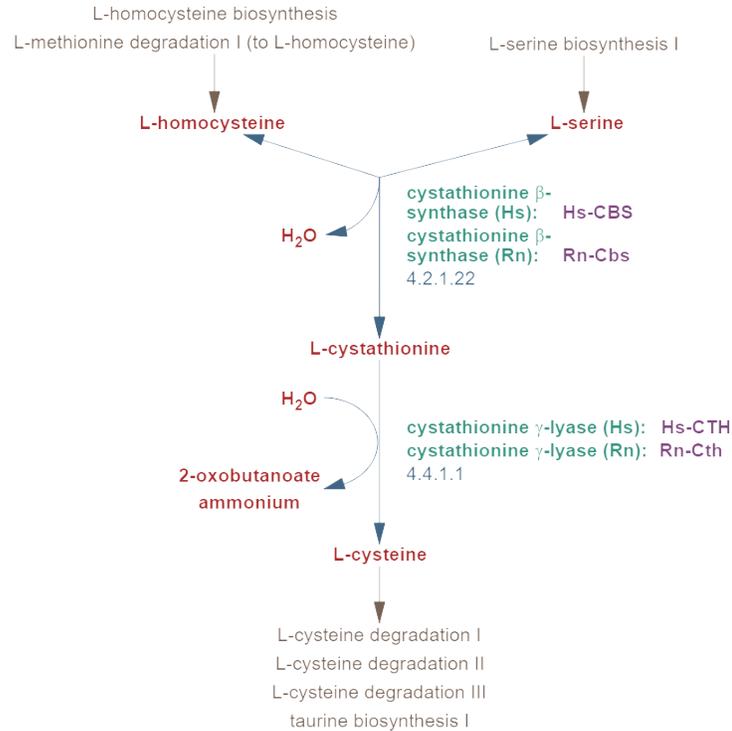


Figura K.8: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de cisteína a partir de homocisteína [80].

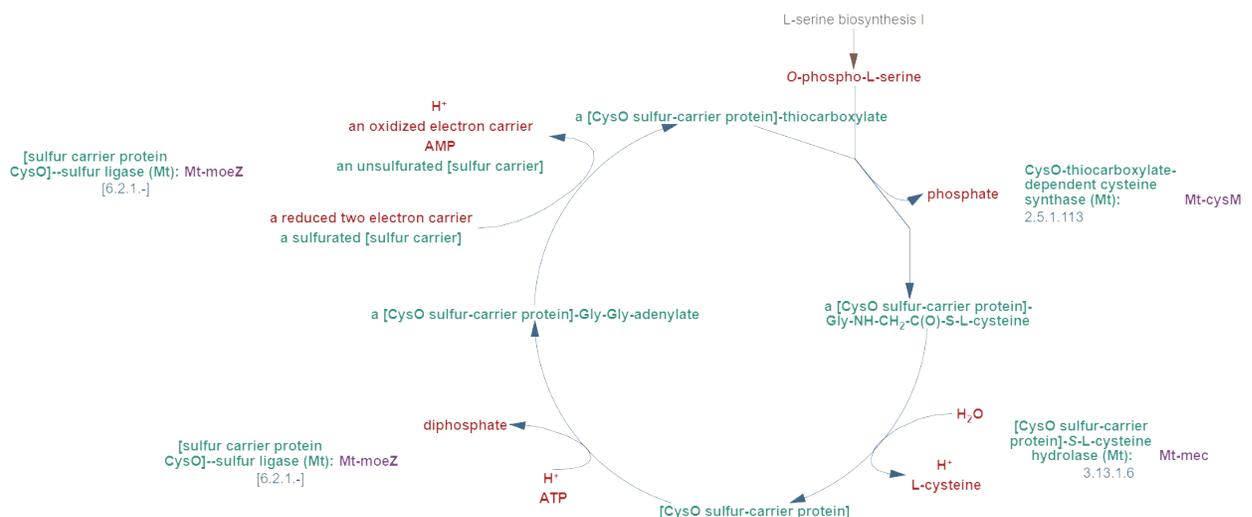


Figura K.9: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de cisteína proveniente de mycobacteria [80].

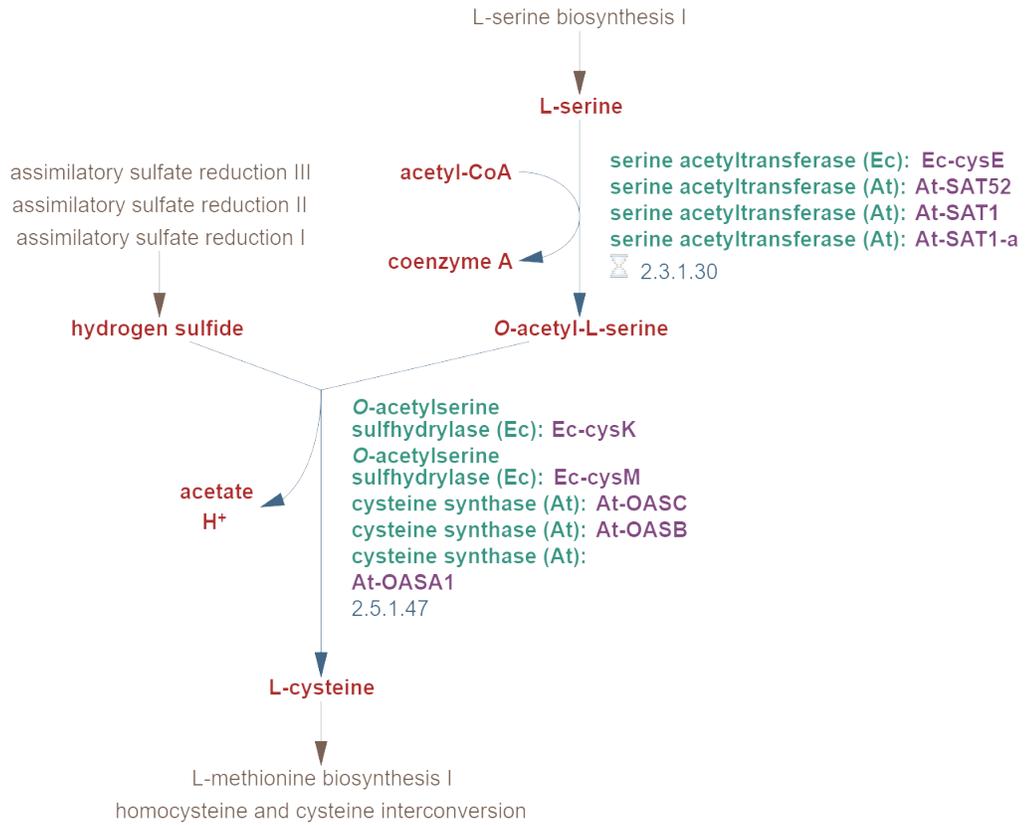


Figura K.10: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de cisteína a partir de L-serina [80].

- Metionina:** La metionina se produce en la reacción 2.1.1.14 (HOMOCYSMET-RXN) que forma parte de la vía metabólica de biosíntesis de metionina (PWY-702), que se muestra en la Figura K.11. Además, hay otra vía de biosíntesis de metionina (HSERMETANA-PWY), mostrada en la Figura K.12, donde es producida en la reacción 2.1.1.14 (HOMOCYSMET-RXN). Esta vía sucede a la vía metabólica de asimilación de sulfato (SO4ASSIM-PWY), mostrada en la Figura K.13. Por otro lado, se puede producir a partir de las reacciones de que conforman la vía metabólica para la regla del extremo Ac/N (PWY-7800), un extracto de ellas se muestran en la Figura K.14.

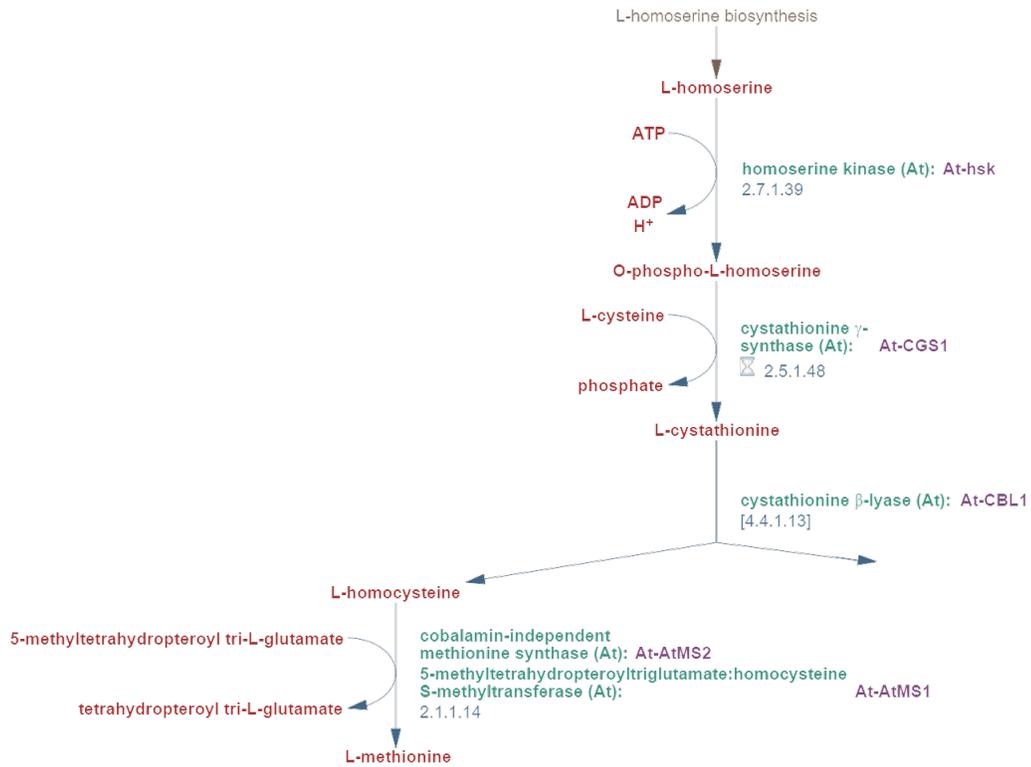


Figura K.11: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de metionina [80].

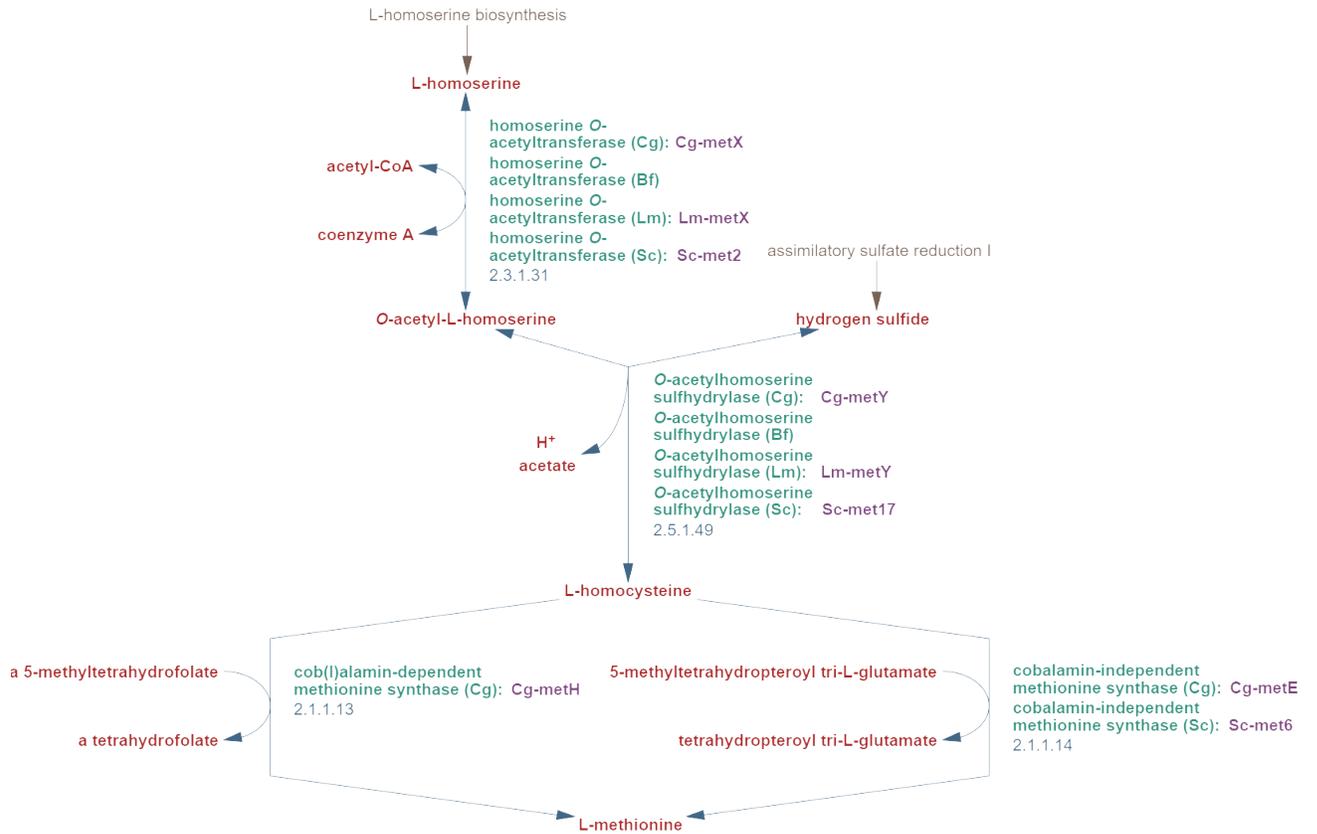


Figura K.12: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de metionina acoplada a vía de asimilación de sulfato [80].

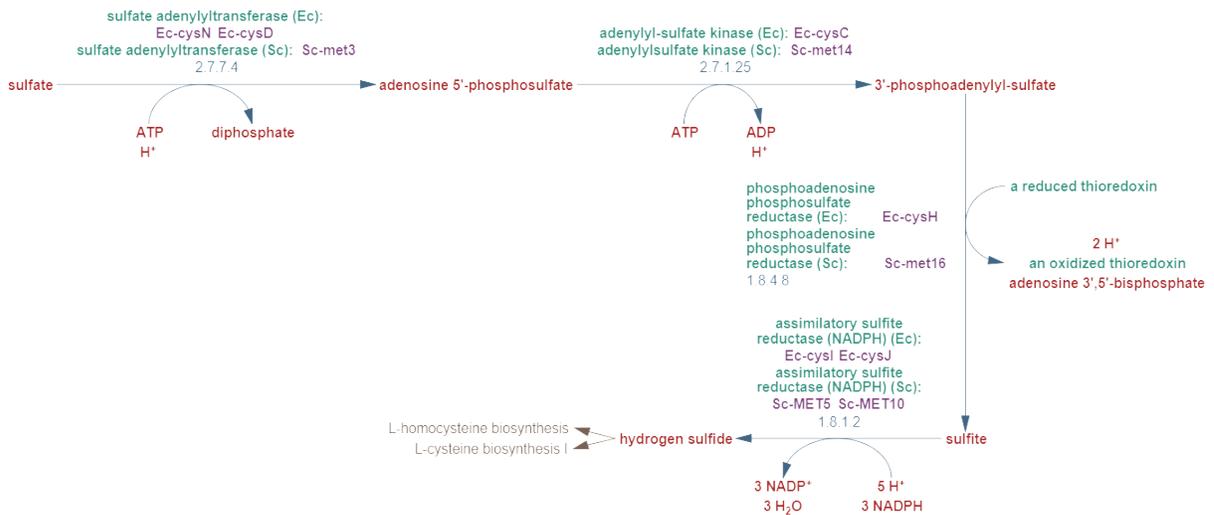


Figura K.13: Vía metabólica correspondiente a la asimilación de sulfato [80].

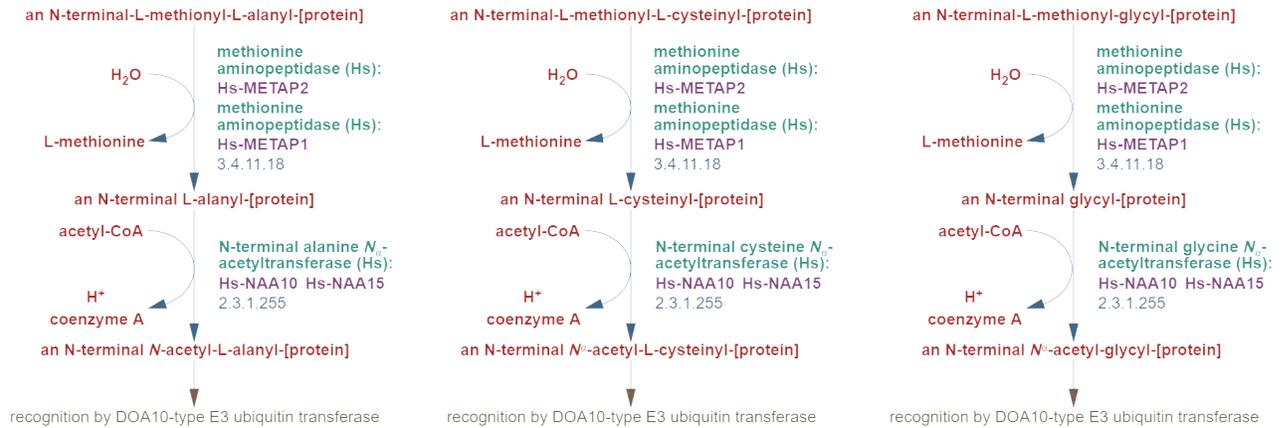


Figura K.14: Vía metabólica correspondiente a la regla del extremo Ac/N [80].

- **Tocoferoles:** Las vitaminas  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol son producidos en la vía metabólica de biosíntesis de tocoferoles, mostrada en el Figura K.15. El  $\alpha$ -tocoferol se produce en la reacción 2.1.1.95 (TOCOPHEROL-O-METHYLTRANSFERASE-RXN) a partir de  $\gamma$ -tocoferol, que se produce en la reacción 5.5.1.24 (RXN-2543). En el otro lado de la vía, el  $\beta$ -tocoferol también se produce en 2.1.1.95, pero a partir de  $\delta$ -tocoferol, que se produce en 5.5.1.24.

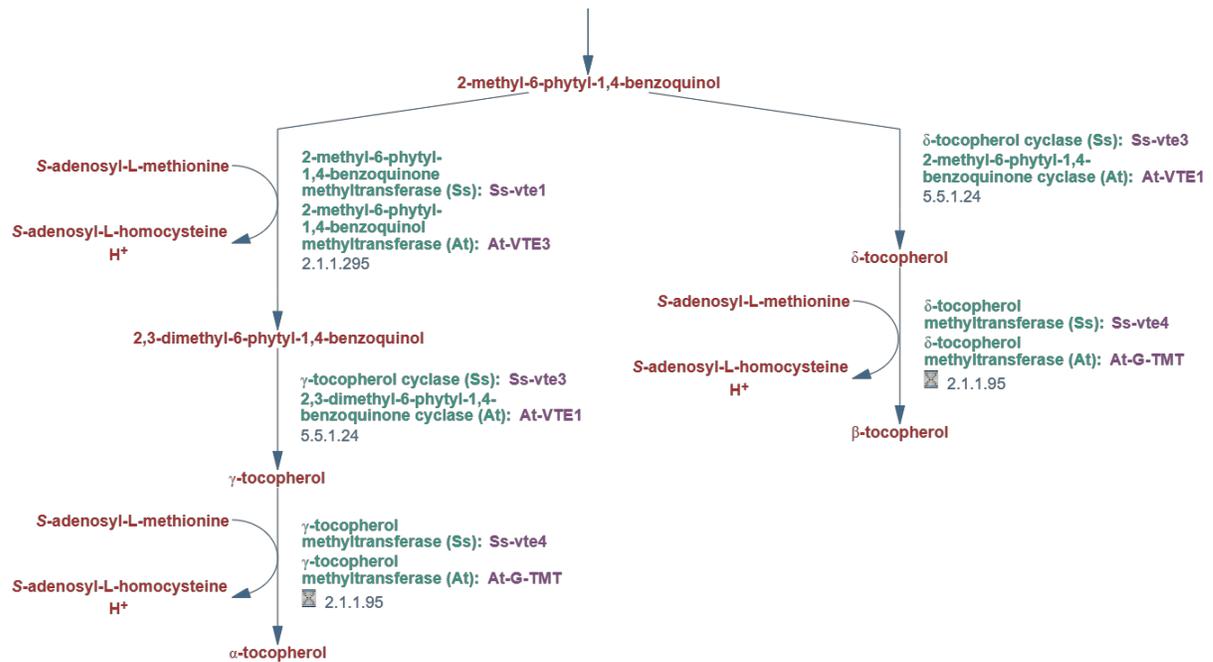


Figura K.15: Extracto de la vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de tocoferoles [80].

- **$\alpha$ -tocotrienol**: La vitamina  $\alpha$ -tocotrienol es producido en la reacción 2.1.1.95 (RXN-14918) de la vía metabólica de biosíntesis de tocotrienoles (PWY-7436), mostrada en la Figura K.16.

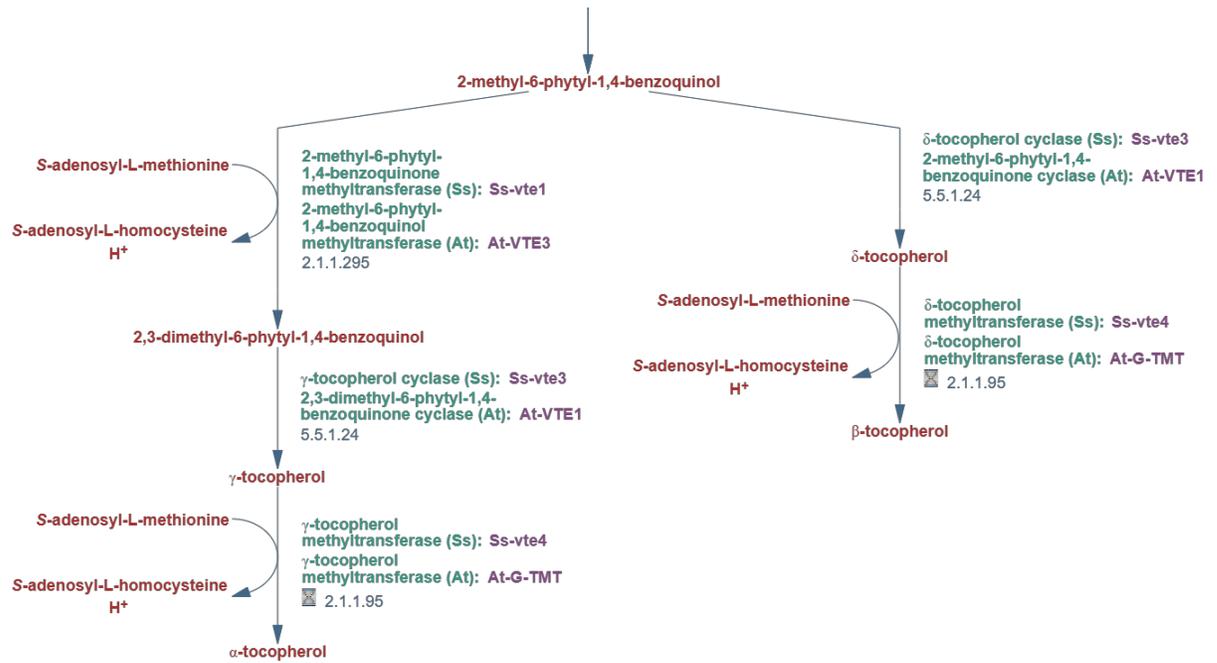


Figura K.16: Extracto de la vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de tocotrienoles [80].





- **Riboflavina:** Esta vitamina se produce en la reacción 2.5.1.9 (RXN-14046) de la vía metabólica de biosíntesis de flavina (RIBOSYN2-PWY), mostrada en la Figura K.19.

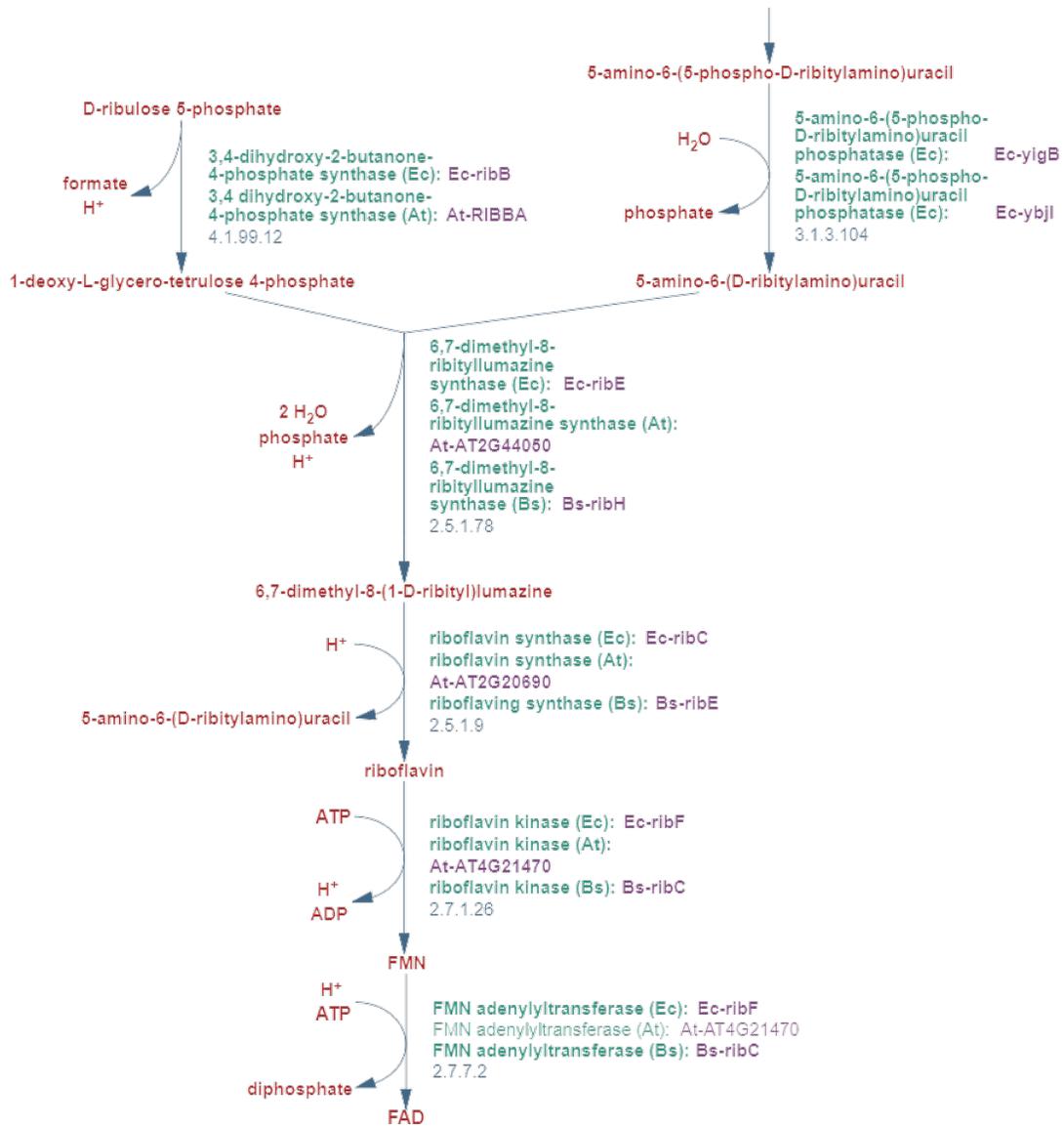


Figura K.19: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de flavina [80].

- **Tiamina monofosfato:** La tiamina monofosfato se produce en la reacción 2.5.1.3 (RXNQT-4191) de la vía metabólica de biosíntesis de tiamina difosfato (PWY-6907), mostrada en la Figura K.20.

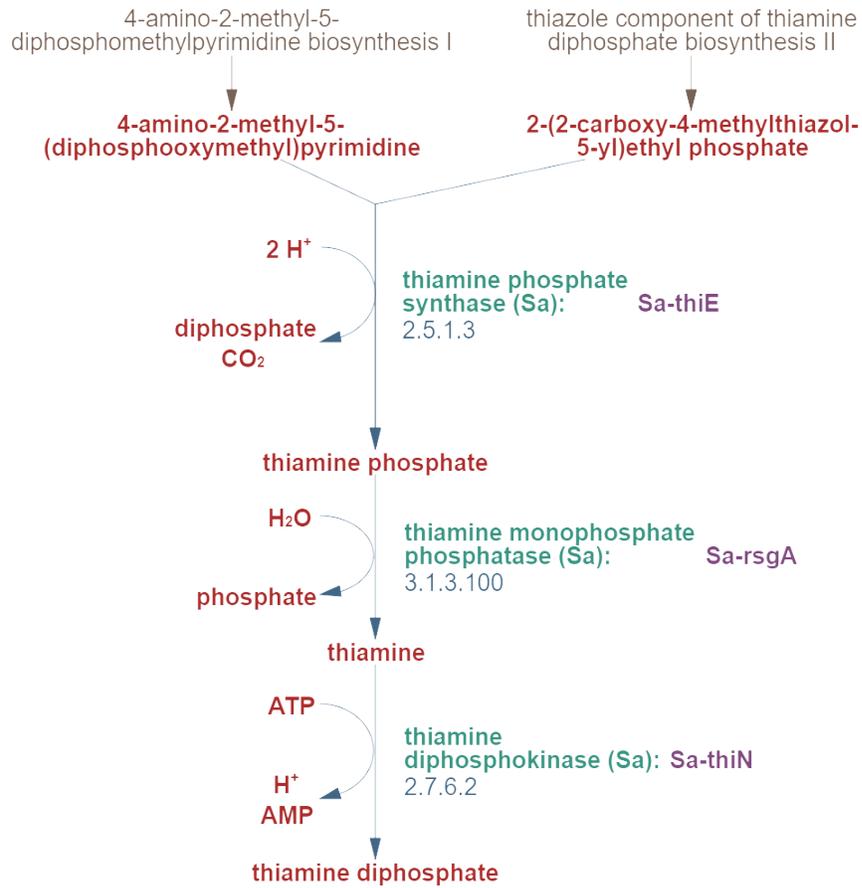


Figura K.20: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de tiamina difosfato [80].

- **Carnitina:** La carnitina se produce en la reacción 1.14.11.1 (1.14.11.1-RXN) en la vía metabólica de biosíntesis de carnitina (PWY-6100), mostrada en la Figura K.21.

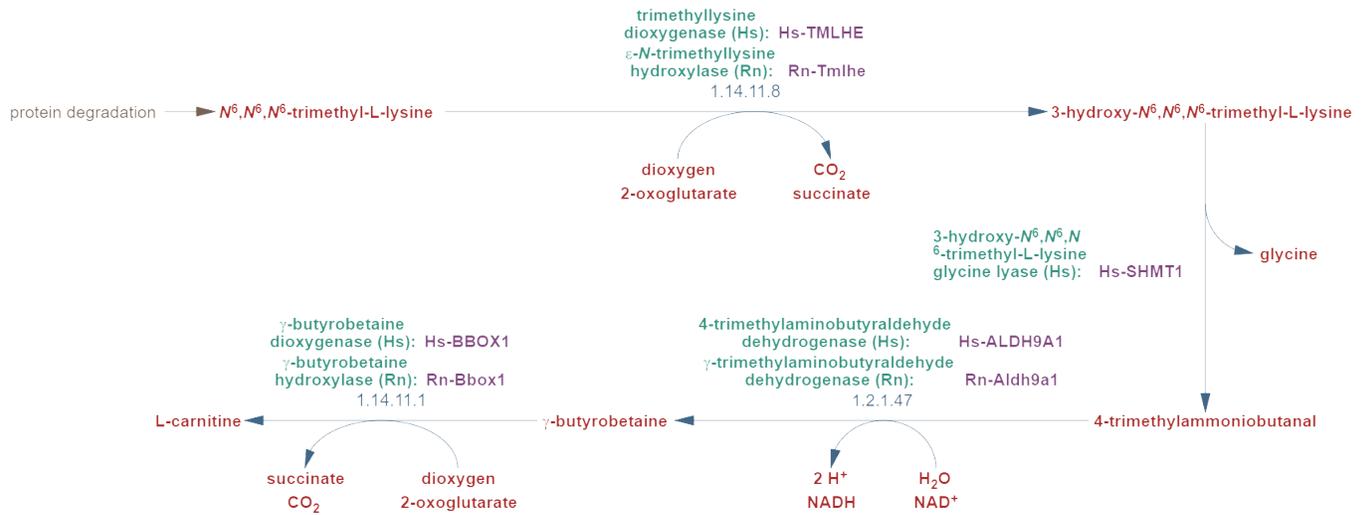


Figura K.21: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de carnitina [80].

- **Pantotenato:** El pantotenato se produce en la reacción 6.3.2.1 (PANTOATE-BETA-ALANINE-LIG-RXN) en la vía metabólica de biosíntesis de fosfopantotenato (PANTO-PWY), mostrada en la Figura K.22.

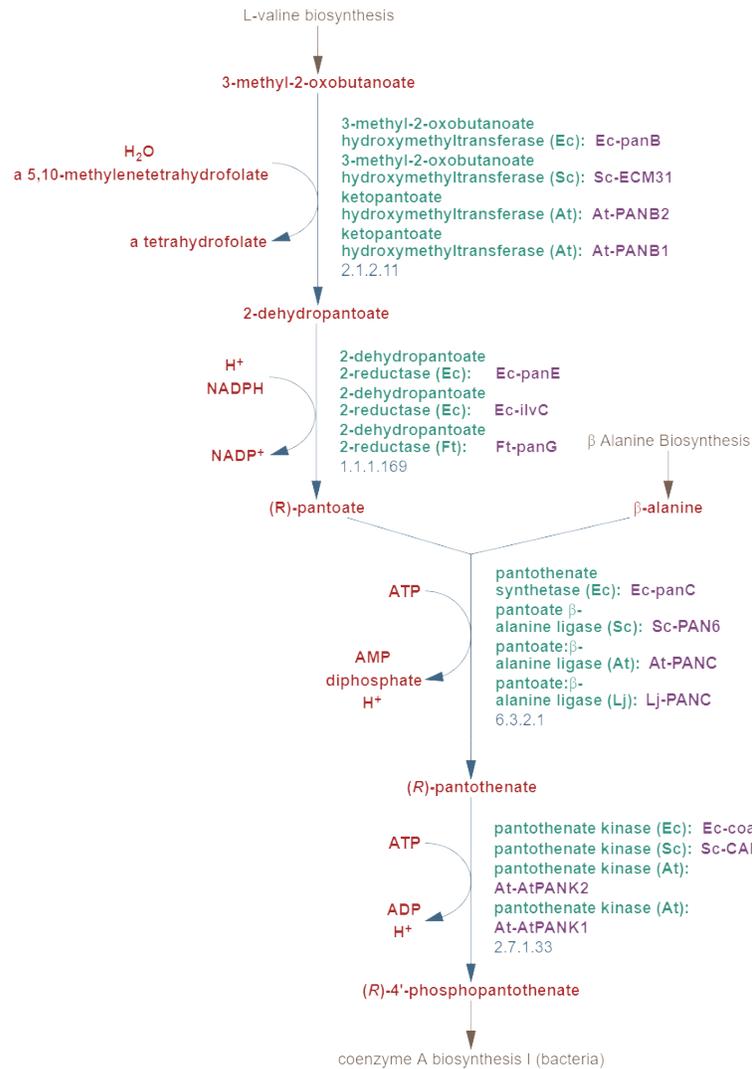


Figura K.22: Vía metabólica correspondiente a la biosíntesis de fosfopantotenato [80].

- **Adenosilcobalamina:** Esta vitamina se produce en la reacción 2.5.1.17 (RXN-19366) en la vía metabólica de la recuperación de adenosilcobalamina (PWY-6268), mostrada en la Figura K.23.

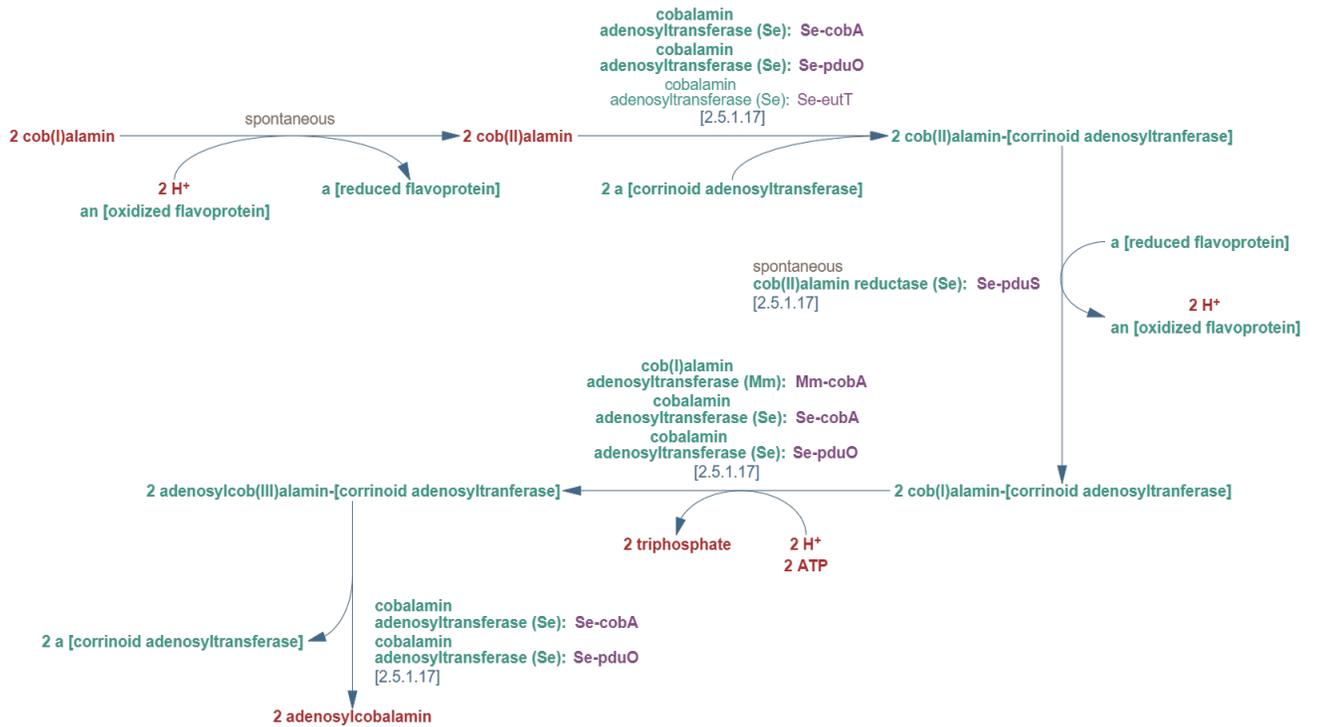


Figura K.23: Vía metabólica correspondiente a la recuperación de adenosilcobalamina ([80]).