

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD CUAJIMALPA
Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería

ESTUDIO DEL ENSAMBLE DE UNA COMUNIDAD MICROBIANA CON ACTIVIDAD
METANOTRÓFICA

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Maestro en Ciencias Naturales e Ingeniería

PRESENTA:
ALEXIS SALDIVAR GARCÍA

DIRECTORES:

Dr. Sergio Revah Moiseev

Dr. José Utrilla Carreri

Ciudad de México, a 21 de mayo de 2021

Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado entre septiembre de 2018 y marzo de 2020, en el Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Procesos y Tecnología. El trabajo de cómputo fue realizado entre abril de 2020 y diciembre de 2020.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 29 del mes Julio del año 2021, el (la) que suscribe Alexis Saldivar García alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor (a) intelectual de la presente idónea comunicación de resultados titulada:

" Estudio del Ensamble de una comunidad microbiana con actividad metanotrófica"

realizada bajo la dirección de Sergio Revah Moiseev y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del (la) director (a) del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: srevah@cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Alexis Saldivar García

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Alexis Saldivar García, alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento, no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”


Alexis Saldivar García

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Alexis Saldivar García, alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Alexis Saldivar García.



Alexis Saldivar García

Nombre y firma del alumno

Resumen

El metano es el segundo gas con mayor contribución al efecto invernadero. Las emisiones de este gas de origen antropogénico se deben principalmente a las industrias extractivas, a la industria agropecuaria y a la descomposición de la materia orgánica en aguas residuales y rellenos sanitarios. Hoy en día, hay pocas alternativas para controlar las emisiones de este gas y las existentes requieren de una gran inversión de capital, por lo que solo es factible utilizarlas en sistemas con grandes emisiones de metano. La oxidación de metano mediante consorcios microbianos es una alternativa para sistemas de baja escala, ya que la inversión capital necesaria es menor comparada con otros métodos. Desafortunadamente, la aplicación de sistemas biológicos está limitada por las bajas tasas de oxidación que pueden obtenerse. El objetivo de esta tesis es identificar poblaciones microbianas que favorezcan el crecimiento y la actividad de microorganismos metanotróficos, haciendo uso de la secuenciación masiva del gen 16S rDNA. Para hacer esto, se utilizó una metodología deductiva que se basa en controlar las condiciones de cultivo de un consorcio metanotrófico proveniente de un ambiente natural, caracterizarlo mediante secuenciación masiva de la región V4 del gen 16S rDNA y utilizar estos resultados para reconstruir modelos metabólicos e inferir las interacciones cooperativas en la comunidad. Inicialmente, se sometió un consorcio natural a un proceso de selección artificial en dos etapas buscando enriquecer las asociaciones cooperativas dentro del consorcio. Se identificó que el taxón más abundante al término de la primera etapa es *Methylophilus*, un microorganismo metilotrófico, mientras que *Methylocystis*, el único taxón metanotrófico presente, está en abundancia relativa menor al 1% del total. En la segunda etapa de enriquecimiento, la abundancia relativa de *Methylophilus* se redujo a 0.052% mientras que la de *Methylocystis* aumentó a 66%. Posteriormente, se utilizaron los resultados de la secuenciación del gen 16S rDNA para reconstruir modelos metabólicos para 17 géneros distintos en el consorcio metanotrófico usando PICRUST2. Se empleó MICOM como marco de referencia para simular por Cadenas de Markov variando las reacciones de consumo activas en *Methylocystis*. Las simulaciones mostraron que secretar metanol favorece energéticamente a *Methylocystis* al evitar el consumo de ATP y NAD(P)H en el ciclo de la serina. Adicionalmente, la interacción entre este género y *Methylophilus* resultó competitiva cuando *Methylocystis* utiliza solo metano como fuente de carbono. Sin embargo, esta interacción puede cambiar a cooperativa si *Methylocystis* pudiera usar los ácidos orgánicos producidos por *Methylophilus* como fuente de carbono simultáneamente con al metano. Adicionalmente, se infirieron los géneros *Hyphomicrobium* y *Sedimebacterium* que pueden favorecer a *Methylocystis*.

Tabla de contenido

Resumen	6
Tabla de contenido	7
Tabla de Figuras.....	8
1. Introducción	9
2. Antecedentes.....	11
2.1. Consorcios microbianos	11
2.1.1. Herramientas para el estudio de consorcios Microbianos.....	14
2.2. Hipótesis.....	15
2.3. Objetivo general.....	15
2.3.1. Objetivos específicos.	15
3. Consorcio metanotrófico.....	16
3.1. Introducción	16
3.1.1. Metabolismo del metano	16
3.1.2. Avances en el estudio de consorcios metanotróficos	17
3.1.3. Selección artificial de interacciones cooperativas.....	18
3.2. Métodos.....	19
3.2.1. Condiciones de incubación y medios de cultivo.	19
3.2.2. Medición de metano, CO ₂ y O ₂	19
3.2.3. Extracción de DNA y Análisis de secuencias.....	19
3.3. Metodología.....	19
3.4. Enriquecimiento del consorcio metanotrófico	20
3.4.1. Etapa 1: Cultivos secuenciales en lote.....	20
3.4.2. Etapa 2: Extinción por diluciones.....	22
3.5. Discusión.	23
4. Interacciones Metabólicas	26
4.1. Introducción.....	26
4.2. Métodos.....	27

4.2.1.	Inferencia del metagenoma.....	27
4.2.2.	Reconstrucción metabólica	27
4.2.3.	Análisis de interacciones metabólicas.....	29
4.3.	Resultados	34
4.3.1.	Reconstrucción metabólica	34
4.3.2.	Análisis de interacciones.....	37
4.4.	Discusión	42
5.	Conclusiones Generales.....	45
6.	Perspectivas.....	45
	Agradecimientos	46
	Referencias	47
	Anexo 1. Métodos suplementarios.....	56
	Anexo 2 Resultados suplementarios	58
	Anexo 3 Componentes de la biomasa	64
	Anexo 4. Información adicional	69

Tabla de Figuras.

<i>Figura 2.1 Posibles rutas de oxidación de metano.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 3.1 Resultados de los procesos de enriquecimiento.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 3.2 Asignaciones taxonómicas para el consorcio CIR_19</i>	<i>22</i>
<i>Error! Marcador no definido.</i>	
<i>Figura 3.3 Asignaciones taxonómicas para el consorcio My_20.</i>	<i>23</i>
<i>Error! Marcador no definido.</i>	
<i>Figura 4.1 Rendimientos de biomasa, CO₂ y O₂ en metano, predichos por el modelo universal.</i>	<i>34</i>
<i>Error! Marcador no definido.</i>	
<i>Figura 4.2 Resultados de cuatro Cadenas de Markov con 599 simulaciones para cada consorcio.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 4.3 Intervalos de credibilidad (IC) del parámetro θ para las 27 reacciones de consumo seleccionadas de Methylo cystis.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 4.4 Intervalos de credibilidad del promedio del coeficiente de interacción en 2396 simulaciones, para los taxones seleccionados.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 4.5 Coeficientes de Interacción para las simulaciones.</i>	<i>43</i>

1. Introducción

Los gases de efecto invernadero (GEI) tienen la capacidad de absorber y emitir radiación electromagnética en el rango infrarrojo. Cuando están presentes en la atmósfera, estos gases absorben parte de la radiación proveniente de la superficie terrestre y la reemiten hacia la superficie. Las emisiones de GEI de origen antropogénico, especialmente de CO₂, metano y óxido nitroso, se consideran la causa principal del calentamiento global. A pesar de que las emisiones de metano solo representan el 20% de las emisiones totales, este gas tiene un potencial de efecto invernadero 28 veces mayor al CO₂, lo que lo convierte en el segundo gas con mayor contribución al calentamiento global, solo después de CO₂. Debido a esto, es de interés desarrollar tecnologías que reduzcan y reutilicen las emisiones de metano.

La emisión de metano en procesos antropogénicos proviene principalmente de industrias extractivas y de actividades que involucran la descomposición de la materia orgánica. Dentro de esta última categoría, el sector con mayor contribución es la degradación de materia orgánica en rellenos sanitarios y plantas de tratamiento de aguas residuales, seguido de la industria agropecuaria¹. Los esquemas de reducción de emisiones de metano en estos sectores se basan en el uso de este gas como fuente de energía en sistemas de cogeneración eléctrica. Desafortunadamente, debido a los altos costos capitales y de operación, la aplicación de sistemas de cogeneración se limita a instalaciones con capacidades de producción lo suficientemente grandes para ser rentables². En instalaciones de menor capacidad, las emisiones se mitigan mediante la quema del metano o no se mitigan para nada. Adicional a esto, tanto los sistemas de cogeneración como los de quema, generan CO₂ y óxidos nitrosos como subproductos.

Una alternativa es la conversión de metano a compuestos líquidos que pudieran ser utilizados como combustible o como materia prima para la industria química. Esta conversión puede realizarse mediante dos rutas: una química y una biológica. La química involucra la conversión de metano a gas sintético, la generación de cadenas de hidrocarburos a partir del gas sintético y el fraccionamiento y refinamiento de la mezcla de hidrocarburos generados. Al igual que los sistemas de cogeneración, debido al número y la complejidad de las operaciones unitarias requeridas, la vía química solo es rentable para operaciones de gran capacidad³.

Las condiciones de operación de sistemas biológicos son cercanas a las condiciones ambientales, reduciendo el consumo energético y los costos de operación asociados. Tradicionalmente, la industria biotecnológica se ha centrado en el uso de cultivos puros

para la producción de compuestos de alto valor agregado⁴. Desafortunadamente, la falta de condiciones controladas en procesos ambientales limita el uso de este tipo de cultivos, ya que carecen de la robustez necesaria para mantener procesos estables frente a condiciones variables, además de que los insumos necesarios para la operación estéril de este tipo de cultivos, sumado a la baja tasa de conversión en comparación con los procesos químicos, reduce la factibilidad económica de los procesos de oxidación biológica.

En contraparte, los consorcios microbianos son resilientes a cambios ambientales y tienen mayores tasas de crecimiento y consumo de sustrato, por lo que recientemente se ha reconocido el potencial de los consorcios microbianos en procesos de biorremediación, de producción de biocombustibles e incluso, su potencial para producir compuestos de alto valor agregado^{5,6}. Sin embargo, los consorcios microbianos son sistemas complejos cuyo estudio es incipiente. Para consolidar procesos productivos basados en consorcios necesitamos tener conocimiento predictivo sobre los fenómenos presentes en ellos, conocimientos que nos permitan diseñar y controlar las funciones del consorcio. Por supuesto que esto no es una tarea simple y representa uno de los objetivos a largo plazo de la biología de sistemas en comunidades microbianas. En este sentido, nuestro trabajo se centra en inferir interacciones cooperativas de una comunidad metanotrófica, con potencial biotecnológico y que provean una alternativa para aumentar la tasa de oxidación de metano de procesos biológicos.

2. Antecedentes

Los consorcios microbianos naturales (consorcios mixtos) han sido utilizados desde la antigüedad para la producción de fermentados como el vino y los productos lácteos. Por sus características (mencionadas en la sección anterior) los consorcios mixtos son especialmente efectivos en procesos de biorremediación como el tratamiento de aguas residuales o la producción de biogás a partir de desechos orgánicos.

Por otro lado, la producción de compuestos de alto valor agregado está limitado a cultivos axénicos, gracias a que por su simplicidad se ha logrado acumular una gran cantidad de conocimientos que permiten manipular y controlar dichos sistemas con gran precisión, esto de la mano de la biología sintética y la ingeniería metabólica. A pesar de su éxito, los cultivos axénicos tienen muchas limitantes tanto técnicas como económicas (algunas de las cuales se mencionaron en la sección anterior), por lo que recientemente se ha propuesto utilizar co-cultivos para afrontar algunas de ellas.

Los co-cultivos son sistemas que se establecen a partir del crecimiento conjunto de dos o más cultivos axénicos. A diferencia de los consorcios mixtos, este tipo de sistemas son mucho más simples a la vez que pueden conservar algunas de las ventajas de las comunidades más diversas⁷. A pesar de esto, el uso de co-cultivos ha tenido poco éxito a nivel industrial debido a la complejidad añadida de tener tan solo dos microorganismos distintos coexistiendo. Nuestra inhabilidad para manipular y controlar eficazmente hasta los co-cultivos más sencillos tiene su origen en la falta de conocimiento sobre los mecanismos que definen las interacciones entre microorganismos⁸. La última década ha visto grandes avances en este sentido. En la siguiente sección sintetizaremos lo que consideramos son algunos de los resultados más relevantes, así como parte de las herramientas tecnológicas que se utilizan en el estudio de consorcios microbianos.

En este trabajo, proponemos que el diseño de nuevos co-cultivos debería de realizarse a partir de microorganismos con interacciones beneficiosas entre ellos, pues esto facilitaría la integración de nuevas funciones metabólicas y promovería la estabilidad del sistema a largo plazo. Los capítulos 3 y 4 se centran en la descripción de una metodología para inferir este tipo de interacciones a partir de consorcios naturales.

2.1. Consorcios microbianos

En comunidades, los microorganismos muestran adaptaciones con las que median las interacciones ecológicas con otros microorganismos⁹. Cuando estas interacciones son de carácter metabólico, nos referimos a ellas como alimentación cruzada: la producción e intercambio de metabolitos a partir de una o varias fuentes de carbono primarias, misma

que pueda ser incidental o cooperativa. De forma general, podemos clasificar la interacción entre dos microorganismos en tres tipos distintos, dependiendo del efecto de la interacción en cada participante: competitivas, cooperativas o neutras. Las interacciones cooperativas surgen cuando cada microorganismo obtiene algún beneficio por su participación y también se conocen como mutualismo o alimentación cruzada bidireccional. Aunque no se ajusta del todo, dentro de esta categoría también encontramos interacciones comensalistas (alimentación cruzada incidental), que son aquellas en las que un microorganismo se beneficia sin tener ningún efecto sobre el otro. Las interacciones competitivas son aquellas en las que el efecto de la interacción es negativo para ambos microorganismos participantes. Dentro de esta categoría también encontramos el parasitismo y el amensalismo. Estudios experimentales en comunidades sintéticas¹⁰, así como la diversidad genotípica observada en comunidades naturales^{11,12}, sugieren que la cooperación provee una ventaja competitiva para los microorganismos involucrados^{13,14}. Sin embargo, este resultado es contrario a la teoría de la selección natural de Darwin, que predice comunidades con baja diversidad genotípica como resultado de la exclusión competitiva¹⁵, un fenómeno en el que los microorganismos con mayor adaptación al uso de los recursos presentes desplazan al resto en la comunidad.

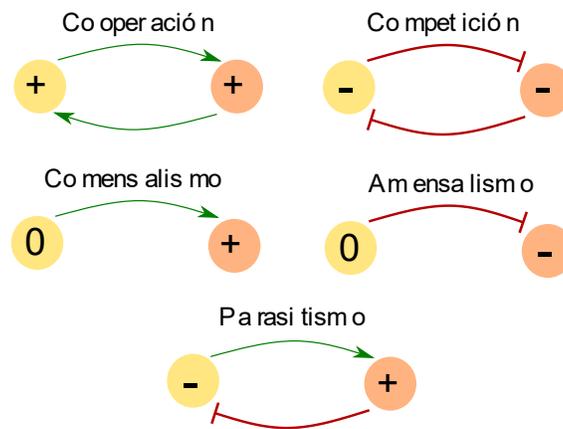


Figura 2.1 Efectos de los distintos tipos de interacciones ecológicas.

Una de las hipótesis que se ha desarrollado para explicar esta paradoja es la división metabólica del trabajo, que sugiere que las interacciones cooperativas tienen su origen en microorganismos especializados en cumplir cierta función metabólica. Dichos microorganismos subsisten al utilizar recursos producidos por el resto del consorcio y compartir los que ellos mismos producen. Esto es ventajoso ya que cada célula tiene recursos limitados para producir proteínas, por lo que al cesar cierta función metabólica cesan también los recursos que se asignaban a la producción de enzimas relacionadas a dicha función, reduciendo el costo metabólico asociado. Adicionalmente, segregan los

procesos metabólicos reduce la competencia enzimática por recursos celulares como ATP, NAD(PH) o espacio intracelular, lo que aliviaría los posibles cuellos de botella generados por la competencia de estos recursos, amortiguando los efectos inhibitorios resultantes de la acumulación de intermediarios metabólicos¹⁶. Esto es de especial interés para nuestro estudio pues sugiere que la división metabólica del trabajo puede mejorar la eficiencia en la conversión del sustrato a biomasa¹⁷, así como incrementar la tasa de consumo de sustrato¹⁶.

Aún con esta hipótesis no fue posible reconciliar los resultados experimentales con los modelos teóricos desarrollados a partir de la selección natural¹⁸⁻²⁰. Para zanjar la diferencia entre teoría y experimentos fue necesaria la introducción de varias consideraciones. En primer lugar, fue necesario reconocer que la dependencia de la tasa de crecimiento con la disponibilidad de recursos es no-lineal. Usualmente esta dependencia es hiperbólica con asíntota en la velocidad máxima de crecimiento²¹, lo que implica que aumentar al doble la disponibilidad de recursos no tiene el mismo efecto con la tasa de crecimiento. Adicionalmente, la eficiencia con la que se consumen los recursos no es fija, esta también varía en función de la disponibilidad de recursos, un fenómeno que se conoce como el compromiso tasa-rendimiento²²⁻²⁵ y que se considera el origen del sobre-flujo metabólico^{26,27}. De forma similar, fue necesario reconocer que las interacciones no son fijas. Los microorganismos tienen la capacidad de modificar el ambiente en el que existen, principalmente a través de la producción de metabolitos, lo que implica que el panorama abiótico se transforma con la diversidad y la abundancia de los fenotipos presentes en la comunidad. Además, poseen mecanismos de regulación genética y de control enzimático que los proveen de la capacidad para modular tanto la fuerza, como la dirección de sus interacciones^{9,28,29}.

De estas nuevas consideraciones emergen tres conclusiones que son relevantes para nuestro trabajo. En primer lugar, trabajos experimentales y teóricos concluyen que la probabilidad de que se establezcan interacciones cooperativas es mayor en ambientes con poca disponibilidad de recursos; probabilidad que se transfiere hacia el establecimiento de interacciones competitivas cuando la disponibilidad de recursos aumenta³⁰⁻³³. La heurística de este resultado es simple: en ambientes limitados es más beneficioso aprovechar los recursos de forma que se maximice la producción de biomasa, mientras que en ambientes con gran disponibilidad resulta más conveniente consumirlos rápidamente para privar a los competidores de ellos.

La segunda conclusión hace referencia a la estabilidad dinámica de las poblaciones viviendo en comunidad. Análisis teóricos muestran que la alimentación cruzada incidental no garantiza la coexistencia de las poblaciones en un equilibrio positivo; en su lugar, estos

análisis indican que, para que una comunidad sea estable en el tiempo, es necesaria la presencia de mutualismos entre una fracción de los microorganismos^{18,34,35}. Trabajos experimentales han mostrado que estos mutualismos pueden evolucionar de poblaciones no-cooperativas mediante la pérdida adaptativa de genes metabólicos³⁶⁻³⁹, fenómeno que se considera el origen de la división metabólica del trabajo.

Finalmente, la tercera conclusión indica que, debido a que la cantidad de metabolitos extracelulares disponible es proporcional a la densidad total de cooperados, el beneficio para toda la comunidad depende de esta variable⁴⁰. Si la comunidad experimenta cambios en el ambiente que reduzca la densidad total de cooperadores más allá de un nivel crítico, encontramos dos resultados posibles: que toda la comunidad se extinga o que los microorganismos no-cooperadores se extingan. El umbral de este nivel crítico estará determinado por las condiciones iniciales, las características intrínsecas del sistema^{41,42}, así como la velocidad a la que se produzcan estos cambios^{41,43}. En el capítulo 3 argumentamos que estas tres conclusiones justifican el uso de dos metodologías de selección artificial para enriquecer interacciones cooperativas en un consorcio metanotrófico natural.

2.1.1. Herramientas para el estudio de consorcios Microbianos

Una de las prioridades en el estudio de consorcios microbianos es entender los mecanismos mediante los cuales se forman interacciones metabólicas y cómo estas interacciones afectan el crecimiento de los microorganismos del consorcio. Con este objetivo en mira, las técnicas de cultivo microbiológicas tradicionales son inadecuadas para el estudio de consorcios ya que no tienen el rendimiento necesario para caracterizar los cientos de microorganismos que llegan a estar presentes en una sola comunidad, además de que no rescatan la diversidad microbiológica realmente presente ya que muchas especies microbianas no pueden cultivarse en aislamiento.

El desarrollo de técnicas moleculares independientes del cultivo ha abierto la puerta a la caracterización a gran escala de consorcios microbianos. Uno de los estándares en estas técnicas es la secuenciación masiva del gen 16S rDNA, mediante la cual obtenemos información de la abundancia relativa de los microorganismos a través de la cuenta de veces que una secuencia específica aparece en la muestra. Los métodos estadísticos que utilizan esta información infieren interacciones estimando la matriz de covarianza o coeficientes de correlación, esto a partir de los cambios en la abundancia relativa entre varias muestras. Un obstáculo común a este tipo de métodos es que la información que utilizan es composicional, lo que quiere decir que la abundancia relativa de cada microorganismo no es independiente del resto, ya que se obtiene al normalizar las cuentas de cada secuencia contra el número de cuentas totales. Esto genera un sesgo artificial hacia las correlaciones

negativas debido a que aumentar la abundancia relativa de un microorganismo necesariamente reduce la del resto, a pesar de que la abundancia neta no varíe. Adicional a esto, estos métodos por sí solos no pueden hacer inferencias sobre el mecanismo por el que se producen las interacciones entre microorganismos.

Por otro lado, el uso de modelos metabólicos no tiene sesgo composicional, además de que puede proporcionar información detallada sobre los mecanismos de interacción emergente entre dos o más microorganismos. Esta metodología se ha utilizado con éxito para caracterizar las interacciones de comunidades “simples”⁴⁴. Sin embargo, los modelos metabólicos encuentran una de sus limitantes en la cantidad de información necesaria para producir reconstrucciones metabólicas de alta calidad. Nuevamente, las tecnologías de secuenciación masiva han sido fundamentales en la aplicación de técnicas de modelado metabólico ya que han permitido la caracterización genómica de nuevos microorganismos a una tasa sin precedentes. Gracias a esto, se han desarrollado herramientas que permiten inferir con suficiente precisión las capacidades metabólicas de un microorganismo basadas solamente en la información contenida en el gen 16S rDNA^{45–48}. Al mismo tiempo, se han desarrollado metodologías que permiten la reconstrucción de modelos metabólicos de alta calidad de forma semiautomática⁴⁹, lo que posibilita estudiar el metabolismo de cientos de microorganismos distintos a la vez. La aplicación combinada de métodos genómicos, bioinformáticos y de modelos metabólicos ha demostrado su efectividad en descubrir patrones generales de competencia y cooperación en consorcios microbianos^{14,50–52}. A medida que la información contenida en bases de datos aumente, será posible hacer uso de modelos metabólicos para caracterizar a detalle las interacciones en consorcios de mayor complejidad. En el capítulo 4 utilizaremos modelos metabólicos para inferir las interacciones cooperativas presentes en los consorcios resultantes de las metodologías de selección artificial descritas en Capítulo 3.

2.2. Hipótesis

- Es posible enriquecer interacciones cooperativas en un consorcio microbiano mediante un proceso de selección artificial.

2.3. Objetivo general

- Obtener y caracterizar consorcios metanotróficos obtenidos a partir de muestras ambientales.

2.3.1. Objetivos específicos.

- Determinar la estequiometría y cinética de crecimiento de un consorcio metanotrófico.
- Inferir las interacciones cooperativas en un consorcio metanotrófico.

3. Consorcio metanotrófico

3.1. Introducción

Al día de hoy, los microorganismos metanotróficos se encuentran clasificados en tres filos bacterianos: *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Methylomirabilota*⁵³. Adicionalmente, dentro del filo *Proteobacteria* se encuentran metanótrofos en dos clases distintas *alfa*- y *gamma*-*proteobacteria*, que se distinguen, entre otras cosas, por el metabolismo en la asimilación de metano. En la siguiente sección resumimos las características relevantes de estas dos clases de metanótrofas.

3.1.1. Metabolismo del metano

La primera reacción para asimilar metano es su oxidación a metanol catalizado por una *metano monooxigenasa* (MMO). Hay dos enzimas que catalizan esta reacción, una *periplásmica* (pMMO) y una *soluble* (sMMO); la expresión de una u otra depende de los niveles de la concentración de cobre en el medio, siendo la pMMO la que se expresa en condiciones de suficiencia de cobre⁵⁴. Ambas MMOs requieren de dos electrones para activar el oxígeno molecular e incorporarlo al enlace C-H del metano. Estos dos electrones se recuperan en la subsecuente oxidación de metanol a formaldehído, reacción catalizada por una *metanol deshidrogenasa* (MDH) que también tiene dos variantes. Los metilótrofos gram negativos poseen una MDH con un grupo pirroloquinona quinona (PQQ) que transfiere dos electrones del metanol a un citocromo c, proceso que conecta la oxidación de metanol con la cadena respiratoria; mientras que los metilótrofos gram positivos poseen una MDH dependiente de NAD⁺ que es menos favorable termodinámicamente⁵⁵.

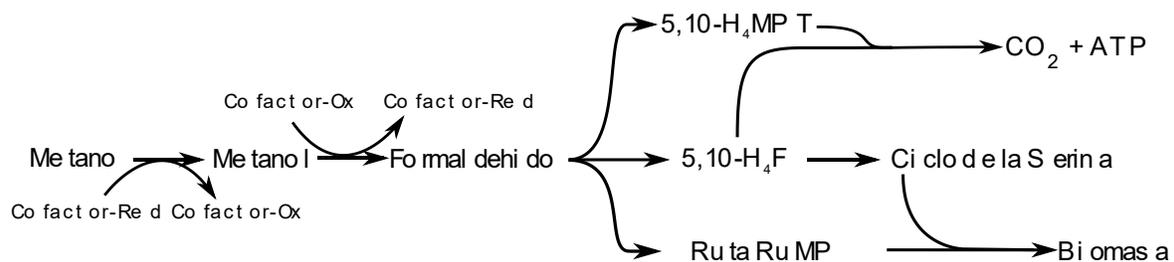


Figura 3.1 Posibles rutas de oxidación de metano. Ruta de la ribulosa monofosfato (RuMP), 5,10-metilen-tetrahidrofolato (5,10-H₄F), 5,10-metilen-tetrahidrometanopterin (5,10-H₄MPT)

La asimilación del formaldehído puede realizarse por distintas rutas que son comunes tanto para microorganismos metanótrofos como metilótrofos. En los metilótrofos de la clase *Alfaproteobacteria* suele estar presente el ciclo de la serina⁵⁶⁻⁵⁹, ruta que condensa dos moles de formaldehído y uno de CO₂ para formar un mol de 3-fosfoglicerato, esto con el

consumo de 3 moles de ATP y 3 de NAD(P)H. Esta ruta utiliza 5,10-metilenetrahidrofolato en su reacción inicial, compuesto que se forma en una reacción espontánea que condensa formaldehído con tetrahidrofolato (H₄F). La ruta de la ribulosa monofosfato (RuMP) es la vía de asimilación predominante en metilótrofos de la clase *Gammaproteobacteria*. Esta ruta es más favorable energéticamente ya que el carbono se asimila en intermediarios que tiene un nivel de oxidación similar al formaldehído, lo que ahorra el consumo de ATP y NAD(P)H necesarios en el ciclo de la serina. Adicionalmente, el formaldehído puede oxidarse hasta CO₂ en una ruta que utiliza tetrahidrometanopterina (H₄MPT) como cofactor; como resultado de esta oxidación se recuperan electrones que pueden ser utilizados para la producción de energía.

3.1.2. Avances en el estudio de consorcios metanotróficos

Se sabe que las bacterias metanotróficas forman interacciones estables con poblaciones no metanotróficas, además de que son capaces de sustentar sistemas aislados al proveer una fuente de carbono primaria⁶⁰⁻⁶² tras convertir el metano en productos metabólicos²⁷. Experimentos en los que se han enriquecido muestras ambientales con metano como única fuente de carbono⁶¹ y en los que se han formado comunidades sintéticas⁶²⁻⁶⁴, indican que las asociaciones formadas entre poblaciones metanotróficas y heterotróficas no son aleatorias. Estos experimentos, en conjunto con análisis de redes de co-ocurrencia⁶⁵, indican que el enriquecimiento selectivo de poblaciones específicas varían en función de la clase del metanótrofo presente (*Alfaproteobacteria* o *Gammaproteobacteria*).

Una de las asociaciones comúnmente enriquecidas en experimentos independientes es aquella entre metanótrofos y poblaciones metilotróficas⁶¹. En este caso, suponemos que la asociación se genera a partir del intercambio directo de metanol. Como se muestra en la Fig. 3.1, la secreción de metanol implica un costo energético sin retorno hacia la metanotrófica, por lo que no resulta evidente cual podría ser el mecanismo detrás de la secreción de metanol. Una de las posibles hipótesis es que el metanol se acumula como consecuencia de sobre-flujo metabólico, por lo que la presencia de la población metilotrófica disminuiría el efecto inhibitorio ocasionado por esta acumulación. Asociada a esta, la segunda hipótesis sugiere que es posible que las poblaciones que reciben metanol suplementen las necesidades metabólicas de las metanotróficas al proveerle de cofactores de crecimiento (división del trabajo)⁶⁶. Finalmente, la tercera hipótesis es que los metilótrofos pueden establecer una relación parasitaria al segregar un factor extracelular que “fuerza” la secreción de metanol⁶⁷. Los experimentos realizados en este sentido indican que el tipo de interacción cambiará dependiendo del género de metanótrofo^{68,63,67}, en concordancia con el análisis de redes⁶⁵.

Por otra parte, estudios de co-cultivos de especies metanotróficas con metilótrofos o heterótrofos, mostraron que los co-cultivos promueven el crecimiento y la actividad de los metanótrofos^{63,68,69}. En un estudio⁷⁰, determinaron que la tasa de oxidación de metano en consorcios sintéticos de *Methylomonas methanica* con combinaciones de hasta 10 especies de heterótrofos distintos, incrementa linealmente con la riqueza de heterótrofos presentes, lo que indica que los microorganismos metanotróficos se benefician de la vida en comunidad y deja claro la diversidad de interacciones que aún están sin caracterizar.

3.1.3. Selección artificial de interacciones cooperativas.

El interés principal de nuestro trabajo se centra en identificar poblaciones microbianas que establezcan interacciones cooperativas con microorganismos metanotróficos. Para lograr esto proponemos estudiar un consorcio metanotrófico de una muestra ambiental enriquecida. Basados en las conclusiones expuestas en la sección 2.1, proponemos utilizar un sistema de selección artificial en dos etapas que favorecerán la aparición y el refinamiento de interacciones cooperativas, mismas que se describen a continuación.

El metano es un gas que tiene baja solubilidad en agua por lo que una de las mayores limitantes en su degradación es la velocidad de transferencia de masa a la fase acuosa. Debido a esto, podemos asumir que los cultivos metanotróficos sumergidos son un sistema limitado en carbono. Como se mencionó en la sección 2.1, los sistemas limitados en nutrientes favorecen la aparición de interacciones cooperativas. Considerando esto, en la primera etapa de enriquecimiento nuestra hipótesis es que al someter el consorcio a la fuerza de una presión selectiva basada en la tasa de crecimiento se enriquecerán las interacciones cooperativas dentro del consorcio. De esta etapa esperamos que se enriquezcan las interacciones que favorecen la oxidación de metano debido a que esta es la función limitante para el resto de los microorganismos del consorcio. Además, con base a la segunda conclusión, podemos esperar que interacciones cooperativas surjan durante este proceso a pesar de no estar presentes inicialmente. La segunda etapa consistirá en el refinamiento de las interacciones totales mediante extinción por dilución de alto rendimiento⁷¹. En esta etapa lo que esperamos es incrementar la fracción de asociaciones cooperativas con microorganismos heterótrofos y metilótrofos, a través de la reducción drástica del conteo celular de metanótrofos^{27,65,72-74}. Al término de cada etapa se secuenció la región V4 del gen 16S rDNA para identificar los géneros presentes. En este capítulo presentamos la caracterización de la estequiometría de crecimiento de los consorcios obtenidos de cada etapa, así como un análisis preliminar de los resultados de secuenciación.

3.2. Métodos

3.2.1. Condiciones de incubación y medios de cultivo.

Todos los cultivos se incubaron en botellas serológicas de 125 mL con 23.5 mL de medio de sales de nitrato (MSN) y 2.5 mL de inóculo, a una temperatura de 28° C con velocidad de agitación de 180 rpm. La composición de la fase gaseosa se ajustó retirando 10mL de aire y adicionando 10mL de metano al 99.8% de forma que la concentración de metano fuera cercana al 10% (v/v). La composición del medio mineral fue la siguiente (g/L): KNO₃ 2.37, MgSO₄ 7H₂O 0.2, FeSO₄ 7H₂O 0.005, Na₂HPO₄ 0.4, KH₂PO₄ 0.3, CaCl₂ 2H₂O 0.0671, solución traza 0.1% (v/v). La composición de la solución traza fue (g/L): CuSO₄ 5H₂O 0.22, ZnSO₄ 7H₂O 0.44, Na₂MoO₄ 2H₂O 0.06, H₃BO₃ 0.1, MnSO₄ H₂O 0.15, CoCl₂ 0.18.

3.2.2. Medición de metano, CO₂ y O₂

La composición de la fase gaseosa se determinó en un cromatógrafo GOW-MAC con columna CTR1 (Alltech, USA) y detector de conductividad térmica. Se uso He como gas acarreador a un flujo de 100 ml/min. La temperatura de la columna se fijó a 40°C, la del inyector a 50°C y la del detector a 120°C. El voltaje del detector se ajustó 120mV.

3.2.3. Extracción de DNA y Análisis de secuencias

Para la extracción de DNA se utilizaron 50mL de cultivo. Estos se centrifugaron a 10,000 rpm y se lavaron dos veces con buffer de fosfatos (pH 7). Las extracciones se realizaron usando el kit de extracción de Quiagen DNAeasy (QIAGEN Sciences, Gemantown, MD, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de DNA se secuenciaron con un proveedor externo (RTLGenomics, Lubbock Texas, USA) en una plataforma Illumina. Se secuenció la región V4 del gen 16S rDNA utilizando los cebadores 515F y 806bR⁷⁵⁻⁷⁷. Las secuencias se procesaron usando la plataforma Qiime2⁷⁸, utilizando DADA2 para realizar el control de calidad, filtrado y remoción de quimeras⁷⁹. Las secuencias resultantes se agruparon *de novo* para formar OTUs (Operational Taxonomic Units) al 99% de identidad, mediante VSEARCH⁸⁰. La asignación taxonómica se realizó usando el servicio de alineamiento y clasificación de la base de datos SILVA⁸¹ con los siguientes parámetros: 70% de identidad mínima con la secuencia de referencia, 5 vecinos por secuencia de referencia y rechazo de secuencias con identidad menor al 55%.

3.3. Metodología

El consorcio de estudio se obtuvo a partir de una muestra ambiental. Para el primer enriquecimiento se tomaron, por triplicado, 25mL de la muestra que se incubaron en las condiciones descritas. Cada dos días se cuantificó la concentración de metano gaseoso; cuando el metano se agotó, las botellas se abrieron dentro de una campana de flujo laminar

por 15min. Posterior a esto se adicionaron 10ml de metano incubando los triplicados nuevamente hasta que el metano se agotase.

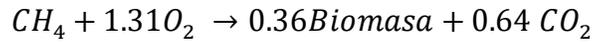
Al término de estos experimentos, se mezclaron 5mL de cada triplicado para utilizarlos como inóculo inicial de los cultivos en lotes. Podemos controlar la tasa de crecimiento mediante el uso de cultivos en lote con transferencias secuenciales. Controlar el tiempo que transcurre entre cada transferencia es análogo a controlar la tasa de dilución en cultivos continuos. Para enriquecer interacciones cooperativas es necesario mantener el cultivo con la mayor tasa de dilución posible⁷², aunque cambios bruscos en la tasa de dilución pueden terminar en la extinción de toda la comunidad⁴¹. Para prevenir esto se aumentó la tasa de dilución gradualmente al disminuir el tiempo transcurrido entre cada una de las transferencias. La reducción de tiempo se realizó cada dos transferencias con la siguiente progresión: 2 semanas, 1 semana, 5 días, 3 días, 24h y 12h, que corresponden a tasas de dilución de: 0.003, 0.006, 0.008, 0.013, 0.039 y 0.078h⁻¹. Cada transferencia se realizó por triplicado, al término de cada lote se mezclaron 5mL de cada triplicado para usar esta mezcla como inóculo del siguiente lote. Uno de los inconvenientes de usar este tipo de sistemas es que no es posible mantener las condiciones de cultivo constantes. Sin embargo, esto es favorable para nuestro objetivo ya que el agotamiento de oxígeno favorece la producción de carbono disuelto por consecuencia del sobre-flujo metabólico^{26,27}.

El consorcio resultante de este proceso se nombró CIR_19 y se utilizó como inóculo para la siguiente etapa. El proceso de extinción por dilución se realizó en placas de 96 pozos. Se hicieron doce diluciones 1:10 en siete repeticiones utilizando un carril de 12 pozos como control negativo. Cada pozo contenía 180μL de MSN y 20μL de cultivo. La placa se incubó en un recipiente con una mezcla de aproximadamente 50% (v/v) de metano-aire en la fase gaseosa durante un periodo de dos semanas. Al término del tiempo de incubación, las diluciones más altas que presentaron crecimiento se transfirieron a una botella serológica de 15mL con 2.2mL de MSN y 10% (v/v) de metano y este cultivo se utilizó como inóculo para una nueva serie de diluciones, repitiendo el mismo procedimiento un total de tres veces más. El consorcio resultante de esta etapa se nombró My_20.

3.4. Enriquecimiento del consorcio metanotrófico

3.4.1. Etapa 1: Cultivos secuenciales en lote

Para los cultivos en lote se realizaron un total de 24 transferencias en un periodo de tres meses. Al término de este proceso, el consorcio resultante se nombró CIR_19. Durante ese lapso, la tasa específica de consumo de metano incrementó de 32.6 a 92.3 $mgCH_4 gCel^{-1} h^{-1}$ (Fig. 3.2a) y la estequiometría de crecimiento final se determinó como:



El requerimiento de ATP asociado al crecimiento se estimó a partir del consumo de oxígeno mediante el siguiente cálculo:

$$q_{ATP} = 2 * \frac{Y_{O_2}}{Y_X} * P/O * \mu$$

Asumiendo P/O de 2.5⁵⁹, obtenemos un requerimiento de $6.3 \text{ mmol ATP gCel}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

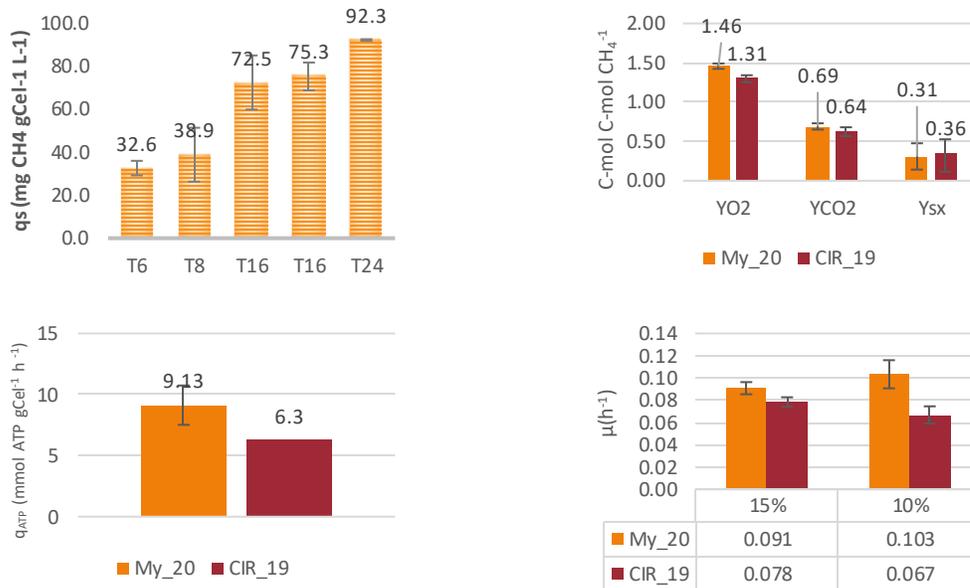
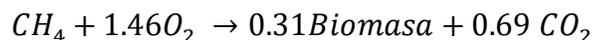


Figura 3.2 Resultados de los procesos de enriquecimiento. A) Velocidad específica de consumo de metano en transferencias sucesivas. B) Rendimientos de biomasa y CO₂ en C-mol y de O₂ en mol C-mol⁻¹. C) Consumo específico de ATP calculado en función del consumo de O₂. C) Tasa de crecimiento en concentraciones de 10% y 15% (v/v) de CH₄ en el espacio de cabeza.

En los resultados de secuenciación del gen 16S rDNA (Fig. 3.3) detectamos la presencia de tres clases bacterianas: *Alfaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Bacterodia*. El único taxón metanotrófico presente pertenece al género *Methylocystis*, una *Alfaproteobacteria* del orden de los *Rhizobiales* familia *Methylocystaceae*. Inesperadamente, la abundancia relativa de esta población es solo del 1% del total. En su lugar el 89% del consorcio está conformado por un taxón metilotrófica perteneciente al género *Methylophilus*, una *Betaproteobacteria* de la familia *Methylophilaceae*. También detectamos la presencia de otro taxón metilotrófico del género *Hyphomicrobium*, del orden *Rhizobiales*, con abundancia de 0.5% del total. Adicionalmente, dentro de la clase de las *Alfaproteobacteria* destaca la presencia del orden *Sphingomonadaceae*; dentro de la clase *Gammaproteobacteria* encontramos los órdenes *Pseudomonadales* y *Burkholderiales*; y dentro de la clase *Bacterodia*, los órdenes *Chytriphagales* y *Cytophagales*.

La estequiometría de crecimiento del consorcio después de las diluciones se determinó como (Fig. 3.2b):



Y el requerimiento de ATP se estimó en $9.13mmolATP gCel^{-1} h^{-1}$.

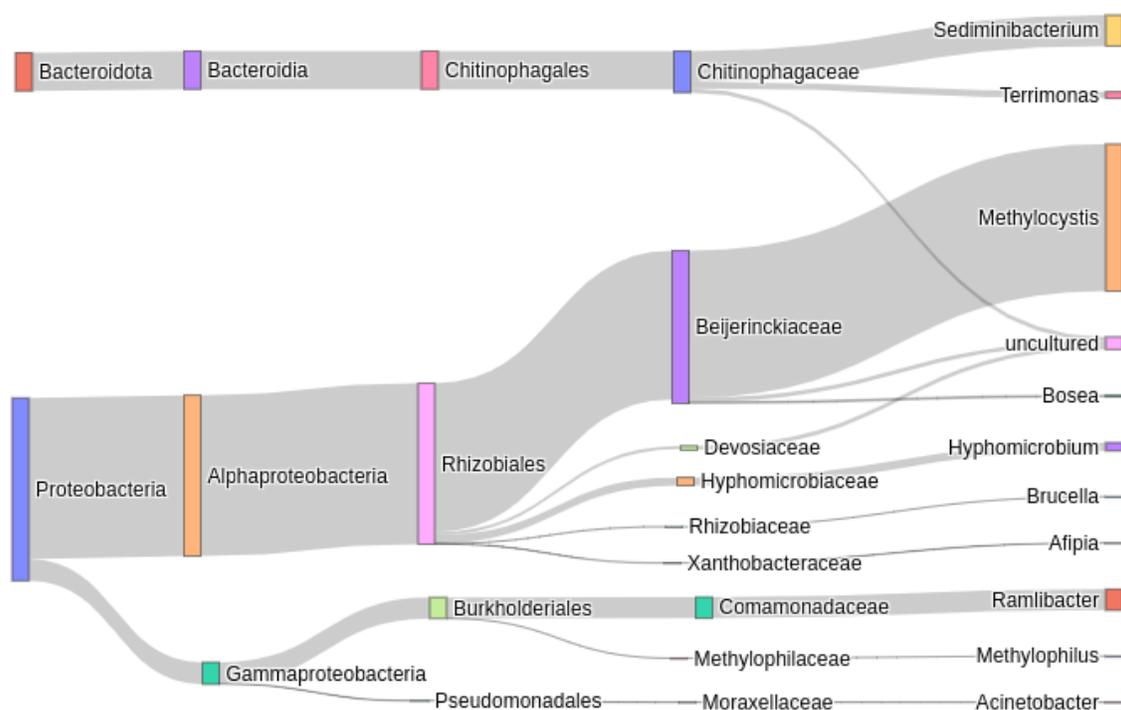


Figura 3.4 Asignaciones taxonómicas para el consorcio My_20. El ancho de cada banda es proporcional a la abundancia relativa del taxón en el consorcio.

3.5. Discusión.

Debido al incremento en la tasa de oxidación específica de metano al final de la primera etapa de enriquecimiento (Fig. 3.2a), es contraintuitivo encontrar que la abundancia relativa a un taxón no-metanotrófico (*Methylophilus*) es del 89%, mientras que la abundancia relativa del único taxón metanotrófico (*Methylocystis*) es del 1%.

Si la fuente de carbono primaria para ambos taxones es metanol, y considerando que este se produce en el espacio periplásmico de *Methylocystis* (por lo que tiene acceso preferencial a este), no es evidente por cual mecanismo *Methylocystis* “liberaría” metanol para beneficio de *Methylophilus*. Otros grupos de trabajo han encontrado que, en particular metilótrofos de la familia *Methylophilaceae*, suelen ser más abundantes en sus consorcios sin importar la afiliación taxonómica de los metanótrofos presentes^{61,62}. En un trabajo con co-cultivos de estos metilótrofos y el metanótrofo *Methylobacter*, encontraron que la

presencia de los metilótrofos induce un cambio de expresión en el tipo de metanol deshidrogenasa que el metanótrofo utiliza para oxidar metanol, donde la secreción de metanol se favorece por este cambio⁶⁷. Sin embargo, este mecanismo depende de la presencia de lantano en el medio, una condición no presente durante nuestros experimentos. Si bien, en base a esto, y apoyados en la reducción en la abundancia de *Methylophilus* tras la etapa de diluciones, podríamos deducir que *Methylophilus* tiene una interacción competitiva con *Methylocystis*. Esta conclusión no explicaría el aumento de la tasa de consumo específico de metano durante la primera etapa.

La disparidad en la abundancia relativa de ambos taxones podría explicarse debido a que las rutas metabólicas de asimilación de metanol son distintas en cada uno: los metilótrofos del filo *Gammaproteobacteria* lo asimilan vía la ruta de la ribulosa monofosfato, mientras que el filo *Alfaproteobacteria* utiliza el ciclo de la serina⁸³. La ruta RuMP es más eficiente energéticamente en comparación con el ciclo de la serina, lo que aumenta el rendimiento máximo de biomasa que se puede obtener mediante la ruta RuMP^{57,84,85}. Efectivamente, al calcular el rendimiento teórico de biomasa usando el método de electrones equivalentes⁸⁶, encontramos que este sería de 0.563 para la ruta de la ribulosa monofosfato contra 0.312 del ciclo de la serina. Considerar que la baja abundancia relativa de *Methylocystis* en la primera etapa de enriquecimiento se explica por diferencias metabólicas y es congruente con el incremento observado en la tasa específica de oxidación de metano^{40,41}. Además, esto sugeriría que *Methylophilus* no genera efectos negativos sobre el crecimiento de *Methylocystis*.

Las condiciones transitorias de nuestros experimentos son propicias para que la eficiencia del consumo de metanol se reduzca como consecuencia de sobre-flujo metabólico, fenómeno que podría surgir a medida que se consume el oxígeno, propiciando la acumulación de intermediarios metabólicos (como metanol o formaldehído). En esta situación, la presencia de la metilotrófica podría disminuir el efecto inhibitorio de estos metabolitos, por lo que el efecto neto de su presencia sería positivo⁸², lo que sugiere que la interacción podría ser mutualista. Sin embargo, si este fuese el caso, no esperaríamos encontrar una reducción tan drástica en la abundancia relativa de *Methylophilus* al término de la segunda etapa de enriquecimiento, por lo que concluimos que es más probable la interacción de este taxón con el metanótrofo sea neutra.

De ser así, esto sería un indicativo de que la metodología fue adecuada para nuestro objetivo, ya que se habrían filtrado interacciones competitivas o neutras. En consecuencia, es más probable que el resto de los taxones presentes mantengan interacciones cooperativas recíprocas. Trabajos similares al nuestro han encontrado que los taxones clasificados en el orden *Burkholderiales*, así como aquellos clasificados en la clase

Bacteroidia, se enriquecen selectivamente junto con taxones metanotróficos^{62,64,87}. A pesar de esto, no podemos concluir que todas las interacciones sean recíprocas con el taxón metanotrófico, ya que el resto de los taxones podría sobrevivir al asociarse en nichos ecológicos que utilicen preferencialmente el carbono disuelto derivado del taxón metanotrófico.

4. Interacciones Metabólicas

4.1. Introducción

El estudio de interacciones microbianas usando modelos metabólicos a escala genómica se realiza mediante una extensión del análisis de flujos metabólicos convencional, en donde los modelos de cada población se conjuntan en uno solo creando compartimientos virtuales correspondientes a cada especie y adicionando un compartimiento que representa el espacio extracelular⁸⁸. Se utiliza la maximización de la suma (ponderada) de la tasa de crecimiento de cada taxón en la comunidad. Desafortunadamente, al usar este objetivo es probable que se llegue a la solución trivial en la que, maximizar el crecimiento del consorcio, es equivalente a maximizar la producción de biomasa del taxón con mayor tasa de crecimiento. Para solventar esto se propuso OptCom^{89,90}, que usa optimización bi-nivel en la que el programa externo maximiza la tasa de crecimiento del consorcio y el interno maximiza el crecimiento de cada taxón de forma individual. Aunque esta propuesta se ajusta mejor a observaciones experimentales⁹¹, esto se logra con un alto costo computacional, por lo que no es escalable a modelos con más de pocos miles de reacciones. Esto limita la aplicación del modelado metabólico a sistemas simples, compuestos por un número limitado de microorganismos, usualmente menores a tres, lo que ignoraría la contribución de las interacciones bióticas de mayor orden⁹².

Una de las mayores limitantes de estos esquemas es que no incluyen la cantidad de biomasa explícitamente en su formulación. Esto tiene dos consecuencias: en primer lugar, no pondera los flujos extracelulares por la cantidad de biomasa cada taxón, efectivamente igualando el valor de flujos extracelulares específicos ($mol\ g_{cel}^{-1}\ h^{-1}$) a flujos absolutos ($mol\ h^{-1}$). En segundo lugar, y de consecuencias más graves, es que al no existir una relación entre los flujos extracelulares y la tasa de crecimiento, es posible encontrar soluciones donde un taxon produzca metabolitos extracelulares, a pesar de que su tasa de crecimiento sea cero. Tanto SteadyCom⁹³ como MICOM⁹⁴ utilizan una formulación donde la producción extracelular es igual al flujo “agregado”, que es el resultado de ponderar el flujo extracelular del taxón k por su cantidad de biomasa. Para imponer que todos los taxones tengan tasa de crecimiento positiva, SteadyCom agrega la restricción adicional de que todos los taxones tengan la misma tasa de crecimiento a través del tiempo, una suposición razonable para comunidades que no varían demasiado su composición promedio. MICOM no asume equidad en las tasas de crecimiento, en su lugar, minimiza la norma L2 del vector de tasas de crecimiento. Esta regularización distribuye el crecimiento de todos los taxones, con lo que permite encontrar una distribución consistente con una tasa de crecimiento grupal dada.

En nuestro trabajo utilizamos MICOM dado que las suposiciones de esta formulación se aproximan mejor a las condiciones de nuestros experimentos. Definimos un coeficiente de interacción entre dos taxones que cuantifica el flujo de carbono que un taxón puede proveer a otro en la comunidad. Se simularon los modelos mediante cadenas de Markov en donde se alternaban las reacciones de consumo activas en *Methylocystis* y se calcularon los coeficientes de interacción para todos los taxones en cada simulación. A partir de estas simulaciones se identificaron tres taxones que pueden generar interacciones cooperativas con *Methylocystis*.

4.2. Métodos

4.2.1. Inferencia del metagenoma.

Se utilizó PICRUST2⁴⁷ para predecir las funciones metabólicas presentes en cada consorcio, con un valor de corte del índice al taxon de referencia más cercano (NSTI) de 2. Las funciones metabólicas presentes en cada muestra se obtienen en dos formatos: la abundancia de reacciones con clasificación EC y la abundancia de rutas metabólicas de METACYC presentes en cada muestra. Adicionalmente, PICRUST2 estima el número de copias del gen 16S para cada OTU, y calcula la abundancia relativa corregida con esta información (Figuras 3.3 y 3.4).

4.2.2. Reconstrucción metabólica

Para obtener una reconstrucción metabólica para cada taxón en nuestro consorcio, se utilizó una metodología deductiva⁴⁹ en la que se reconstruyó y curó un modelo “universal” para consorcios metanotróficos, y posteriormente se utilizó dicho modelo como plantilla para reconstruir modelos específicos para cada taxón. Las reacciones presentes en el modelo universal se asignaron en base a las reacciones presentes en las rutas metabólicas predichas por PICRUST2. El proceso de reconstrucción se realizó en COBRApy⁹⁵, mediante programas escritos por nosotros para acceder a la versión 24.0 de MetaCyc⁹⁶ y PythonCyc^{97,98}.

Las reacciones se curaron manualmente para corregir errores en su estequiometría. La reversibilidad de cada reacción se asignó calculando la energía libre de reacción (ΔG_r) en condiciones fisiológicas usando el método de contribución de componentes implementado en el paquete eQuilibrator en Python⁹⁹. Con base a resultados previos^{49,100} se asumió que la concentración intracelular de metabolitos es similar en todos los filos bacterianos. Para los metabolitos disponibles, se utilizaron las concentraciones reportadas en otros metanótrofos¹⁰¹. Para los metabolitos sin información, se usó como referencia las concentraciones medidas en otros trabajos¹⁰⁰ y al resto se le asignó una concentración

mínima de 0.01mM y máxima de 10mM⁴⁹. La reversibilidad de las reacciones para las que no se puede calcular la ΔG_r , se asignó en base a información de la base de datos MetaCyc.

Los componentes de la reacción de biomasa se reconstruyeron compilando la información de modelos publicados para otros metanótrofos¹⁰²⁻¹⁰⁴ y componentes universales publicados previamente⁴⁹. Los componentes de la biomasa se agruparon en subcategorías correspondientes a las macromoléculas que forman (Anexo 3). La reacción de formación de biomasa en el modelo se dividió en dos etapas. El primer conjunto de reacciones forma cada macromolécula a partir de los metabolitos correspondientes a esta. Los coeficientes estequiométricos se asignan de acuerdo con la composición compilada (Anexo 3). La molécula de biomasa se produce en otra reacción a partir de cada clase de macromolécula. En esta reacción también se incluyen la demanda de ATP, NADH y NADPH necesarias. Los coeficientes estequiométricos de esta reacción se normalizaron para que la molécula de biomasa tenga peso molecular equivalente a 1 g mol^{-1} ¹⁰⁵. Posterior a esto, se evaluó que cada componente de la biomasa pudiera producirse a partir de metano y medio mineral. En caso de que faltaran reacciones para producir algún componente, en lugar de agregar reacciones de forma individual, se agregaron las rutas metabólicas de MetaCyc que conectaban los metabolitos necesarios.

Finalmente, se corrigieron manualmente la reversibilidad de las reacciones para eliminar los ciclos estequiométricamente balanceados, ciclos que pueden producir masa y energía de la nada^{106,107}. Para hacer esto, se resolvieron los Problemas S1 y S2 (anexo 1) de forma iterativa, a partir de estos problemas se determinaban los metabolitos que pueden producirse o consumirse sin fuente de carbono, así como el conjunto de reacciones mínimas necesarias para la producción de estos.

PICRUST2 permite inferir las rutas metabólicas presentes en cada taxón. Se usó esta inferencia para reconstruir modelos específicos para cada taxón, con la diferencia de que las reacciones se compilaban del modelo universal en lugar de la base de datos. La reconstrucción de reacción de biomasa específica para cada taxón, se hizo considerando que cada componente en la formulación de la biomasa (Anexo 3) participaría en la reacción solo si este componente se encontraba en la reconstrucción del taxón k . Finalmente se usó el modelo universal como plantilla para el proceso de relleno de brechas de cada modelo reconstruido¹⁰⁸.

4.2.3. Análisis de interacciones metabólicas

El análisis de flujos metabólicos para una comunidad microbiana que contiene K taxones busca resolver el siguiente problema:

$$\begin{aligned} \max_v \mu_C &= \sum_k a^k \mu_k \\ \text{s. a. } [S^k v^k &= 0], \quad \forall k \in K \\ u_i^C + e_i^C + \sum_{k \in K} v_{ex(i)}^k &= 0, \quad \forall i \in I^C \\ Lb_j^k \leq v_j^k \leq Ub_j^k, &\quad \forall j \in J^k \end{aligned}$$

donde μ_C representa la tasa de crecimiento de la comunidad, S^k es la matriz de coeficientes estequiométricos y v^k el vector de flujos de reacción para todas las reacciones J^k que pertenecen al taxon k . Los metabolitos que se encuentran en el espacio extracelular se contienen en el vector I^C , la tasa a la que el metabolito i se importa o exporta al ambiente se representan por u_i^C y e_i^C respectivamente, mientras que $v_{ex(i)}^k$ es la tasa a la que el taxón k consume o produce el metabolito extracelular i .

La función objetivo es una suma ponderada de las reacciones de crecimiento. Si consideramos que:

$$\sum_{k \in K} a^k = a_o$$

es la biomasa total de la comunidad, y que:

$$V_{ex(i)}^k = a^k v_{ex(i)}^k$$

podemos extender el problema anterior para normalizar los flujos de producción extracelular a la cantidad de biomasa de cada taxon. En el caso especial en el que $a_o = 1$ y a^k representa la abundancia relativa del taxón k tenemos:

$$\begin{aligned} \max_v \mu_C &= \sum_k a^k \mu_k \\ \text{s. a. } [S^k v^k &= 0], \quad \forall k \in K \\ u_i^C + e_i^C + \sum_{k \in K} a^k v_{ex(i)}^k &= 0, \quad \forall i \in I^C \\ Lb_j^k \leq v_j^k \leq Ub_j^k, &\quad \forall j \in J^k \\ Lb_{ex(i)}^k \leq a^k v_{ex(i)}^k \leq Ub_{ex(i)}^k, &\quad \forall i \in I^C \end{aligned} \quad \text{Problema 1}$$

Aun con las consideraciones adicionales, al resolver el problema 1 encontraremos que la solución que maximiza μ_C es maximizar la producción de biomasa del taxón con mayor tasa de crecimiento, un resultado que dista de la realidad cuando sabemos que hay varios taxones presentes en la comunidad. Esto es una consecuencia de que esta formulación no reconoce que, en el crecimiento de comunidades microbianas, operan dos fuerzas que están en desacuerdo: el beneficio máximo para la comunidad que se obtiene mediante la cooperación y el “deseo egoísta” en el que cada taxon busca maximizar su crecimiento. Los autores de MICOM propusieron resolver el siguiente problema:

$$\begin{aligned} & \min_v \|\boldsymbol{\mu}\|_2 \\ & \text{s. a } \mu_C \leq \alpha \mu_C \\ & \text{Balance de masa} \end{aligned} \quad \text{Problema 2}$$

que es la formulación que utilizamos para nuestras simulaciones. En el problema 2 se consideran las dos fuerzas opuestas descritas, ya que, al limitar μ_C a una fracción α de su máximo, se crea un compromiso entre el crecimiento individual y el comunitario que fuerza a la cooperación; mientras que minimizar la norma-L2 del vector de tasas de crecimiento $\boldsymbol{\mu}$ distribuye el crecimiento total entre todos los taxones presentes, representando la maximización del crecimiento individual. La fracción α es un hiperparámetro a ser seleccionado, en adelante nos referiremos a este como compensación cooperativa. Los autores originales proponen que debe elegirse al valor más grande con el que se encuentren el mayor número de tasas de crecimiento distintas de cero. Durante la exploración de este parámetro en nuestros modelos, encontramos que todas las tasas de crecimiento son positivas siempre que $\alpha < 1$, por lo que fijamos la compensación cooperativa a 0.9 para todas las simulaciones. El procedimiento utilizado para garantizar la estabilidad numérica de la solución se describe en el en el trabajo original⁹⁴.

4.2.3.1. Cálculo de coeficientes de interacción.

En los modelos se definieron las reacciones extracelulares de forma tal que $v_{ex(i)}^k > 0$ cuando la dirección del flujo es del exterior al interior de la célula. Cuantificamos el efecto que tiene el taxón l sobre el taxón m de la siguiente forma:

Definimos el conjunto de metabolitos importados por m como

$$I^m = \{i \in I^C : v_{ex(i)}^m > 0\}$$

la tasa de carbono total importado por m sería

$$V_u^m = a_m \sum_i \omega_i v_{ex(i)}^m, \quad \forall i \in I^m$$

donde ω_i es el número de c-mol contenidos en un mol del metabolito i . En la misma línea, definimos el flujo de carbono proveniente de l como:

$$V_T^l = -a_l \sum_i \omega_i v_{ex(i)}^l, \quad \forall i \in I^m$$

Este valor cuantifica cuánto carbono del conjunto de metabolitos I^m está siendo producido o consumido por l . Cuantificamos la cantidad de carbono producido por el resto de los taxones mediante

$$V_e^K = - \sum_k a_k \sum_i \omega_i v_{ex(i)}^k, \quad \forall \{i \in I^m : v_{ex(i)}^k < 0\} \forall k \neq l, m$$

Y la cantidad de carbono consumido por el resto de los taxones como

$$V_u^K = - \sum_k a_k \sum_i \omega_i v_{ex(i)}^k, \quad \forall \{i \in I^m : v_{ex(i)}^k > 0\} \forall k \neq l, m$$

Con estas definiciones, el coeficiente de interacción de l sobre m sería:

$$IC_{m,l} = \begin{cases} \frac{V_T^l}{V_T^l + V_e^K} & \text{si } \text{sign}(V_T^l) = \text{sign}(V_u^m) \\ \frac{V_T^l}{V_e^K + V_u^K} & \text{si } \text{sign}(V_T^l) \neq \text{sign}(V_u^m) \end{cases}$$

De esta forma el coeficiente $IC_{m,l}$ estará contenido en el intervalo $(-1, 1)$ y cuantifica la fracción de carbono que el taxón l puede aportar al taxón m cuando $\text{sign}(V_T^l) = \text{sign}(V_u^m)$; o la fracción de carbono que el taxón l impide que m consuma cuando $\text{sign}(V_T^l) \neq \text{sign}(V_u^m)$. Una característica importante que emerge de estas definiciones es que los coeficientes no son simétricos, es decir que $IC_{m,l} \neq IC_{l,m}$. Esto permite inferir si los taxones m y l mantienen interacciones cooperativas, competitivas, parasitarias o neutras.

4.2.3.2. Simulaciones por cadenas de Markov.

La inferencia de interacciones metabólicas es sensible al grupo de metabolitos para los cuales hay reacciones de transporte extracelular. Si las reacciones de este grupo no se representan adecuadamente, los resultados del análisis estarán sesgados. Desafortunadamente, una de las limitantes de usar métodos computacionales para inferir el metagenoma de una muestra, es que solo se pueden predecir funciones que están presentes en las bases de datos, por lo que nunca es posible identificar la diversidad genética realmente presente en la muestra. Esto condiciona al investigador a seleccionar manualmente el conjunto de reacciones de transporte presentes en cada taxón, es decir el

conjunto de metabolitos contenidos en I^C . A pesar de que este sesgo no se puede evitar, si es posible utilizar metodologías que reduzcan su influencia en el análisis.

Supongamos que el conjunto de metabolitos en I^C esté dado y sea invariable. Bajo esta condición, lo que pretenderíamos hacer es encontrar el grupo de reacciones de transporte que están activas en todo momento. Contengamos la información de que reacciones de transporte están activas en el vector $\boldsymbol{\gamma}^k$, entonces

$$\boldsymbol{\gamma}^k = [x_{ex(i)}^k \cdots x_{ex}^k] \quad \forall i \in I^C$$

Donde $x_{ex(i)}^k$ es una variable binaria que indica si la reacción de transporte extracelular del taxón k para el metabolito i está activa. Esto es equivalente a establecer:

$$Ub_{ex(i)}^k = \begin{cases} 100 & \text{si } x_{ex(i)}^k = 1 \\ 0 & \text{si } x_{ex(i)}^k = 0 \end{cases}$$

De esta forma, el problema de inferencia se centra en encontrar las reacciones de intercambio activas, que sean consistentes con la información experimental contenida en los rendimientos de O_2 y CO_2

$$\bar{\boldsymbol{y}} = [\bar{y}_{O_2}, \bar{y}_{CO_2}]$$

No es posible determinar el vector $\boldsymbol{\gamma}^k$ que represente exactamente la información experimental, ya que hay una infinidad de combinaciones de $\boldsymbol{\gamma}^k$ que son consistentes con las observaciones. En su lugar, es posible encontrar el vector $\boldsymbol{\gamma}^k$ con mayor probabilidad de representar la información experimental, es decir la probabilidad posterior $p(\boldsymbol{\gamma}^k | \bar{\boldsymbol{y}})$. Para esto nos apoyamos del teorema de Bayes que establece que:

$$p(\boldsymbol{\gamma}^k | \bar{\boldsymbol{y}}) = \frac{p(\bar{\boldsymbol{y}} | \boldsymbol{\gamma}^k) p(\boldsymbol{\gamma}^k)}{p(\bar{\boldsymbol{y}})}$$

En esta formula $p(\bar{\boldsymbol{y}})$ es una función normalizante que asegura que $p(\boldsymbol{\gamma}^k | \bar{\boldsymbol{y}})$ sea una probabilidad, sin embargo, ya que no tiene ninguna dependencia de $\boldsymbol{\gamma}^k$, el perfil de $p(\boldsymbol{\gamma}^k | \bar{\boldsymbol{y}})$ esta completamente definido por el numerador. Debido a esto, y sin pérdida de generalidad, podemos asumir:

$$p(\boldsymbol{\gamma}^k | \bar{\boldsymbol{y}}) \propto p(\bar{\boldsymbol{y}} | \boldsymbol{\gamma}^k) p(\boldsymbol{\gamma}^k)$$

La probabilidad previa $p(\boldsymbol{\gamma}^k)$ se define con anterioridad al proceso de estimación y contiene nuestra creencia de que $\boldsymbol{\gamma}^k$ tenga una forma particular. Ya que $\boldsymbol{\gamma}^k$ está constituido por un conjunto de variables binarias, en adelante asumiremos que cada una de estas variables sigue una distribución de Bernoulli. Con esta suposición podemos transformar el problema:

en lugar de inferir combinaciones de $\boldsymbol{\gamma}^k$, inferiremos la probabilidad de que la reacción i este activa o no, esto es

$$p(x_{ex(i)}^k | \bar{\boldsymbol{y}}) \propto p(\bar{\boldsymbol{y}} | x_{ex(i)}^k) p(x_{ex(i)}^k | \theta_i) p(\theta_i)$$

donde

$$p_i^k(x_{ex(i)}^k | \theta_i) = \theta_i^{x_{ex(i)}^k} (1 - \theta_i)^{1-x_{ex(i)}^k}$$

Como no hay información que indique que reacciones deben estar activas, asumiremos que la probabilidad previa sigue una distribución uniforme entre cero y uno, esto es:

$$p(\theta_i) = \text{uniform}(0, 1)$$

Debido a la escala y complejidad de los modelos utilizados, no podemos derivar una expresión analítica para la función de similitud $p(\bar{\boldsymbol{y}} | x_{ex(i)}^k)$. A pesar de esto, podemos estimar la forma de la probabilidad posterior $p(x_{ex(i)}^k | \bar{\boldsymbol{y}})$ mediante muestreos por Cadenas de Markov. En resumen, lo que hacemos es simular los modelos de forma iterativa, alternando en cada simulación, y de forma estocástica, los valores de $x_{ex(i)}^k$ y calculando la probabilidad posterior $p(x_{ex(i)}^k | \bar{\boldsymbol{y}})$ asociada. Si se realizara este proceso de manera infinita, eventualmente se encontraría el perfil real de la probabilidad posterior. Por supuesto que hacer esto no es viable, para asegurar que la probabilidad muestreada converja a la probabilidad real en un número finito de iteraciones se han desarrollado algoritmos para muestrear el espacio de soluciones con mayor eficiencia. Nosotros utilizamos una variante del Muestreo de Gibbs Adaptativo desarrollado para tratar problemas con variables binarias^{109,110}.

En primera instancia es necesario definir la forma de la función de similitud $p(\bar{\boldsymbol{y}} | x_{ex(i)}^k)$. Como ya mencionamos, no podemos derivar una expresión analítica para esta función, en su lugar, utilizamos los modelos metabólicos como un proceso generador de información. La entrada a este proceso son las variables del vector $\boldsymbol{\gamma}^k$ y la salida son los rendimientos estimados de O₂ y CO₂, que se contienen en $\hat{\boldsymbol{y}}$. Si asumimos que las estimaciones provienen de una distribución normal multivariable con media en los rendimientos observados tenemos:

$$p(\bar{\boldsymbol{y}} | x_{ex(i)}^k) = p(\hat{\boldsymbol{y}} | \bar{\boldsymbol{y}}) = mv_normal(\hat{\boldsymbol{y}}, \mu = \bar{\boldsymbol{y}}, \Sigma = \bar{\Sigma})$$

Con esto definimos todas las funciones necesarias para la operación del algoritmo, mismo que se detalla en el Anexo 1. Debido a que cada variable $x_{ex(i)}^k$ sigue una distribución de Bernoulli, es congruente asumir que la probabilidad posterior también seguirá una distribución de Bernoulli. Por lo tanto, a partir de los resultados del Muestreo de Gibbs

podemos estimar θ_i a posteriori, que representara nuestra confianza en que la reacción de transporte para el metabolito i en el taxón k esté activa.

4.3. Resultados

4.3.1. Reconstrucción metabólica

Del análisis de secuencias obtuvimos un total de 36 OTUs para el consorcio CIR_19 y 30 OTUs para My_20. PICRUST2 coloca estas secuencias en un árbol filogenético construido a partir de 20,000 genomas de referencia y calcula el NSTI para cada OTU, que es una medida de la distancia de la secuencia problema al genoma de referencia más cercano. De 66 OTUs solamente uno tuvo NSTI mayor al valor de corte predeterminado de 2. Esto indica que los OTUs detectados en los consorcios tienen una representación adecuada en la base de datos, lo que aumenta la confiabilidad de la predicción metagenómica. En total, mediante PICRUST2 inferimos la presencia de 644 rutas metabólicas en ambas muestras. La reconstrucción metabólica universal contiene 1790 reacciones y 1573 metabolitos. Fijamos la demanda de ATP asociada al crecimiento en $6.3 \text{ mmolATP } g\text{Cel}^{-1} h^{-1}$ (determinada previamente) y la demanda asociada al mantenimiento en $3.5 \text{ mmolATP } g\text{Cel}^{-1} h^{-1}$ ¹¹¹.

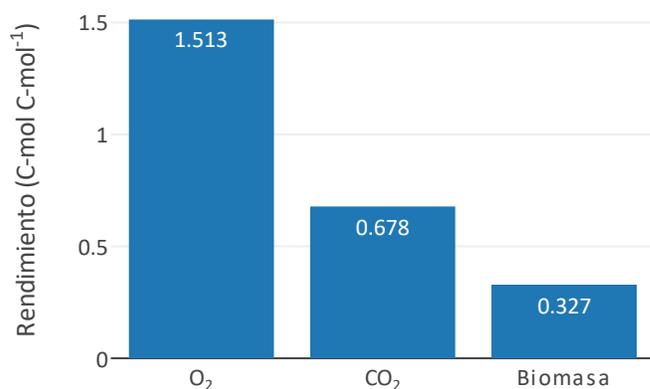


Figura 4.1 Rendimientos de biomasa, CO₂ y O₂ en metano, predichos por el modelo universal.

Para catalizar la reacción de oxidación de metano, la pMMO requiere de dos electrones para activar el oxígeno molecular e incorporarlo al enlace C-H del metano. Hasta el momento no existe un consenso en cuál es el mecanismo por el que se transfieren estos electrones a la pMMO, aunque investigaciones en *Methylocystis hirsuta*⁵⁹ sugieren que podría recibirlos mediante la reducción de ubiquinonas asociados a la actividad del complejo I de la cadena respiratoria, por lo que este fue el mecanismo supuesto en nuestro modelo. Configuramos la estequiometría de la cadena respiratoria para que se ajustase a la razón P/O supuesta de 2.5 (Anexo 4, Tabla S1).

La inferencia hecha con PICRUST2 indica que, tanto el ciclo de la serina como la ruta de la ribulosa monofosfato, están presentes en ambos consorcios. Ya que *Methylocystis* es el único taxón metanotrófico identificado, asumiremos que la asimilación de formaldehído en el modelo universal sigue el ciclo de la serina, pues es esta ruta la que suele estar presente en metanótrofos de la clase *Alfaproteobacteria*⁵⁶⁻⁵⁹. Este ciclo obtiene su nombre de su primera reacción, en la cual se condensan una molécula de glicina y una de formaldehído para formar L-serina, catalizada por la enzima *glicina hidroximetiltransferasa*. La serina se transamina con glioxilato formando hidroxipiruvato y regenerando una molécula de glicina. En las dos reacciones subsecuentes, el hidroxipiruvato primero se reduce y después se fosforila para formar 2-fosfoglicerato (2-PG), mismo que se convierte a fosfoenolpiruvato (PEP) mediante una hidratasa. Parte del 2-PG, así como parte del PEP se drenan del ciclo hacia las rutas biosintéticas centrales para producir biomasa. El carbono restante se utiliza para regenerar el glioxilato necesario para la transaminación de la serina. Esto sucede en dos etapas: en la primera el PEP se carboxila a oxalacetato, se reduce a malato y finalmente se condensa con CoA (gastando un ATP) para formar malil-CoA. El malil-CoA se parte por acción de una *malil-CoA liasa*, regenerando la mayor parte del glioxilato y formando acetil-CoA. En la segunda etapa se regenera el glioxilato restante a partir de acetil-CoA. Hay más de una ruta por la que este proceso puede ocurrir y la inferencia hecha con PICRUST2 indica que en los consorcios se encuentran al menos cuatro: el ciclo del glioxilato, el ciclo del metilaspártato, el ciclo del citramalato y la ruta del etilmalonil-CoA (EMC). Análisis genómicos previos^{56,58} han mostrado que los metanótrofos de la clase *Alfaproteobacteria* utilizan la ruta del EMC ya que no poseen la *isocitrato liasa* necesaria para el Ciclo del Glioxilato ni las enzimas correspondientes para las otras dos rutas. Aunque es posible que esto no sea así para todos los metanótrofos pertenecientes a esta clase, no tenemos más información para discriminar las rutas activas en los consorcios, por lo que ajustamos la reversibilidad de las reacciones del modelo para que el glioxilato se regenere mediante la ruta EMC. Un resumen de los cambios realizados se puede encontrar en la Tabla S2 (Anexo 4).

Con estas suposiciones simulamos el modelo universal fijando la tasa de oxidación de metano a $6.25 \text{ mmol } g_{Cel}^{-1} h^{-1}$, que corresponde a la mayor tasa específica observada en nuestros experimentos. Los rendimientos de biomasa, CO₂ y O₂ predichos por el modelo universal tienen un error promedio de 10.36% respecto a los observados para CIR_19, y de 3.18%, respecto a My_20 (Fig. 4.1). En esta simulación, aproximadamente el 60.4% del formaldehído que se produce es utilizado para la producción de energía, dejando solo la tercera parte restante para el funcionamiento del metabolismo central. Esto es una consecuencia del alto requerimiento energético necesario para mantener el ciclo de la

serina en funcionamiento. Del flujo de carbono que ingresa al ciclo de la serina, el 16.49% se drena hacia las rutas biosintéticas en forma de serina, 2-PG y PEP; con el flujo restante se produce oxalacetato (Fig. 4.2). En el oxalacetato el flujo de carbono se divide en dos: el 27.7% permanece dentro del ciclo de la Serina para regenerar glioxilato y producir Acetil-CoA, mientras el restante se condensa con parte del Acetil-CoA producido y se dirige al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Aproximadamente 67.5% del Acetil-CoA ingresa al TCA, el 22.6% se utiliza para regenerar glioxilato mediante la ruta EMC, la cual, además de glioxilato, produce propionil-CoA; este metabolito se carboxila para formar succinil-CoA.

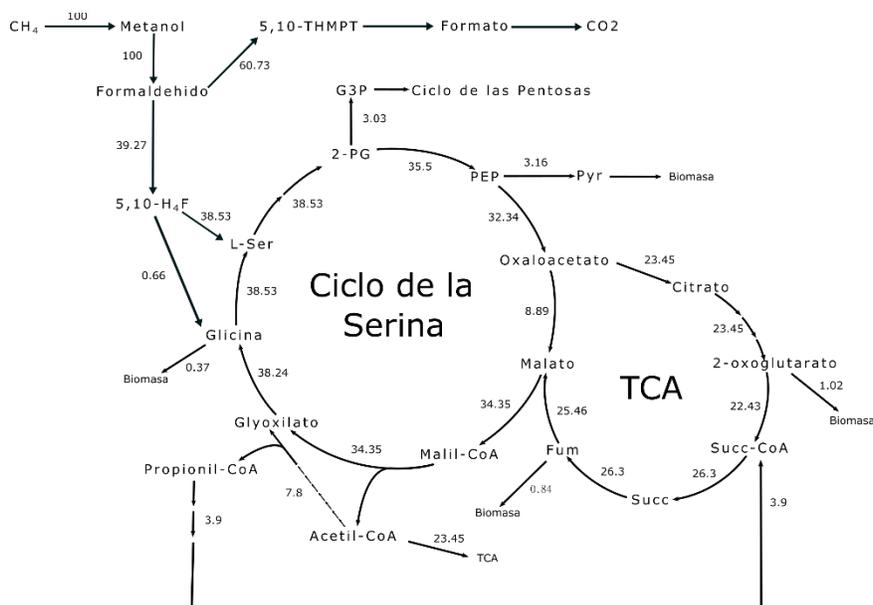


Figura 4.2 Mapa y distribución de flujos del metabolismo central en la simulación del modelo universal. Las cantidades muestran los flujos metabólicos normalizados a $100 \text{ mmolCH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ gCel}^{-1}$.

El TCA tiene dos funciones importantes: la primera de ellas es la producción de 2-oxoglutarato y fumarato para canalizarlos hacia las rutas biosintéticas centrales, que corresponde a 2.8% del flujo de carbono total que entra al TCA; la segunda es incorporar el carbono proveniente de propionil-CoA (ruta EMC) para regenerar malato, mismo que reingresaré al Ciclo de la Serina para producir glioxilato. Un aspecto importante por notar es que, tanto el TCA como la Ruta EMC, operan únicamente para regenerar glioxilato, estas rutas no pueden reponer el carbono que se drena del Ciclo de la Serina para la producción de biomasa. En la simulación, es la *glicina oxidorreductasa* la enzima que cumple esta función anaplerótica esencial para el funcionamiento del Ciclo, resultado que concuerda con modelos previamente reportados¹¹¹. Esta enzima condensa parte del formaldehído con una molécula de amonio y una de CO₂ para producir parte de la glicina necesaria para la actividad de la *glicina hidroximetiltransferasa*.

4.3.2. Análisis de interacciones.

Agrupamos los OTUs de cada consorcio de acuerdo con su clasificación taxonómica a nivel de género, con un total de 17 géneros distintos para el consorcio CIR_19 y 14 para el consorcio My_20 (Anexo 4, Tabla S3). Generamos un modelo para cada uno de estos géneros a partir del modelo universal previamente descrito y combinamos estos modelos en un modelo conjunto para cada consorcio. A diferencia del modelo universal, estos modelos tienen un compartimiento para representar a cada uno de los géneros y un compartimiento extracelular mediante el que se intercambian metabolitos entre todos los géneros. Los metabolitos que se encuentren en el compartimiento extracelular serán los que definan las posibles interacciones metabólicas presentes. Desafortunadamente, mediante PICRUST2 no logramos inferir las reacciones de transporte que pudieran estar presentes en los consorcios. Por el número de metabolitos en los modelos, tratar de inferir aquellos presentes extracelularmente por métodos de optimización¹¹² o topológicos no sería factible por el costo computacional. Es por esto que se eligieron de forma manual los metabolitos extracelulares.

Consideramos que una suposición factible es permitir el intercambio únicamente de metabolitos que participen en las reacciones de biomasa. Por supuesto que, el intercambio de macromoléculas como DNA o lípidos de membrana sería poco realista, por lo que limitamos los metabolitos extracelulares solamente a los pertenecientes a los tipos aminoácidos, carbohidratos, metabolitos intracelulares y cofactores (exceptuando compuestos poliméricos, protohemos y cofactores redox) (Anexo 3).

El primero de los resultados que buscamos analizar fue la fracción de metanol secretada al espacio extracelular, ya que este es un factor determinante para el balance energético en *Methylocystis*. Con las suposiciones hechas hasta el momento, el modelo de CIR_19 predice que todo el metanol producido se secreta al espacio extracelular y que esto ocurre independientemente del valor elegido para la compensación cooperativa (Fig. S1a). A pesar de que metanótrofos de la Clase *Alfaproteobacteria* son capaces de crecer en compuestos de más de un solo carbono como ácidos o alcoholes^{58,84}, consideramos que este resultado tiene poca relevancia biológica. Recordemos que el metanol se produce en el espacio periplásmico de *Methylocystis*, al tener acceso preferencial a este compuesto esperaríamos altos niveles de expresión en las enzimas requeridas para su oxidación⁵⁸, la presencia de estas enzimas hace poco probable que el flujo de las reacciones río abajo del metanol sea completamente cero.

Investigando a detalle los metabolitos que proveen de carbono a *Methylocystis*, encontramos que es necesario inactivar las reacciones de consumo de 27 metabolitos en este género, antes de que la fracción de metanol secretado sea menor a uno (Fig. S2b). Una

nueva simulación con estos ajustes sobrestima el rendimiento de oxígeno para CIR_19 en 30% y para My_20 en 6%; de igual forma, subestima el rendimiento de biomasa en 32% y 8% para CIR_19 y My_20 respectivamente (Fig. S2a). La discrepancia entre los rendimientos medidos y los predichos por el modelo indican que inactivar el consumo de los 27 metabolitos en *Methylocystis* tampoco es una condición biológica factible, ya que este cambio restringió el balance de tal forma que se redujo la eficiencia de asimilación de carbono drásticamente.

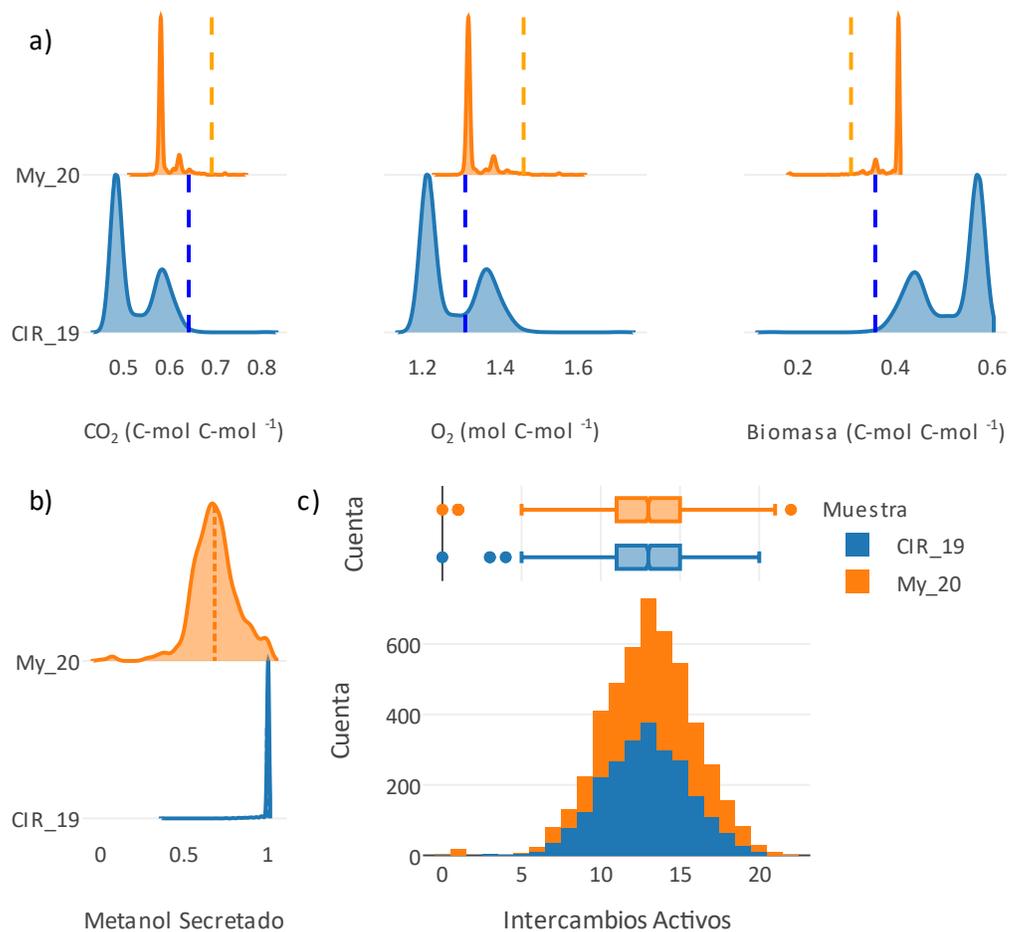


Figura 4.3 Resultados de cuatro cadenas de Markov con 599 simulaciones para cada consorcio. En a) se muestran la distribución de los rendimientos predichos en las simulaciones, las líneas punteadas marcan los rendimientos experimentales. En b) se muestra la distribución de la fracción de metanol que *Methylocystis* libera al espacio extracelular. En c) se muestra la distribución del número de reacciones de consumo de *Methylocystis* que están activas en cada simulación.

Suponemos que una solución relevante debe encontrarse en un punto medio entre tener las 27 reacciones de intercambio activas y tener las 27 inactivas. Usamos cadenas de Markov para aproximar el conjunto de reacciones activas con mayor probabilidad de representar los datos experimentales. Se simularon cuatro cadenas para cada consorcio, con 599 simulaciones en cada cadena para un total de 2396 simulaciones por consorcio. Las condiciones iniciales para cada cadena son independientes entre sí, dos de ellas representan los casos extremos en los que las 27 reacciones están activas o cerradas, mientras que las otras dos se tomaron de una distribución uniforme. La cantidad de reacciones activas a la vez converge para todas las cadenas, centrando la moda en 13 para ambos consorcios (Fig 4.3c). La probabilidad de que cada reacción esté activa se muestra en la figura 4.4. Definimos que la región equivalente esté comprendida entre 0.45 y 0.55. Cualquier probabilidad que se encuentre dentro de esta región indica que la incertidumbre es demasiado alta, por lo que no podemos definir con certeza si la reacción correspondiente estará activa o no.

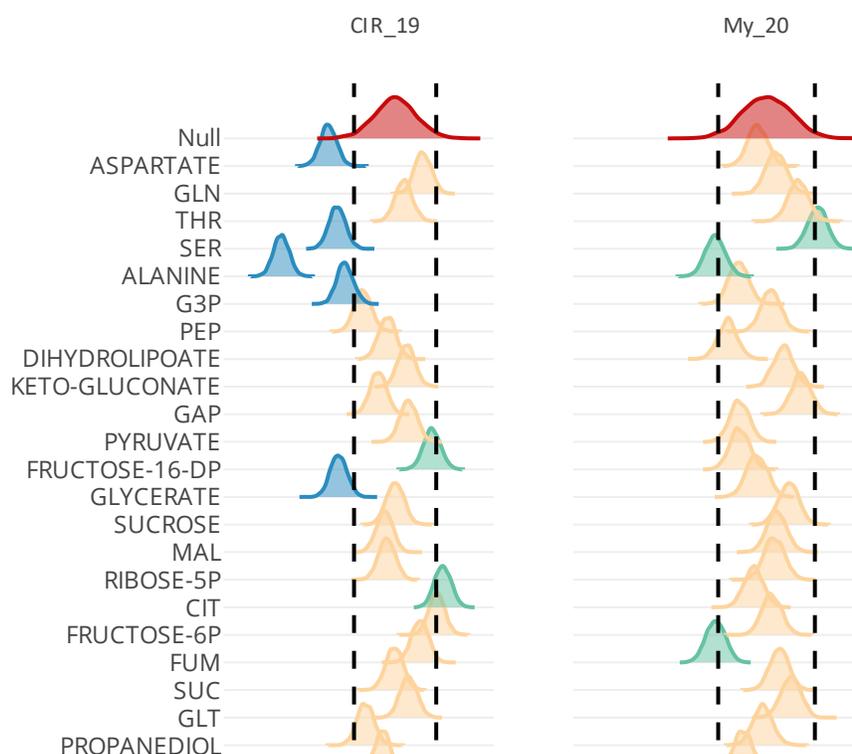


Figura 4.4 Intervalos de credibilidad (IC) del parámetro θ para las 27 reacciones de consumo seleccionadas de *Methylocystis*. Este parámetro indica la probabilidad de que la reacción este activa (valor cercano a 1) o inactiva (valor cercano a 0). Las líneas punteadas delimitan la región equivalente (RE) comprendida entre 0.45 y 0.55. El color indica la proporción del IC que esta fuera de la RE: azul cuando esta proporción es mayor al 90%, amarillo cuando es menor al 10% y verde en los demás casos.

Bajo este criterio, no identificamos ninguna reacción con alta probabilidad de estar activa y solamente hay 8 reacciones cuya probabilidad está por debajo de la región equivalente (Fig. 4.4). La fracción de metanol secretado en las simulaciones de CIR_19 tiene su media en 0.99, por lo cual podemos deducir que, independientemente de la combinación de reacciones activas, la solución óptima sería que *Methylocystis* secreta metanol al medio extracelular (Fig. 4.3b y 4.3c). Esta predicción podría originarse en la baja abundancia relativa de *Methylocystis* que en CIR_19 es solo 1% del total. En efecto, las simulaciones de My_20 muestran que, cuando la abundancia relativa de *Methylocystis* aumenta, la fracción de metanol secretado disminuye (la media para My_20 es 0.67, Fig. 4.3b). Sin embargo, consideramos que la abundancia relativa no es el factor determinante para este resultado. Podemos observar que, para ambos consorcios, los rendimientos experimentales (líneas punteadas en Fig. 4.3a) están fuera de los intervalos de alta densidad de las distribuciones predichas en nuestras simulaciones.

En particular, los rendimientos de oxígeno (con moda en 1.2 para CIR_19 y 1.3 para My_20) son menores a los observados experimentalmente, lo cual nos lleva a suponer que secretar metanol favorece el balance energético de *Methylocystis*. Cuando *Methylocystis* secreta metanol, evita el flujo de carbono por el ciclo de la serina; si lograra recuperar el carbono donado en forma de alcoholes o ácidos orgánicos, ahorraría las moléculas de ATP y NAD(P)H necesarias para el funcionamiento de esta ruta. El ahorro energético explicaría el incremento en el rendimiento de biomasa ya que la fracción de carbono que necesita ser oxidado para generar energía se reduciría.

También encontramos variaciones grandes en los coeficientes de interacción, tanto de *Methylocystis* como del resto de los géneros (Fig. S4). En el promedio de las 2396 simulaciones para cada muestra encontramos que solo cuatro géneros producen coeficientes de interacción positivos entre sí (Fig. S5): *Methylocystis*, *Methylophilus*, *Hyphomicrobium* y *Sedimebacterium*, además de que los tres últimos son los únicos que afectan positivamente a *Methylocystis*. El coeficiente de interacción que representa el efecto que tiene *Methylophilus* en *Methylocystis* es el que muestra la mayor varianza (Fig. 4.5). A pesar de esto, es mayormente positivo, pues solo en 14 de las 2396 simulaciones el coeficiente toma valores negativos.

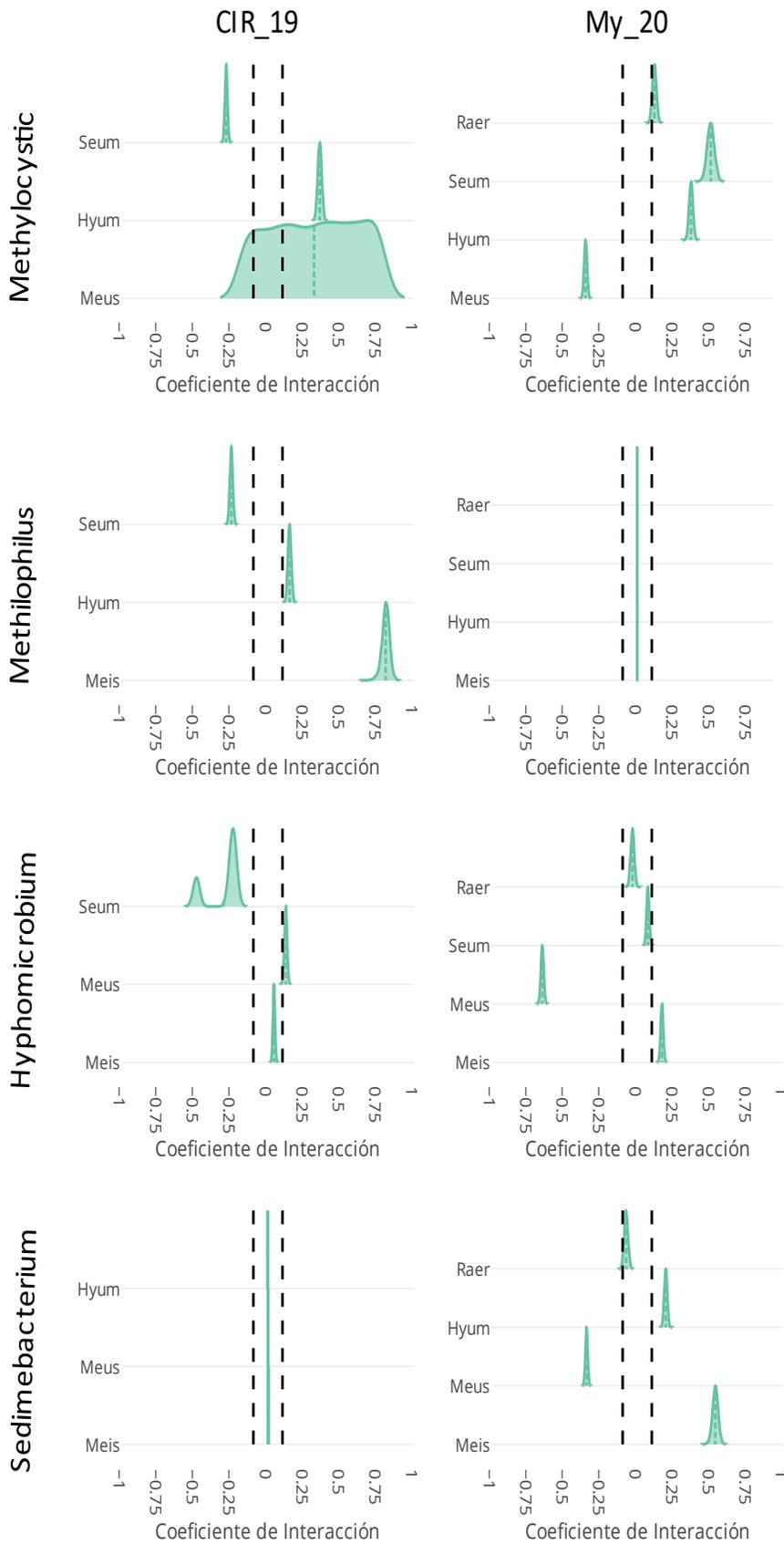


Figura 4.5 Intervalos de credibilidad del coeficiente de interacción en 2396 simulaciones, para los taxones seleccionados. Se muestra el efecto que los taxones en el eje de las ordenadas tienen sobre el taxón indicado en cada fila.

Para entender mejor los fenómenos que gobiernan la interacción de estos géneros, decidimos estudiar el espacio extracelular de dos simulaciones (para ambos consorcios), aquella con el mayor coeficiente negativo de *Methylophilus* a *Methylocystis*, que corresponde a la condición en la que las 27 reacciones de consumo están inactivas (condición A); y una en la que las reacciones activas se decidieran con las probabilidades inferidas de las cadenas de Markov (condición B). Los coeficientes de interacción de estas simulaciones se muestran en la Figura 4.6. *Methylocystis* es el género con mayor número de interacciones positivas hacia al resto de taxones en la comunidad, a pesar de ello, en el consorcio CIR_19 el carbono que produce se distribuye en solo 7 metabolitos (Figuras S5 y S6), principalmente metanol y un ácido orgánico (formato en la condición A y fumarato en la B). En ambas condiciones consume aminoácidos del espacio extracelular, sin embargo, solo un tercio de su consumo proviene de *Methylophilus*, los aminoácidos restantes se producen entre *Hyphomicrobium* y *Terrimonas*, y representan metabolitos en competencia por *Methylophilus* y *Methylocystis*.

La mayor parte de la producción extracelular de *Methylophilus* se concentra en carbohidratos y ácidos orgánicos (piruvato y succinato) para ambas condiciones. Debido a la poca flexibilidad de esta producción, la naturaleza de la interacción entre estos géneros estará definida por la capacidad de *Methylocystis* de consumir los metabolitos que *Methylophilus* pueda proveer. Si esta capacidad fuera demasiado restringida, entonces ambos géneros competirían por el mismo conjunto de aminoácidos.

En el consorcio My_20, *Methylocystis* produce metanol y PEP, además de otros 7 metabolitos en la condición A y 16 en la condición B (Figuras S7 y S8). *Sedimebacterium*, que solo produce coeficientes positivos hacia *Methylocystis* en este consorcio, consume ácidos orgánicos como fuente primaria (acetato, malato, formato, succinato o propionato). Inesperadamente, estos ácidos no provienen de *Methylocystis*, en su lugar los obtiene de *Hyphomicrobium*, *Terrimonas* y *Ramlibacter*. El carbono que se distribuye desde *Methylocystis* hasta *Sedimebacterium* al final beneficia a la metanotrófica, pues habilita la producción de hasta 8 aminoácidos que *Methylocystis* puede consumir.

4.4. Discusión

Al utilizar un modelo universal, curado para representar el potencial metabólico de comunidades metanotróficas, se logró reconstruir 25 modelos metabólicos para los géneros presentes en nuestros consorcios. Usando estos modelos, se confirmó el papel central que tienen los microorganismos metanotróficos en sus comunidades, ya que a pesar de que en las simulaciones solo se alternaron 27 reacciones de consumo en *Methylocystis*, estos cambios impactaron en el balance de carbono de toda la comunidad, como lo muestra la

distribución bimodal de los rendimientos de O₂, CO₂ y biomasa total predichos (Fig. 4.2a). Debido a que la varianza en los rendimientos es mayor en CIR_19 que en My_20, suponemos que el balance comunitario se vuelve más sensible a cambios en el balance energético de *Methylocystis* a medida que este género disminuye su abundancia relativa en el consorcio, sin embargo, no investigamos a fondo esta relación.

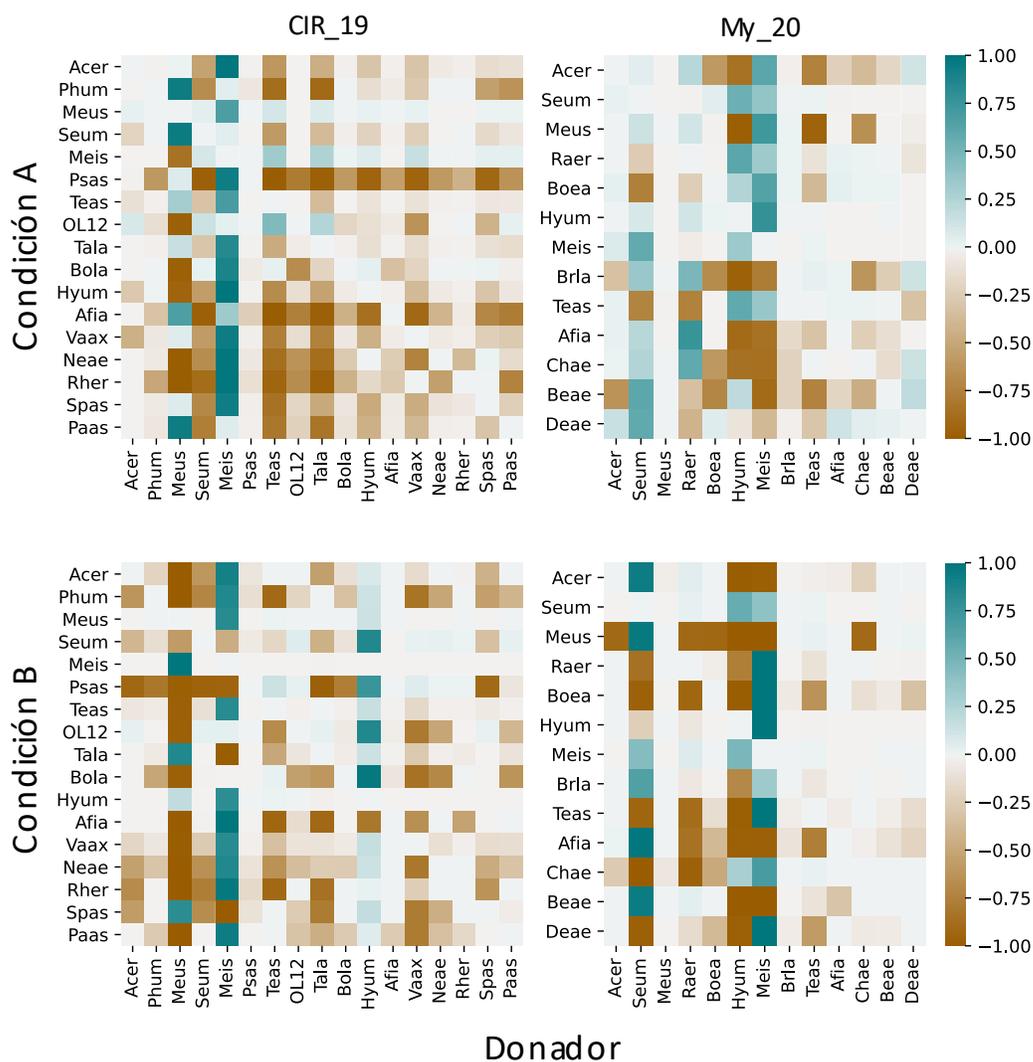


Figura 4.6 Coeficientes de Interacción para las simulaciones cuando las 27 reacciones de consumo en *Methylocystis* están inactivas (condición A), y cuando las reacciones activas se eligieron con base a las probabilidades estimadas de las cadenas de Markov (condición B).

Tanto los rendimientos de biomasa y O₂, como el número de reacciones de consumo que pueden estar activas a la vez, muestran que los modelos metabólicos utilizados sobrestiman la capacidad de *Methylocystis* para crecer usando compuestos alternos al metano. Si bien la razón de esto puede estar en una representación inadecuada de la topología de la red metabólica, las predicciones realizadas con el modelo universal sugieren otro origen para

este problema. Una explicación factible es que los modelos no consideran restricciones regulatorias que podrían emerger de la represión catabólica que ejerza el metano sobre el consumo de otros compuestos. A pesar de que por su solubilidad el metano estará en bajas concentraciones, y de que a conocimiento de los autores no hay reportes sobre este fenómeno en microorganismos metanotróficos, lo más acertado es suponer que está presente en ellos, como lo está en la mayor parte de microorganismos. La conclusión es que los rendimientos globales de biomasa, CO₂ y O₂, junto con la abundancia relativa de los taxones, no proveen información suficiente para identificar las reacciones de transporte activas usando la metodología propuesta. Es posible que con las modificaciones adecuadas se logre mejorar la identificación de las reacciones usando la misma información. Se aborda una modificación particular en la sección de perspectivas.

A pesar de esto, sostenemos la validez de las interacciones inferidas usando cadenas de Markov, ya que los coeficientes de interacción predichos son robustos a los cambios en las reacciones de consumo de *Methylocystis* (Fig. 4.5). Otros trabajos sugieren que la interacción entre *Methylophilus* y diversos metanótrofos puede ser de competencia por el metanol⁶² aunque, como se menciona en el capítulo anterior, esta descripción era dependiente de la concentración de lantano en el medio⁶⁷, condición que no estuvo presente en nuestros experimentos. El análisis metabólico destaca la plasticidad de la interacción entre *Methylophilus* y *Methylocystis*, depende de la capacidad metabólica de *Methylocystis*. Las simulaciones en la condición A muestran que, al inactivar las 27 reacciones de intercambio seleccionadas, la interacción entre estas dos bacterias pasa a ser competitiva pues *Methylocystis* pierde la capacidad de consumir los metabolitos producidos por *Methylophilus*. En su lugar, *Methylocystis* genera interacciones de baja intensidad con otros 5 taxones (Fig. 4.6) En cambio, cuando solo una fracción de estas reacciones se activa (condición B), las interacciones de baja intensidad se pierden y se reemplazan con una fuerte interacción positiva con *Methylophilus*.

Anteriormente se ha descrito el efecto positivo del metilótrofo *Hyphomicrobium* sobre la tasa de oxidación de metano en *Methylocystis*⁶⁸, aunque no hay reportes del mecanismo detrás de este efecto, es posible que la presencia de microorganismos metilótrofos reduzcan el efecto inhibitorio de la acumulación de metanol¹¹³. También se ha reportado que microorganismos heterótrofos como *Rhizobium*⁶³, *Sphingopyxis*⁶⁹ y *Cupriavidus*¹¹⁴ pueden promover la actividad metanotrófica mediante la producción de cofactores de crecimiento como vitaminas y aminoácidos. El análisis de este trabajo identifica que tanto *Hyphomicrobium* como *Sedimebacterium* pueden beneficiar a *Methylocystis* mediante la producción de aminoácidos. En particular, la interacción entre *Methylocystis* y *Sedimebacterium* es un ejemplo de los efectos que tienen las interacciones de mayor

orden⁹², ya que el carbono que utiliza *Sedimebacterium* para su crecimiento no lo produce directamente *Methylocystis*, en su lugar lo producen *Hyphomicrobium* y otros taxones. A conocimiento de los autores, no se ha reportado con anterioridad un ciclo de retroalimentación positivo en consorcios metanotróficos, aunque la presencia de estos es común en comunidades naturales^{14,52}. De la misma forma, aunque es común que microorganismos pertenecientes a la clase *Bacterodia* se enriquezcan en consorcios metanotróficos, este es el primer reporte en donde se sugiere que pueden ser beneficiosos para microorganismos metanotróficos. Sin embargo, debido a la naturaleza inferencial de nuestro método de análisis, será necesario validar esta afirmación experimentalmente. En conclusión, podemos afirmar que identificamos tres géneros que podrían formar interacciones cooperativas con *Methylocystis*: *Methylophilus*, *Hyphomicrobium* y *Sedimebacterium*.

5. Conclusiones Generales

Utilizamos un método de selección artificial en dos etapas combinado con un método de inferencia mediante análisis metabólico para identificar posibles microorganismos que formen interacciones metabólicas beneficiosas para la actividad y el crecimiento de bacterias metanotróficas. Los consorcios obtenidos al término de cada etapa tienen estequiometrías de crecimiento típicas para metanótrofos, con relaciones molares CH₄:O₂:CO₂ de 1:1.31:0.64 para CIR_19 y 1:1.46:0.69 para My_20. Los resultados del análisis taxonómico, así como del análisis metabólico, indican que mediante el proceso de selección artificial propuesto se enriquecieron interacciones metabólicas que favorecen a *Methylocystis*. Mediante el procedimiento de simulaciones por cadenas de Markov se identificaron dos géneros microbianos con alta posibilidad de generar interacciones cooperativas con *Methylocystis*: *Hyphomicrobium* y *Sedimebacterium*. Adicionalmente, concluimos que la naturaleza de la interacción entre *Methylocystis* y *Methylophilus* depende de la capacidad metabólica de *Methylocystis*. Aunque reiteramos la necesidad de confirmar experimentalmente las inferencias hechas, concluimos que la metodología propuesta es adecuada para inferir interacciones metabólicas cuando se cuenta con una cantidad limitada de información genómica.

6. Perspectivas

En las estimaciones realizadas en este trabajo, asumimos que todas las reacciones de consumo tienen la misma probabilidad de estar activas, es decir que θ_i está distribuido con una probabilidad uniforme entre 0 y 1. Como lo expusimos con anterioridad, esta no es una

suposición adecuada ya que los procesos de regulación genética pueden ocasionar represión catalítica sobre el consumo de ciertos metabolitos, esto en presencia de metano.

Consideramos que usar el contenido energético de un metabolito es una base adecuada para definir la probabilidad de que ese metabolito sea consumido. Los metabolitos con alto contenido energético generalmente requieren de la producción de maquinaria enzimática costosa para ser catabolizados, por lo que, en presencia de una fuente de carbono primaria, esperaríamos que esta maquinaria tuviera menos probabilidades de producirse, reduciendo la probabilidad de catabolizar el metabolito.

Una medida adecuada del contenido energético de un metabolito es la energía liberada de su reacción de oxidación (ΔG_{ox}). Para relacionar este parámetro con una distribución de probabilidad podemos usar la fórmula de Einstein para la probabilidad de un cambio en la entropía local:

$$p(\Delta S) = Z^{-1} e^{\frac{\Delta S}{k_B}}$$

donde k_B es la constante de Boltzman y Z^{-1} es una función normalizadora. El cambio en la entropía para sistemas fuera del equilibrio se encuentra mediante:

$$\Delta S = \sum_k F_k j_k$$

Donde F_k es la fuerza termodinámica que mueve los flujos j_k . Para reacciones químicas, esta fuerza es el cambio en el potencial químico representado en el parámetro ΔG_{ox} y j_k es el flujo de materia que atraviesa la reacción dada la reacción. Para la situación hipotética en el que todo el flujo de metabolito i que entra en el microorganismo k se oxida, podemos definir la probabilidad previa de que su reacción de consumo este activa, en presencia de una fuente de carbono primaria, mediante:

$$\theta_i = p_i(\Delta S_i) = Z^{-1} e^{\frac{\Delta G_{ox(i)} a_k v_{ex(i)}^k}{k_B}}$$

Con esta modificación, podríamos considerar los efectos de la represión catabólica en nuestro proceso de inferencia por Cadenas de Markov.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología bajo el proyecto PDCPN 2015_241.

Referencias

1. Initiative GM. <https://www.globalmethane.org/methane/index.aspx>.
2. Usepa. *Available and Emerging Technologies for Reducing Greenhouse Gas Emissions from Municipal Solid Waste Landfills.*; 2011.
3. Haynes CA, Gonzalez R. Rethinking biological activation of methane and conversion to liquid fuels. *Nat Chem Biol.* 2014;10(5):331-339. doi:10.1038/nchembio.1509
4. Sabra W, Dietz D, Tjahjajari D, Zeng AP. Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology. *Eng Life Sci.* 2010;10(5):407-421. doi:10.1002/elsc.201000111
5. Rosero-Chasoy G, Rodríguez-Jasso RM, Aguilar CN, Buitrón G, Chairez I, Ruiz HA. Microbial co-culturing strategies for the production high value compounds, a reliable framework towards sustainable biorefinery implementation – an overview. *Bioresour Technol.* 2021;321(November 2020). doi:10.1016/j.biortech.2020.124458
6. McCarty NS, Ledesma-Amaro R. Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2019;37(2):181-197. doi:10.1016/j.tibtech.2018.11.002
7. Goers L, Freemont P, Polizzi KM. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface.* 2014;11(96):20140065-. doi:10.1098/rsif.2014.0065
8. Zengler K, Palsson BO. A road map for the development of community systems (CoSy) biology. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(5):366-372. doi:10.1038/nrmicro2763
9. D'Souza G, Shitut S, Preussger D, Yousif G, Waschina S, Kost C. Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Nat Prod Rep.* 2018;35(5):455-488. doi:10.1039/c8np00009c
10. Wintermute EH, Silver PA. Emergent cooperation in microbial metabolism. *Mol Syst Biol.* 2010;6(407):407. doi:10.1038/msb.2010.66
11. Goldford JE, Lu N, Bajić D, et al. Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science.* 2018;361(6401):469-474. doi:10.1126/science.aat1168
12. Kassen R, Rainey PB. The ecology and genetics of microbial diversity. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:207-231. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123654
13. Wilson M, Lindow SE. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl Environ Microbiol.* 1994. doi:10.1128/aem.60.12.4468-4477.1994
14. Freilich S, Zarecki R, Eilam O, et al. Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat Commun.* 2011;2:589. doi:10.1038/ncomms1597

15. Hardin G. The competitive exclusion principle. *Science* (80-). 1960. doi:10.1126/science.131.3409.1292
16. Lilja EE, Johnson DR. Segregating metabolic processes into different microbial cells accelerates the consumption of inhibitory substrates. *ISME J.* 2016. doi:10.1038/ismej.2015.243
17. Lindemann SR, Bernstein HC, Song H-S, et al. Engineering microbial consortia for controllable outputs. *ISME J.* 2016;10(9):2077-2084. doi:10.1038/ismej.2016.26
18. Hauert C, Wakano JY, Doebeli M. Ecological public goods games: Cooperation and bifurcation. *Theor Popul Biol.* 2008;73(2):257-263. doi:10.1016/j.tpb.2007.11.007
19. Hauert C, Holmes M, Doebeli M. Evolutionary games and population dynamics: maintenance of cooperation in public goods games. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2006;273(1600):2565-2571. doi:10.1098/rspb.2006.3600
20. Hauert C, Monte S De, Hofbauer J. Volunteering as Red Queen Mechanism for Cooperation in Public Goods Games. *Science* (80-). 2007;1129(2002):1129-1132. doi:10.1126/science.1070582
21. Monod J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu Rev Microbiol.* 1949. doi:10.1146/annurev.mi.03.100149.002103
22. Carlson RP, Beck AE, Phalak P, et al. Competitive resource allocation to metabolic pathways contributes to overflow metabolisms and emergent properties in cross-feeding microbial consortia. *Biochem Soc Trans.* 2018;(October 2017):BST20170242. doi:10.1042/BST20170242
23. Flamholz A, Noor E, Bar-Even A, Liebermeister W, Milo R. Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(24):10039-10044. doi:10.1073/pnas.1215283110
24. Du B, Zielinski DC, Monk JM, Palsson BO. Thermodynamic favorability and pathway yield as evolutionary tradeoffs in biosynthetic pathway choice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(44):11339-11344. doi:10.1073/pnas.1805367115
25. Peebo K, Valgepea K, Maser A, Nahku R, Adamberg K, Vilu R. Proteome reallocation in *Escherichia coli* with increasing specific growth rate. *Mol Biosyst.* 2015;11(4):1184-1193. doi:10.1039/C4MB00721B
26. Pacheco AR, Moel M, Segrè D. Costless metabolic secretions as drivers of interspecies interactions in microbial ecosystems. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-018-07946-9
27. Kalyuzhnaya MG, Yang S, Rozova ON, et al. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium. *Nat Commun.* 2013;4(May):1-7. doi:10.1038/ncomms3785
28. Little AEF, Robinson CJ, Peterson SB, Raffa KF, Handelsman J. Rules of engagement: Interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu Rev Microbiol.* 2008. doi:10.1146/annurev.micro.030608.101423

29. Phelan V V., Liu WT, Pogliano K, Dorrestein PC. Microbial metabolic exchange-the chemotype-to-phenotype link. *Nat Chem Biol.* 2012;8(1):26-35. doi:10.1038/nchembio.739
30. Hoek TA, Axelrod K, Biancalani T, Yurtsev EA, Liu J, Gore J. Resource Availability Modulates the Cooperative and Competitive Nature of a Microbial Cross-Feeding Mutualism. *PLoS Biol.* 2016;14(8):1002540. doi:10.1371/journal.pbio.1002540
31. Germerodt S, Bohl K, Lück A, et al. Pervasive Selection for Cooperative Cross-Feeding in Bacterial Communities. *PLoS Comput Biol.* 2016;12(6):1-21. doi:10.1371/journal.pcbi.1004986
32. de Mazancourt C, Schwartz MW. A resource ratio theory of cooperation. *Ecol Lett.* 2010;13(3):349-359. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01431.x
33. Sexton DJ, Schuster M. Nutrient limitation determines the fitness of cheaters in bacterial siderophore cooperation. *Nat Commun.* 2017;8(1). doi:10.1038/s41467-017-00222-2
34. Butler S, O'Dwyer JP. Stability criteria for complex microbial communities. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-05308-z
35. Fletcher JA, Doebeli M. A simple and general explanation for the evolution of altruism. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2009;276(1654):13-19. doi:10.1098/rspb.2008.0829
36. Hillesland KL, Lim S, Flowers JJ, et al. Erosion of functional independence early in the evolution of a microbial mutualism. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(41):14822-14827. doi:10.1073/pnas.1407986111
37. Pande S, Merker H, Bohl K, et al. Fitness and stability of obligate cross-feeding interactions that emerge upon gene loss in bacteria. *ISME J.* 2014;8(5):953-962. doi:10.1038/ismej.2013.211
38. Großkopf T, Zenobi S, Alston M, Folkes L, Swarbreck D, Soyer OS. A stable genetic polymorphism underpinning microbial syntrophy. *ISME J.* 2016;10(12):2844-2853. doi:10.1038/ismej.2016.80
39. Harcombe WR, Chacón JM, Adamowicz EM, Chubiz LM, Marx CJ. Evolution of bidirectional costly mutualism from byproduct consumption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(47):12000-12004. doi:10.1073/pnas.1810949115
40. Gore J, Youk H, Van Oudenaarden A. Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast. *Nature.* 2009;459(7244):253-256. doi:10.1038/nature07921
41. Sanchez A, Gore J. Feedback between Population and Evolutionary Dynamics Determines the Fate of Social Microbial Populations. *PLoS Biol.* 2013;11(4):1001547. doi:10.1371/journal.pbio.1001547
42. Rauch J, Kondev J, Sanchez A. Cooperators trade off ecological resilience and evolutionary stability in public goods games. *J R Soc Interface.* 2017;14(127):1-6. doi:10.1098/rsif.2016.0967

43. Rodríguez-Verdugo A, Vulin C, Ackermann M. The rate of environmental fluctuations shapes ecological dynamics in a two-species microbial system. *Ecol Lett.* 2019;22(5):838-846. doi:10.1111/ele.13241
44. Zhuang K, Izallalen M, Mouser P, et al. Genome-scale dynamic modeling of the competition between *Rhodospirillum rubrum* and *Geobacter* in anoxic subsurface environments. *ISME J.* 2011;5(2):305-316. doi:10.1038/ismej.2010.117
45. Aßhauer KP, Wemheuer B, Daniel R, Meinicke P. Tax4Fun: Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics.* 2015;31(17):2882-2884. doi:10.1093/bioinformatics/btv287
46. Iwai S, Weinmaier T, Schmidt BL, et al. Piphillin: Improved prediction of metagenomic content by direct inference from human microbiomes. *PLoS One.* 2016;11(11):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0166104
47. Douglas G, Maffei V, Zaneveld J, et al. PICRUSt2: An improved and customizable approach for metagenome inference. *PICRUSt2 An Improv extensible approach metagenome inference.* June 2019:672295. doi:10.1101/672295
48. Franzosa EA, Mclver LJ, Rahnavard G, et al. Species-level functional profiling of metagenomes and metatranscriptomes. *Nat Methods.* 2018;15(11):962-968. doi:10.1038/s41592-018-0176-y
49. Machado D, Andrejev S, Tramontano M, Patil KR. Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(15):7542-7553. doi:10.1093/nar/gky537
50. Edirisinghe JN, Weisenhorn P, Conrad N, et al. Modeling central metabolism and energy biosynthesis across microbial life. *BMC Genomics.* 2016;17(1). doi:10.1186/s12864-016-2887-8
51. Magnúsdóttir S, Heinken A, Kutt L, et al. Generation of genome-scale metabolic reconstructions for 773 members of the human gut microbiota. *Nat Biotechnol.* 2017;35(1):81-89. doi:10.1038/nbt.3703
52. Machado D, Maistrenko OM, Andrejev S, et al. Polarization of microbial communities between competitive and cooperative metabolism. *Nat Ecol Evol.* 2021. doi:10.1038/s41559-020-01353-4
53. Smith GJ, Wrighton KC. Metagenomic approaches unearth methanotroph phylogenetic and metabolic diversity. *Curr Issues Mol Biol.* 2019;33:57-84. doi:10.21775/cimb.033.057
54. Semrau JD, Dispirito AA, Yoon S. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34(4):496-531. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x
55. Whitaker WB, Sandoval NR, Bennett RK, Fast AG, Papoutsakis ET. Synthetic methylotrophy: Engineering the production of biofuels and chemicals based on the biology of aerobic methanol utilization. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;33:165-175. doi:10.1016/j.copbio.2015.01.007

56. Korotkova N, Chistoserdova L, Kuksa V, Lidstrom ME. Glyoxylate regeneration pathway in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol.* 2002;184(6):1750-1758. doi:10.1128/JB.184.6.1750-1758.2002
57. Šmejkalová H, Erb TJ, Fuchs G. Methanol assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1: Demonstration of all enzymes and their regulation. *PLoS One.* 2010;5(10). doi:10.1371/journal.pone.0013001
58. Vorobev A, Jagadevan S, Jain S, et al. Genomic and transcriptomic analyses of the facultative methanotroph *Methylocystis* sp. strain SB2 grown on methane or ethanol. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(10):3044-3052. doi:10.1128/AEM.00218-14
59. Bordel S, Rodríguez Y, Hakobyan A, Rodríguez E, Lebrero R, Muñoz R. Genome scale metabolic modeling reveals the metabolic potential of three Type II methanotrophs of the genus *Methylocystis*. *Metab Eng.* 2019;54:191-199. doi:10.1016/j.ymben.2019.04.001
60. Beck DAC, Kalyuzhnaya MG, Malfatti S, et al. A metagenomic insight into freshwater methane-utilizing communities and evidence for cooperation between the *Methylococcaceae* and the *Methylophilaceae*. *PeerJ.* 2013;1:e23. doi:10.7717/peerj.23
61. Oshkin IY, Beck DA, Lamb AE, et al. Methane-fed microbial microcosms show differential community dynamics and pinpoint taxa involved in communal response. *ISME J.* 2015;9(5):1119-1129. doi:10.1038/ismej.2014.203
62. Yu Z, Beck DAC, Chistoserdova L. Natural Selection in Synthetic Communities Highlights the Roles of *Methylococcaceae* and *Methylophilaceae* and Suggests Differential Roles for Alternative Methanol Dehydrogenases in Methane Consumption. *Front Microbiol.* 2017;8:2392. doi:10.3389/fmicb.2017.02392
63. Iguchi H, Yurimoto H, Sakai Y. Stimulation of Methanotrophic Growth in Cocultures by Cobalamin Excreted by Rhizobia. *Appl Environ Microbiol.* 2011. doi:10.1128/aem.05834-11
64. Yu Z, Groom J, Zheng Y, Chistoserdova L, Huang J. Synthetic methane-consuming communities from a natural lake sediment. *MBio.* 2019;10(4). doi:10.1128/mBio.01072-19
65. Ho A, Angel R, Veraart AJ, et al. Biotic Interactions in Microbial Communities as Modulators of Biogeochemical Processes: Methanotrophy as a Model System. *Front Microbiol.* 2016;7:1285. doi:10.3389/fmicb.2016.01285
66. Morris JJ, Lenski RE, Zinser ER. The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *MBio.* 2012;3(2):1-9. doi:10.1128/mBio.00036-12
67. Krause SMB, Johnson T, Samadhi Karunaratne Y, et al. Lanthanide-dependent cross-feeding of methane-derived carbon is linked by microbial community interactions. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(2):358-363. doi:10.1073/pnas.1619871114

68. Jeong SY, Kim TG. Development of a novel methanotrophic process with the helper micro-organism *Hyphomicrobium* sp. NM3. *J Appl Microbiol*. 2019;126(2):534-544. doi:10.1111/jam.14140
69. Jeong S-Y, Cho K-S, Kim TG. Density-dependent enhancement of methane oxidation activity and growth of *Methylocystis* sp. by a non-methanotrophic bacterium *Sphingopyxis* sp. *Biotechnol reports (Amsterdam, Netherlands)*. 2014;4:128-133. doi:10.1016/j.btre.2014.09.007
70. Ho A, de Roy K, Thas O, et al. The more, the merrier: heterotroph richness stimulates methanotrophic activity. *ISME J*. 2014;8(9):1945-1948. doi:10.1038/ismej.2014.74
71. Hoefman S, van der Ha D, De Vos P, Boon N, Heylen K. Miniaturized extinction culturing is the preferred strategy for rapid isolation of fast-growing methane-oxidizing bacteria. *Microb Biotechnol*. 2012;5(3):368-378. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00314.x
72. Kim J, Kim DD, Yoon S. Rapid isolation of fast-growing methanotrophs from environmental samples using continuous cultivation with gradually increased dilution rates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(13):5707-5715. doi:10.1007/s00253-018-8978-5
73. Gasol JM, Moran XAG. Cultivation of Methanotrophs. *Hydrocarb Lipid Microbiol Protoc - Springer Protoc Handbooks*. 2015:1-29. doi:10.1007/8623
74. Kwon M, Ho A, Yoon S. Novel approaches and reasons to isolate methanotrophic bacteria with biotechnological potentials: recent achievements and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(1). doi:10.1007/s00253-018-9435-1
75. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(SUPPL. 1):4516-4522. doi:10.1073/pnas.1000080107
76. Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol*. 2016;18(5):1403-1414. doi:10.1111/1462-2920.13023
77. Apprill A, McNally S, Parsons R, Weber L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol*. 2015;75(2):129-137. doi:10.3354/ame01753
78. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852-857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9
79. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-583. doi:10.1038/nmeth.3869
80. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: A versatile open source

tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016;2016(10):e2584. doi:10.7717/peerj.2584

81. Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*. 2012;28(14):1823-1829. doi:10.1093/bioinformatics/bts252
82. Maclean RC, Fuentes-Hernandez A, Greig D, Hurst LD, Gudelj I. A mixture of “cheats” and “co-operators” can enable maximal group benefit. *PLoS Biol*. 2010;8(9). doi:10.1371/journal.pbio.1000486
83. Lee OK, Hur DH, Nguyen DTN, Lee EY. Metabolic engineering of methanotrophs and its application to production of chemicals and biofuels from methane. *Biofuels, Bioprod Biorefining*. 2016;10(6):848-863. doi:10.1002/bbb.1678
84. Schneider K, Peyraud R, Kiefer P, et al. The ethylmalonyl-CoA pathway is used in place of the glyoxylate cycle by *Methylobacterium extorquens* AM1 during growth on acetate. *J Biol Chem*. 2012;287(1):757-766. doi:10.1074/jbc.M111.305219
85. Anthony C. How half a century of research was required to understand bacterial growth on C1 and C2 compounds; the story of the serine cycle and the ethylmalonyl-CoA pathway. *Sci Prog*. 2011;94(2):109-137. doi:10.3184/003685011X13044430633960
86. McCarty PL. Thermodynamic electron equivalents model for bacterial yield prediction: Modifications and comparative evaluations. *Biotechnol Bioeng*. 2007;97(2):377-388. doi:10.1002/bit.21250
87. Fernandez-Gonzalez N, Huber JA, Vallino JJ. Microbial Communities Are Well Adapted to Disturbances in Energy Input. *mSystems*. 2016;1(5). doi:10.1128/msystems.00117-16
88. Stolyar S, Van Dien S, Hillesland KL, et al. Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Mol Syst Biol*. 2007;3(92):1-14. doi:10.1038/msb4100131
89. Zomorodi AR, Maranas CD. OptCom: A multi-level optimization framework for the metabolic modeling and analysis of microbial communities. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(2). doi:10.1371/journal.pcbi.1002363
90. Zomorodi AR, Islam MM, Maranas CD. D-OptCom: Dynamic Multi-level and Multi-objective Metabolic Modeling of Microbial Communities. *ACS Synth Biol*. 2014;3(4):247-257. doi:10.1021/sb4001307
91. El-Semman IE, Karlsson FH, Shoaie S, Nookaew I, Soliman TH, Nielsen J. Genome-scale metabolic reconstructions of *Bifidobacterium adolescentis* L2-32 and *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 and their interaction. *BMC Syst Biol*. 2014. doi:10.1186/1752-0509-8-41
92. Sanchez-Gorostiaga A, Bajić D, Osborne ML, Poyatos JF, Sanchez A. High-order interactions distort the functional landscape of microbial consortia. Shou W, ed. *PLoS Biol*. 2019;17(12):e3000550. doi:10.1371/journal.pbio.3000550
93. Chan SHJ, Simons MN, Maranas CD. SteadyCom: Predicting microbial abundances

- while ensuring community stability. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(5). doi:10.1371/journal.pcbi.1005539
94. Diener C, Gibbons SM, Resendis-Antonio O. MICOM: Metagenome-Scale Modeling To Infer Metabolic Interactions in the Gut Microbiota. *mSystems.* 2020;5(1):1-17. doi:10.1128/msystems.00606-19
 95. Ebrahim A, Lerman JA, Palsson BO, Hyduke DR. COBRApy: CONstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python. *BMC Syst Biol.* 2013;7(1):74. doi:10.1186/1752-0509-7-74
 96. Caspi R, Billington R, Ferrer L, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D471-D480. doi:10.1093/nar/gkv1164
 97. Krummenacker M, Paley S, Mueller L, Yan T, Karp PD. Querying and computing with BioCyc databases. *Bioinformatics.* 2005;21(16):3454-3455. doi:10.1093/bioinformatics/bti546
 98. Karp PD, Paley SM, Midford PE, et al. Pathway Tools version 23.0: Integrated Software for Pathway/Genome Informatics and Systems Biology. *Brief Bioinform.* 2015;11(1):40-79. <http://arxiv.org/abs/1510.03964>. Accessed August 12, 2020.
 99. Noor E, Haraldsdóttir HS, Milo R, Fleming RMT. Consistent Estimation of Gibbs Energy Using Component Contributions. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(7). doi:10.1371/journal.pcbi.1003098
 100. Park JO, Rubin SA, Xu YF, et al. Metabolite concentrations, fluxes and free energies imply efficient enzyme usage. *Nat Chem Biol.* 2016;12(7):482-489. doi:10.1038/nchembio.2077
 101. Yang S, Matsen JB, Konopka M, et al. Global molecular analyses of methane metabolism in methanotrophic alphaproteobacterium, *Methylosinus trichosporium* OB3b. Part II. metabolomics and ¹³C-labeling study. *Front Microbiol.* 2013;4(APR):1-13. doi:10.3389/fmicb.2013.00070
 102. De La Torre A, Metivier A, Chu F, et al. Genome-scale metabolic reconstructions and theoretical investigation of methane conversion in *Methylobacterium buryatense* strain 5G(B1). *Microb Cell Fact.* 2015;14:188. doi:10.1186/s12934-015-0377-3
 103. Lieven C, Petersen LAH, Jørgensen SB, Gernaey K V., Herrgard MJ, Sonnenschein N. A Genome-Scale Metabolic Model for *Methylococcus capsulatus* (Bath) Suggests Reduced Efficiency Electron Transfer to the Particulate Methane Monooxygenase. *Front Microbiol.* 2018;9:2947. doi:10.3389/fmicb.2018.02947
 104. Akberdin IR, Thompson M, Hamilton R, et al. Methane utilization in *Methylobacterium alcaliphilum* 20ZR: A systems approach. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-13. doi:10.1038/s41598-018-20574-z
 105. Chan SHJ, Cai J, Wang L, Simons-Senftle MN, Maranas CD. Standardizing biomass reactions and ensuring complete mass balance in genome-scale metabolic models.

- Wren J, ed. *Bioinformatics*. 2017;33(22):3603-3609. doi:10.1093/bioinformatics/btx453
106. Thiele I, Palsson B. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc*. 2010;5(1):93-121. doi:10.1038/nprot.2009.203
 107. Fritzsche CJ, Hartleb D, Szappanos B, Papp B, Lercher MJ. Erroneous energy-generating cycles in published genome scale metabolic networks: Identification and removal. Maranas CD, ed. *PLOS Comput Biol*. 2017;13(4):e1005494. doi:10.1371/journal.pcbi.1005494
 108. Reed JL, Patel TR, Chen KH, et al. Systems approach to refining genome annotation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. doi:10.1073/pnas.0603364103
 109. Nott DJ, Kohn R. Adaptive sampling for Bayesian variable selection. *Biometrika*. 2005;92(4):747-763. doi:10.1093/biomet/92.4.747
 110. Schäfer C, Chopin N. Sequential Monte Carlo on large binary sampling spaces. *Stat Comput*. 2013;23(2):163-184. doi:10.1007/s11222-011-9299-z
 111. Bordel S, Rojas A, Muñoz R. Reconstruction of a Genome Scale Metabolic Model of the polyhydroxybutyrate producing methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Microb Cell Fact*. 2019;18(1):1-11. doi:10.1186/s12934-019-1154-5
 112. Thommes M, Wang T, Zhao Q, Paschalidis IC, Segrè D. Designing Metabolic Division of Labor in Microbial Communities. Dutton RJ, ed. *mSystems*. 2019;4(2):1-21. doi:10.1128/mSystems.00263-18
 113. Wilkinson TG, Topiwala HH, Hamer G. Interactions in a mixed bacterial population growing on methane in continuous culture. *Biotechnol Bioeng*. 1974;16(1):41-59. doi:10.1002/bit.260160105
 114. Stock M, Hoefman S, Kerckhof FM, et al. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs. *Res Microbiol*. 2013;164(10):1045-1054. doi:10.1016/j.resmic.2013.08.006

Anexo 1. Métodos suplementarios

Para encontrar los ciclos estequiométricamente balanceados dentro del modelo utilizamos un procedimiento en dos pasos. Primero encontramos el conjunto de metabolitos que pueden producirse cuando no hay entrada de carbono al sistema I^{leak} (Problema S1) y después encontramos el conjunto de reacciones mínimas necesarias para esta producción (Problema S2).

Problema S1.

$$\begin{aligned} & \max_v \|y\|_0 \\ & s. a. Sv - y = 0 \\ & y \geq 0 \end{aligned}$$

Problema S2.

$$\begin{aligned} & \min_y \|v\|_2 \\ & s. a. Sv - y = 0 \\ & y \geq 1 \forall i \in I^{leak} \\ & y \geq 0 \forall i \notin I^{leak} \end{aligned}$$

Algoritmo S1 Muestreo de Gibbs Adaptativo.

El algoritmo utilizado es un híbrido de un muestreo independiente y uno adaptativo. El muestreo independiente se utiliza durante el periodo de inicialización (warmup) que consiste en un número de iteraciones definidas. En cada iteración, el algoritmo muestrea de una distribución uniforme el número total (K) y las reacciones (I) que se evaluarán en la iteración. Posteriormente, para cada reacción muestrea un nuevo índice indicando si la reacción está activa o no, de una distribución de Bernoulli con probabilidad $m(i)$ si la iteración está en el periodo de inicialización, o probabilidad $m(i)'$ en caso contrario. Finalmente simula el modelo con los nuevos índices de actividad y evalúa si estos índices deben considerarse una muestra válida o no.

El pseudo código se presenta a continuación:

Define N

Define γ^k_0

Define warmup

$\gamma^{k^{old}} \leftarrow \gamma^k_0$

For j in N:

$K \sim u(\cdot)$

$I \sim \psi(\cdot | K)$

For i in I:

If j < warmup:

$x_{ex(i)}^{k^{new}} \sim \text{Bernoulli}(m(i))$

Else:

$x_{ex(i)}^{k^{new}} \sim \text{Bernoulli}(m(i)')$

Do $\hat{y} \leftarrow \text{simulate_model}$

Do $p(\bar{y} | x_{ex(i)}^{k^{new}})$

For i in I:

$u \sim \text{uniform}([0,1])$

Do r

If r > u:

Then $x_{ex(i)}^{k^{old}} \leftarrow x_{ex(i)}^{k^{new}}$

Donde:

$$m(i) = 1 - x_{ex(i)}^{k^{old}}$$
$$m(i)' = \left[\left(\varphi_i - \frac{W * x_{ex(i)}^{k^{old}}}{w_{i,i}} \right) \vee \delta \right] \wedge (1 - \delta)$$
$$r = \frac{p(\bar{y} | x_{ex(i)}^{k^{new}})}{p(\bar{y} | x_{ex(i)}^{k^{old}})}$$

φ_i – Promedio de valores de $x_{ex(i)}^k$

W – Matriz de covarianza

δ – Valor de diseño entre 0 y 0.5

Anexo 2 Resultados suplementarios

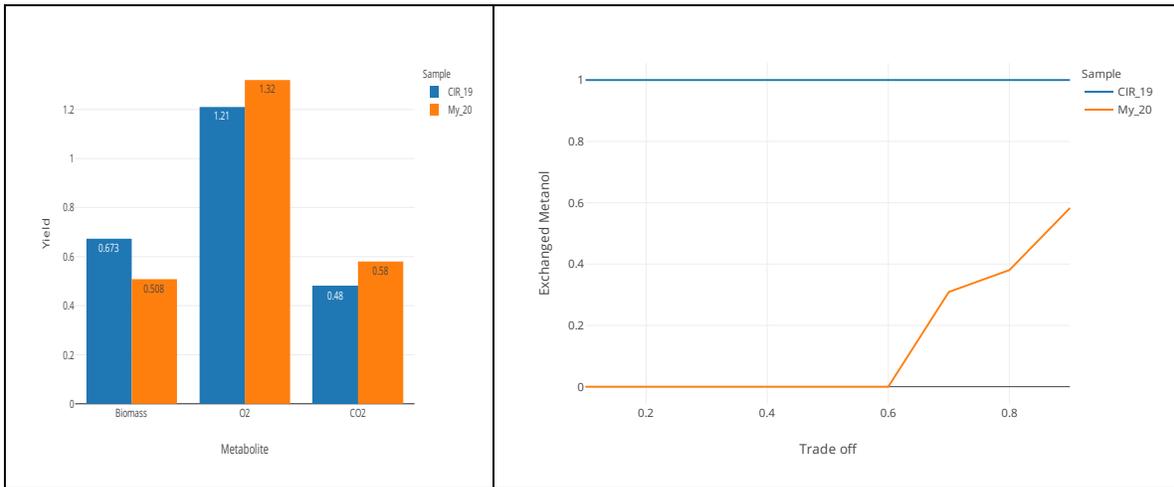


Figura S1. Resultados de la simulación cuando las 27 reacciones de consumo de *Methylocystis* están activas.

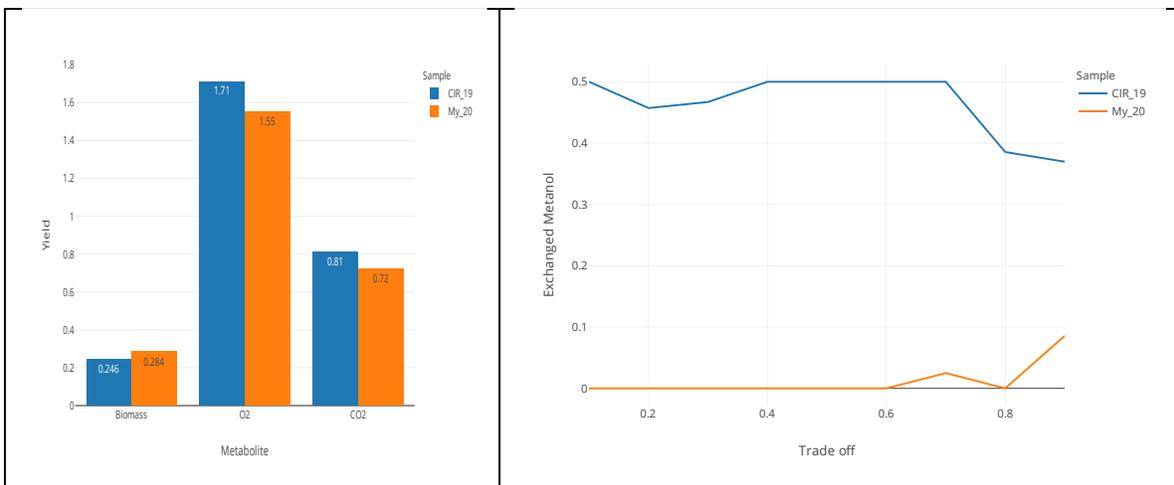


Figura S2. Resultados de la simulación cuando las 27 reacciones de consumo de *Methylocystis* están inactiva.

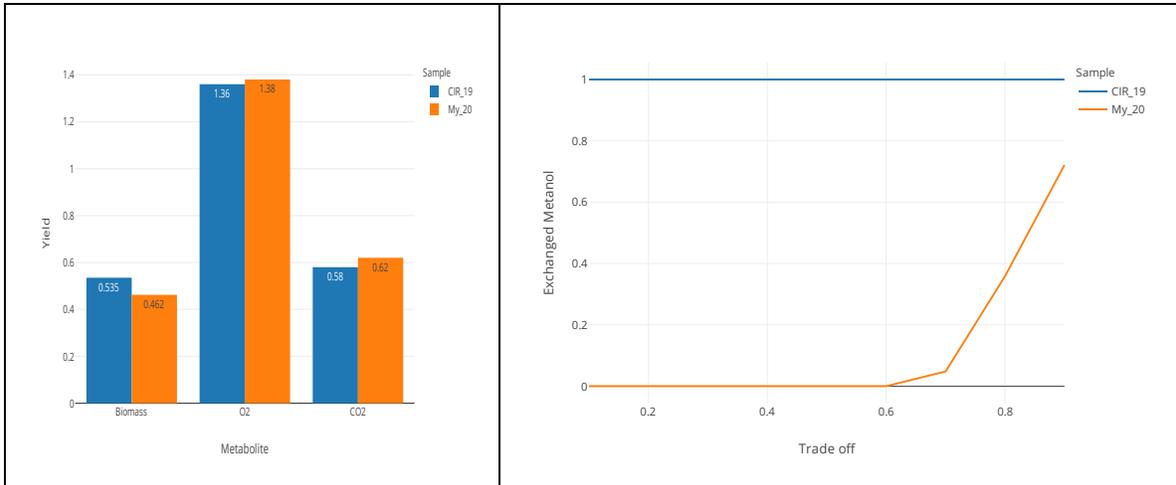


Figura S2. Resultados de la simulación cuando las reacciones activas se definen con la probabilidad estimada de las cadenas de Markov.

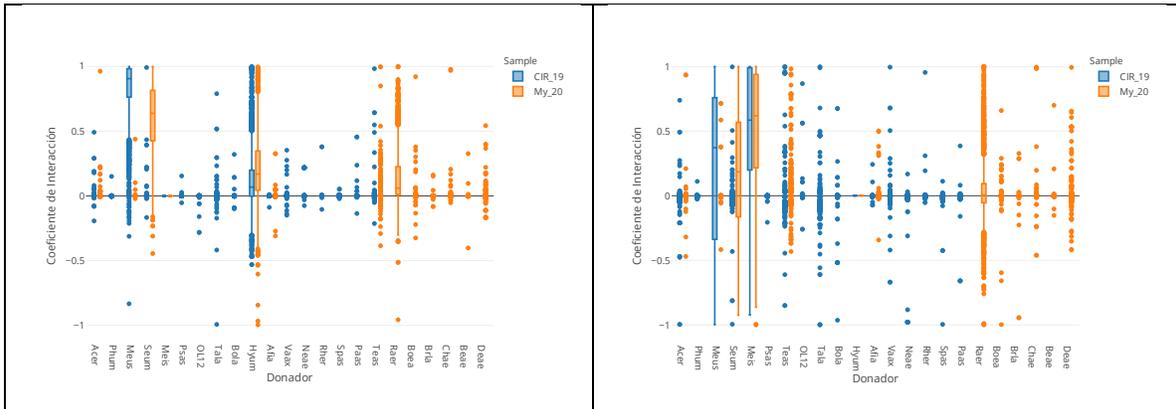


Fig S3. Coeficientes de interacción que cuantifican el efecto del taxón k sobre *Methylocystis* (Fig a) e *Hyphomicrobium* (Fig b). Resultados de 2396 simulaciones.

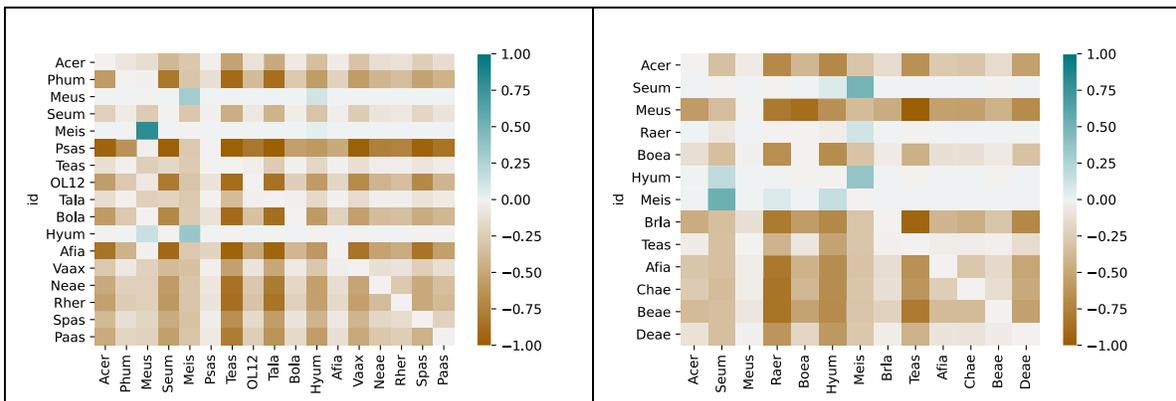


Fig S4. La media de los coeficientes de interacción en 2396 simulaciones.

Las figuras S5 a S8 muestran los flujos de producción o consumo de cada taxón en escala logarítmica. Las figuras S5 y S6 contienen los resultados del consorcio CIR_19 en las simulaciones de la condición A y B. Las figuras S7 y S8 los resultados para My_20. Siguiendo la definición de reacciones de transporte en los modelos, los valores positivos representan consumo y los negativos producción.

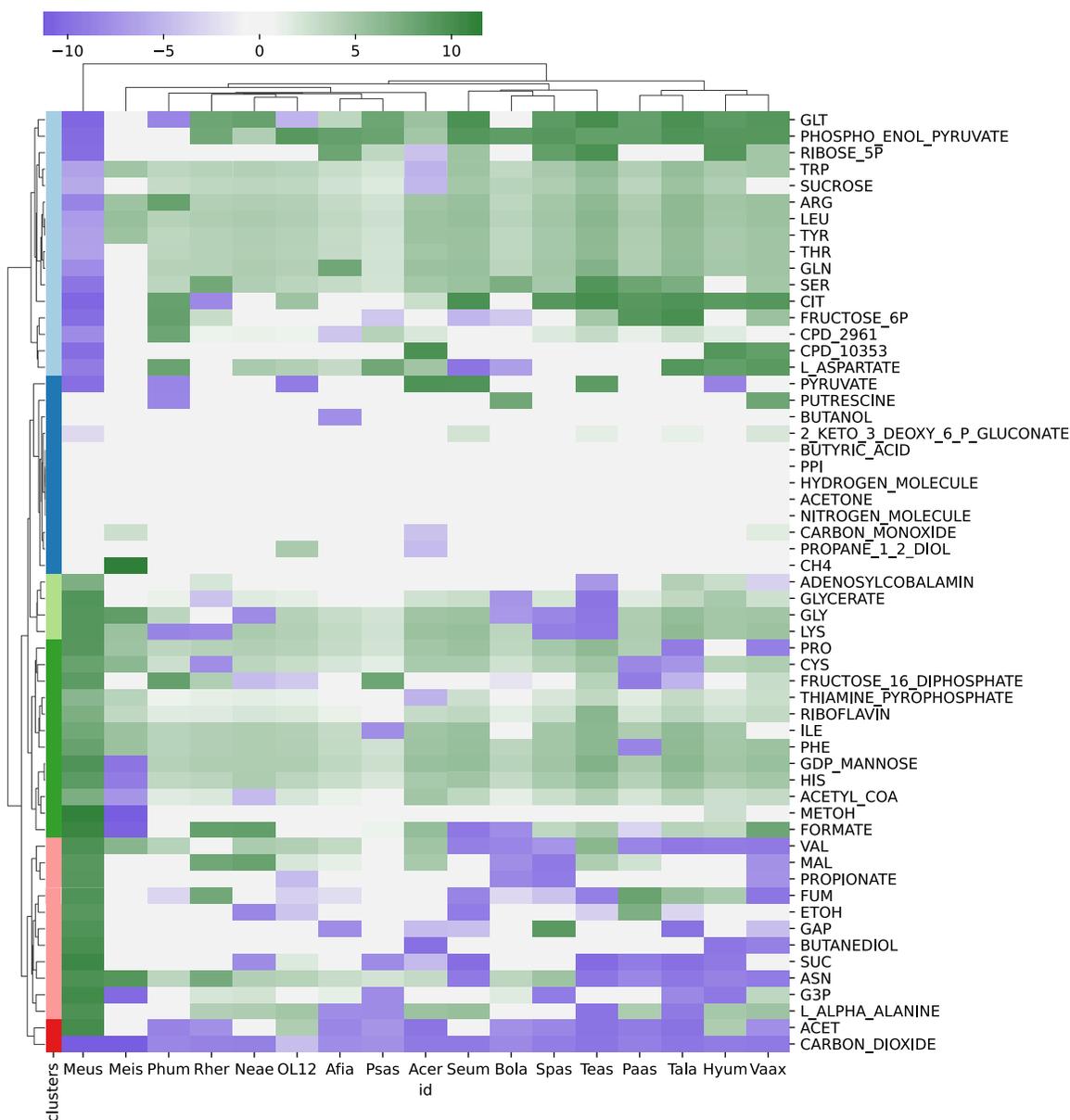


Figura S5. Espacio extracelular en CIR_19 en la Condición A.



Figura S6 Espacio extracelular en CIR_19 en la Condición B.



Figura S7 Espacio extracelular en My_20 en la Condición A.

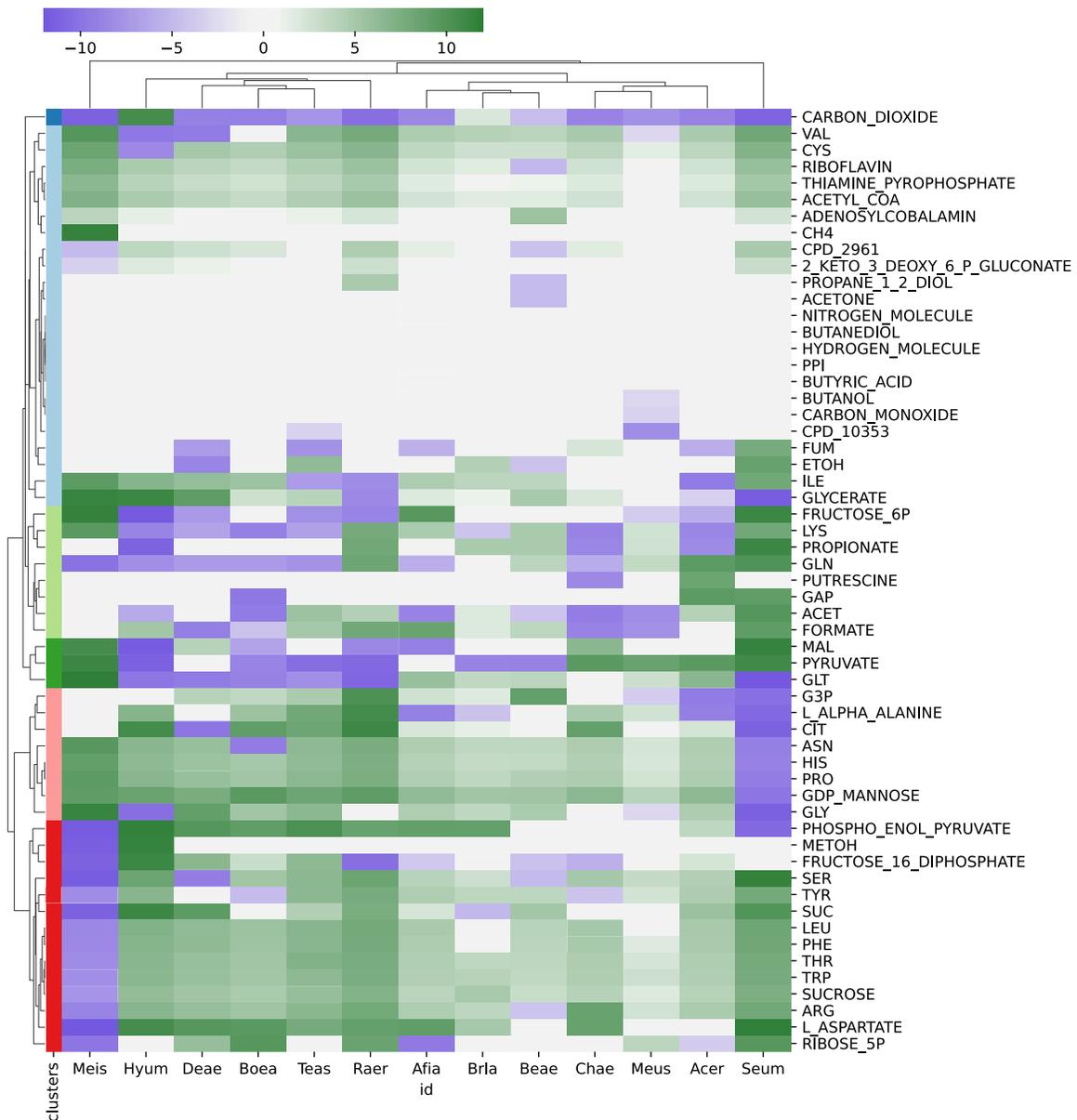


Figura S8 Espacio extracelular en My_20 en la Condición B.

Anexo 3 Componentes de la biomasa

Tipo	Nombre	mmol/gcel	ID de Metacyc
Amino_Acids	Alanine	0.4754229375	L-ALPHA-ALANINE
Amino_Acids	Arginine	0.2251985	ARG
Amino_Acids	Asparagine	0.2367665625	ASN
Amino_Acids	Aspartate	0.2792665625	L-ASPARTATE
Amino_Acids	Cysteine	0.045895	CYS
Amino_Acids	Glutamate	0.4162925	GLT
Amino_Acids	Glutamine	0.1782925	GLN
Amino_Acids	Histidine	0.091184625	HIS
Amino_Acids	Glycine	0.469657125	GLY
Amino_Acids	Isoleucine	0.2478804375	ILE
Amino_Acids	Leucine	0.3643808125	LEU
Amino_Acids	Lysine	0.2630426875	LYS
Amino_Acids	Methionine	0.124172375	MET
Amino_Acids	Phenylalanine	0.1837309375	PHE
Amino_Acids	Proline	0.2062665625	PRO
Amino_Acids	Serine	0.2214485	SER
Amino_Acids	Threonine	0.2534225625	THR
Amino_Acids	Tryptophan	0.0734605625	TRP
Amino_Acids	Tyrosine	0.13022425	TYR
Amino_Acids	Valine	0.350542875	VAL
FAME	C14 (myristate)	0.009	CPD-7836
FAME	C15 (pentadecanoic acid)	0.002	CPD-8462
FAME	C16 (palmitate)	0.2173333333	PALMITATE
FAME	C18 (stearate)	0.0015	STEARIC_ACID

Phospholipids	Phosphatidylserine (1%)*	0.008	L-1-PHOSPHATIDYL-SERINE
Phospholipids	Phosphatidylethanolamine (50%)*	0.107006	L-1-PHOSPHATIDYL-ETHANOLAMINE
Phospholipids	Dipalmitoyl phosphatidate (4)*	0.0035	CPD0-1422
Phospholipids	Dipalmitoyl phosphatidate (4)*	0.0035	CPD-9245
Phospholipids	Cardiolipin (11)*	0.011	CARDIOLIPIN
Phospholipids	Phosphatidylglycerol (34)*	0.0346666667	L-1-PHOSPHATIDYL-GLYCEROL
Sterols	tetrahymanol	0.025	CPD-14517
Sterols	aminotriol (III) 65% of BHP	0.008	CPD-14521
Sterols	aminotetrol and 3-Me-aminotetrol <3% BHP	0.003	CPD-14520
Sterols	squalene	0.0265	SQUALENE
Sterols	lanosterol	0.0225	LANOSTEROL
Sterols	Diplopterol	0.013	CPD-14518
Intracellular_Me tabolites	Ribulose-5-phosphate/Ribose-5-phosphate	0.001	RIBOSE-5P
Intracellular_Me tabolites	Fructose-16-bisphosphate	0.001	FRUCTOSE-16-DIPHOSPHATE
Intracellular_Me tabolites	Fructose-6-phosphate	0.003	FRUCTOSE-6P
Intracellular_Me tabolites	Glucose-6-phosphate	0.002	GLC-6-P GLC-1-P
Intracellular_Me tabolites	Glyceraldehyde-3-phosphate/Dihydroxyacetone	0.003	GAP
Intracellular_Me tabolites	6-Phosphogluconic acid	0.00015	CPD-2961
Intracellular_Me tabolites	2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate	3.00E-06	2-KETO-3-DEOXY-6-P-GLUCONATE
Intracellular_Me tabolites	Phosphoglycerate	0.006	G3P

Intracellular_Me tabolites	Phosphoenolpyruvate	0.005	PHOSPHO-ENOL- PYRUVATE
Intracellular_Me tabolites	Pyruvate	0.015	PYRUVATE
Intracellular_Me tabolites	Acetyl-CoA	0.0001	ACETYL-COA
Intracellular_Me tabolites	Succinate	0.002	SUC
Intracellular_Me tabolites	Malate	0.004	MAL
Intracellular_Me tabolites	Fumarate	0.001	FUM
Intracellular_Me tabolites	Citrate	0.001	CIT
Intracellular_Me tabolites	Glycerate	0.001	GLYCERATE
Intracellular_Me tabolites	polyP (PPi)	0.029	PPI
Cofactors	Thiamin B1	0.0001615	THIAMINE- PYROPHOSPHATE
Cofactors	Riboflavin B2	0.0001615	RIBOFLAVIN
Cofactors	adenosylcobalamine	6.30E-08	ADENOSYLCOBALAMIN
Cofactors	Ubiquinol-8	0.00022	Ubiquinols
Cofactors	coenzyme-A	0.0003386667	CO-A
Cofactors	FMN	0.00022	FMN
Cofactors	10-Formyltetrahydrofolate	0.000221	10-FORMYL-THF
Cofactors	FAD	0.000221	FAD
Cofactors	Glutathione	0.00022	GLUTATHIONE
Cofactors	2-Octaprenyl-6-hydroxyphenol	0.000223	2-OCTAPRENYLPHENOL
Cofactors	510-Methylenetetrahydrofolate	0.000223	METHYLENE-THF

Cofactors	Pyridoxal 5-phosphate	0.000223	PYRIDOXAL_PHOSPHATE
Cofactors	S-Adenosyl-L-methionine	0.000221	S-ADENOSYLMETHIONINE
Cofactors	Siroheme	0.000223	SIROHEME
Cofactors	Tetrahydrofolate	0.000223	THF
Cofactors	Menaquinol 8	0.0001	Menaquinols
Cofactors	Protoheme	0.00022	PROTOHEME
Peptidoglycan	Undecaprenyl-diphospho-N-acetylmuramoyl-(N-acetylglucosamine)-L-alanyl-D-glutamyl-meso-26-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine	0.1	C5
Peptidoglycan	Undecaprenyl diphosphate	5.50E-05	CPD-9649
Peptidoglycan	Two disaccharide linked murein units pentapeptide crosslinked tetrapeptide (A2pm->D-ala) (middle of chain)	0.013892	CPD0-2278
Peptidoglycan	Peptidoglycan 1	0.0076753036	C3
Peptidoglycan	Peptidoglycan 2	0.0076753036	CPD-17985
Peptidoglycan	Peptidoglycan 3	0.0076753036	CPD0-2579
Peptidoglycan	Peptidoglycan 4	0.0076753036	CPD-17986
Peptidoglycan	Peptidoglycan 5	0.0076753036	CPD-18809
Peptidoglycan	Peptidoglycan 6	0.0076753036	CPD-17987
Peptidoglycan	Peptidoglycan 7	0.0076753036	CPD-17988
Peptidoglycan	Glycerol teichoic acid n45 unlinked D ala substituted C286H612N47O328P46	0.0016735	Gro-P-Teichoic-peptidoglycan
Peptidoglycan	Glycerol teichoic acid n45 unlinked glucose substituted C421H749N2O464P46	0.0014095	Minor-Teichoic-Bacillus-peptidoglycan
Cell_wall	Lipoteichoic acid n24 linked D alanine substituted C19036H39872N2400O18300P2400	5.00E-05	Type-I-LTA
Cell_wall	Lipoteichoic acid n24 linked glucose substituted C26236H47072O25500P2400	5.00E-05	Type-IV-LTA
Cell_wall	KDO(2)-lipid IV(A)	0.004864	KDO2-LIPID-IVA
Cell_wall	KDO(2)-lipid IV(A)	0.004864	CPD-12903

Cell_wall	KDO(2)-lipid IV(A)	0.004864	L-ARA4N-MODIFIED-KDO2-LIPID-A
Cell_wall	KDO(2)-lipid IV(A)	0.004864	KDO2-LAUROYL-LIPID-IVA
RNA	ATP	0.0413333333	ATP
RNA	UTP	0.06752575	UTP
RNA	CTP	0.0678765	CTP
RNA	GTP	0.08752425	GTP
DNA	dATP	0.00984175	DATP
DNA	dTTP	0.00984175	TTP
DNA	dCTP	0.0112544375	DCTP
DNA	dGTP	0.0117544375	DGTP
Ectoine	Ectoine	0.106	ECTOINE
Carbohydrates	Mannose	0.002	GDP-MANNOSE
Carbohydrates	Glycogen	0.448	Glycogens
Carbohydrates	Sucrose	0.026	SUCROSE
Carbohydrates	Ribose	0.036	RIBOSE
Carbohydrates	Arabinose	0.022	D-arabinopyranose
Carbohydrates	Galactose	0.005	D-Galactopyranose

Anexo 4. Información adicional

Tabla S1. Cadena Transportadora de Electrones.

Complex I	NADH-DEHYDROG-A-RXN	NADH _cy + 5 PROTON _cy + Ubiquinones _it --> NAD _cy + 4 PROTON _pe + Ubiquinols _it
Complex II	SUCCINATE-DEHYDROGENASE-UBIQUINONE-RXN	SUC _cy + Ubiquinones _it --> FUM _cy + Ubiquinols _it
Complex III	1.10.2.2-RXN	2 Cytochromes-C-Oxidized _pe + Ubiquinols _it --> 2 Cytochromes-C-Reduced _pe + 4 PROTON _pe + Ubiquinones _it
Complex IV	CYTOCHROME-C-OXIDASE-RXN	4 Cytochromes-C-Reduced _pe + OXYGEN-MOLECULE _cy + 8 PROTON _cy --> 4 Cytochromes-C-Oxidized _pe + 4 PROTON _pe + 2 WATER _cy
pMMO	RXN-12219	CH4 _pe + OXYGEN-MOLECULE _pe + Ubiquinols _it --> METOH _pe + Ubiquinones _it + WATER _pe
ATP_syn		

Tabla S2. Modificaciones Relevantes al modelo.

Reacción	Restricciones
PYRUFLAVREDUCT-RXN	Lb = -100, ub = 0
RXN_2961	Lb = 0, ub = 0
PROPIONMET-PWY	Added Full pathway
PROPIONATE_COA_LIGASE_RXN	Lb = 0, ub = 0
BUTYRYL_COA_DEHYDROGENASE_RXN	Lb = 0, ub = 0
GLY3KIN-RXN	Lb = -100, ub = 100
METHYLENETHFDEHYDROG_NADP_RXN	Lb = 0, ub = 0
2.1.3.1-RXN	Lb = 0, ub = 0
RXN-2802	Lb = 0, ub = 0
R10-RXN	Lb = 0, ub = 0
ISOCIT-CLEAV-RXN	Lb = 0, ub = 0
RXN-11489	Lb = 0, ub = 0
CITSYN-RXN	Lb = 0, ub = 100
RXN-20917	Lb = 0, ub = 0
EX_METOH_1	Lb = -100, ub = 0
GLUTAMATE-DEHYDROGENASE-NADP+-RXN	Lb = 0, ub = 100
RXN-12168	Lb = 0, ub = 0
R125-RXN	Lb = 0, ub = 0
GLUTACONYL-COA-DECARBOXYLASE-RXN	Lb = 0, ub = 0
PUTTRANSAM-RXN	Lb = 0, ub = 0
RXN-15125	Lb = 0, ub = 0
RXNI-3	Lb = 0, ub = 0
R601-RXN	Lb = 0, ub = 0
RXN-7774	Lb = 0, ub = 0
RXNI-2	Lb = 0, ub = 0
GCVMULTI-RXN	Lb = -100, ub = 100
RXN-7566	Lb = 0, ub = 0

ASPARTASE-RXN	Lb = -100, ub = 0
GLUTAMATE-DEHYDROGENASE-RXN	Lb = -100, ub = 100
KETOGLUTREDUCT-RXN	Lb = 0, ub = 0
RXN-11662	Lb = 0, ub = 0
2-METHYLCITRATE-SYNTHASE-RXN	Lb = 0, ub = 0
RXN0-268	Lb = 0, ub = 0
PEPSYNTH-RXN	Lb = 0, ub = 0
PROPKN-RXN	Lb = 0, ub = 0
ACETATEKIN-RXN	Lb = 0, ub = 0
ACETATE—COA-LIGASE-ADP-FORMING-RXN	Lb = 0, ub = 0
ASPAMINOTRANS_RXN	Lb = 0, ub = 0
GLYCINE_AMINOTRANSFERASE_RXN	Lb = 0, ub = 0

Tabla S3. Abundancia relativa de los taxones en cada Muestra.

ID	MUESTRA	GENERO	ABUNDANCIA RELATIVA	CUENTAS
ACER	CIR_19	Acinetobacter	0.007697	133
PHUM	CIR_19	Phenylobacterium	0.001447	25
MEUS	CIR_19	Methylophilus	0.891397	15402
SEUM	CIR_19	Sediminibacterium	0.011922	206
MEIS	CIR_19	Methylocystis	0.010157	175.5
PSAS	CIR_19	Pseudomonas	0.000347	6
TEAS	CIR_19	Terrimonas	0.025407	439
OL12	CIR_19	OLB12	0.002026	35
TALA	CIR_19	Taibaiella	0.019967	345
BOLA	CIR_19	Bordetella	0.001158	20
HYUM	CIR_19	Hyphomicrobium	0.005151	89
AFIA	CIR_19	Afipia	0.000752	13
VAAX	CIR_19	Variovorax	0.008797	152
NEAE	CIR_19	Neisseriaceae	0.002662	46
RHER	CIR_19	Rhodanobacter	0.002141	37
SPAS	CIR_19	Sphingomonas	0.005961	103
PAAS	CIR_19	Parafilimonas	0.00301	52
ACER	My_20	Acinetobacter	0.00329	60.25
SEUM	My_20	Sediminibacterium	0.139629	2557
MEUS	My_20	Methylophilus	0.000273	5
RAER	My_20	Ramlibacter	0.095398	1747
BOEA	My_20	Bosea	0.007208	132
HYUM	My_20	Hyphomicrobium	0.036914	676
MEIS	My_20	Methylocystis	0.665493	12187
BRLA	My_20	Brucella	0.001038	19
TEAS	My_20	Terrimonas	0.029215	535
AFIA	My_20	Afipia	0.002785	51
CHAE	My_20	Chitinophagaceae	0.003604	66
BEAE	My_20	Beijerinckiaceae	0.001119	20.5
DEAE	My_20	Devosiaceae	0.014034	257