

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Dinámica en la producción y consumo de vitamina B₁₂ entre
grupos bacterianos protótrofos y auxótrofos**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Andrés Cano Suzan

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Andrés Cano Suzan

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Laura Gómez Consarnau
Codirectora de tesis

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Codirectora de tesis

Dr. Miguel Cuevas Cruz

Dr. Aldo Moreno Ulloa

Dra. Mary Carmen Ruíz de la Torre



Dr. Rafael Andrés Cabral Tena
Coordinador del Posgrado en Ecología marina

Dr. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Andrés Cano Suzan** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina

Dinámica en la producción y consumo de vitamina B₁₂ entre grupos bacterianos protótrofos y auxótrofos

Resumen aprobado por:

Dra. Laura Gómez Consarnau

Codirectora de tesis

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes

Codirectora de tesis

La vitamina B₁₂ o cobalamina comprende un conjunto de moléculas orgánicas, esenciales para el crecimiento de diversos organismos eucariotas y procariotas. Esto se debe a que actúa como cofactor de diferentes enzimas involucradas en el metabolismo energético y no energético. En el medio marino la B₁₂ es sintetizada por ciertos organismos procariotas. Sin embargo, poco se sabe sobre qué organismos son capaces de incorporarla a través de la vía de reciclaje o salvamiento. Además, se desconoce cómo la expresión de genes relacionados con la síntesis, dependencia y salvamiento puede ser afectada por la variabilidad temporal en el ecosistema. El presente trabajo busca describir la distribución de la capacidad de síntesis, dependencia y salvamiento de B₁₂ en genomas de los principales grupos taxonómicos del bacterioplancton marino. Asimismo, busca determinar patrones temporales de la expresión de estos genes en una comunidad microbiana marina. Se utilizó la base de datos IMG (Integrated Microbial Genomes) de la cual se extrajeron 1626 genomas de organismos procariotas de origen marino. En estos genomas se identificaron los genes asociados a la ruta de síntesis y enzimas dependientes de B₁₂. Por otro lado, se evaluó la expresión de dichos genes mediante metatranscriptómica en muestras ambientales recolectadas en cuatro estaciones del año en Isla Sapelo, Georgia, EUA. Se determinó que los principales taxones con genomas sintetizadores de B₁₂ pertenecen a Cyanobacteria (78 %), Alphaproteobacteria (38 %) y Gammaproteobacteria (5 %). Más del 90 % de los genomas de cada grupo taxonómico presentaron al menos una enzima dependiente de B₁₂. Además, se determinó que la mayoría (907) no cuenta con la capacidad de síntesis de cobalamina, pero potencialmente pueden reciclar moléculas degradadas de B₁₂ a través de la vía de salvamiento. Por otra parte, se observó que la expresión de genes de síntesis y dependencia de B₁₂ en Isla Sapelo es llevada a cabo por distintos grupos taxonómicos a lo largo del año. En conclusión, nuestro estudio sugiere que organismos que no producen cobalamina dependen de una fuente exógena o vía de salvamiento, y que la expresión de estos genes está influenciada por la variabilidad estacional.

Palabras clave: B₁₂, genomas, procariotas marinos, expresión de genes, variabilidad temporal

Abstract of the thesis presented by **Andrés Cano Suzan** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology

Dynamics in the production and consumption of vitamin B₁₂ between prototrophic and auxotrophic bacterial groups

Abstract approved by:

Dra. Laura Gómez Consarnau

Thesis Director

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes

Thesis Director

Vitamin B₁₂ or cobalamin comprises a group of essential organic molecules crucial for the growth of various eukaryotic and prokaryotic organisms. This is attributed to its role as a cofactor of different enzymes participating in both energy and non-energy metabolism. It is established that certain marine prokaryotic organisms are responsible for the synthesis of B₁₂ in this environment. However, there is a lack of understanding about the presence of the salvage pathway and how the expression of B₁₂ synthesis, dependence and salvage genes may be affected by temporal variability in the ecosystem. The present thesis seeks to describe the distribution of the synthesis, dependence and salvage of B₁₂ genes in genomes of the main taxonomical groups that are part of the marine bacterioplankton. In addition, this work aims to determine patterns of the expression of these genes in a marine microbial community associated with the temporal variability. The IMG (Integrated Microbial Genomes) database was used, to extract 1626 genomes of prokaryotic organisms from the marine ecosystem. In these genomes, genes associated with B₁₂ synthesis and dependent enzymes were searched for. On the other hand, the expression of these genes was assessed through metatranscriptomics in environmental samples collected during four seasons of the year on Sapelo Island, Georgia, USA. The main taxonomic groups with *de novo* B₁₂ synthesizing genomes were Cyanobacteria (78 %) and the Alpha- (38 %) and Gammaproteobacteria (5 %) classes. At the same time, more than 90 % of the genomes of each taxonomic group analyzed presented at least one B₁₂-dependent enzyme. Ribonucleotide diphosphate reductase and methionine synthase were B₁₂-dependent enzymes most commonly found. Furthermore, it was determined that some genomes (907) do not synthesize cobalamin, but instead have the genes associated with the salvage pathway. On the other hand, the expression of B₁₂ synthesis and dependence genes on Sapelo Island is carried out by different taxonomic groups throughout the year. In conclusion, our study suggests that some organisms that do not produce cobalamin but depend on an exogenous source or salvage pathway of B₁₂, and the gene expression is influenced by seasonal variability.

Keywords: B₁₂, genomes, marine prokaryotes, gene expression, temporal variability

Dedicatoria

A mis padres Víctor e Ivonne y a mi hermano Emmanuel, por apoyarme en todo.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por haberme permitido realizar un posgrado en esta institución y al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico otorgado para realizar este posgrado (CVU 1136320).

A la Dra. Laura Gómez Consarnau, por haberme permitido formar parte de su laboratorio, por toda su enseñanza sobre los microbios marinos y por la paciencia que tuvo para que tratara de entender un poco sobre el mundo de la genómica microbiana. Totalmente agradecido por todo su apoyo y por confiar en mí. A mi comité de tesis, la Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes, el Dr. Miguel Cuevas Cruz, la Dra. Mary Carmen Ruíz de la Torre y el Dr. Aldo Moreno Ulloa, por todo su apoyo durante el desarrollo de este trabajo, por sus comentarios, sugerencias y ayuda para mejorar.

Al laboratorio de Rodopsinas del CICESE, les agradezco por todo el apoyo que me dieron y por los aprendizajes en cada una de nuestras reuniones.

A mi familia, a mis padres, a mi hermano, a mis tíos y primos que han estado conmigo desde el inicio, porque son la fuerza para seguir adelante.

A mis viejos amigos Carlos, Renata y Eli. A mis amigos de Ensenada, Rafa, Fer, Grecia, Patri, Julia, Rey, Rodri, Alex, Emilio, Sarah, Andrés y Juan. Por todas las travesías, aventuras y momentos que han hecho más bonito este viaje.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Biosíntesis de B ₁₂	2
1.1.2 Vía de salvamiento o remodelación de B ₁₂	6
1.1.3 Requerimientos de B ₁₂ en microorganismos marinos.....	7
1.1.4 Expresión de genes de B ₁₂ en el ecosistema marino.....	9
1.2 Justificación.....	9
1.3 Objetivos.....	10
1.3.1 Objetivo general.....	10
1.3.2 Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2. Metodología.....	12
2.1 Búsqueda de genomas de procariotas aislados de ambientes marinos disponibles en la base de datos IMG.....	12
2.1.1 Identificación de genes involucrados en la ruta de síntesis de vitamina B ₁₂ en los genomas de procariotas aislados de ambientes marinos.....	12
2.1.2 Identificación de enzimas que requieren de vitamina B ₁₂ como cofactor en los genomas de procariotas aislados de ambientes marinos.....	13
2.1.3 Análisis filogenético de los procariotas marinos.....	13

2.2	Análisis de la expresión de genes de síntesis y dependencia de vitamina B ₁₂ en muestras ambientales	15
2.2.1	Reanálisis de datos metatranscriptómicos	15
2.3	Análisis estadísticos	17
Capítulo 3. Resultados		18
3.1	Genomas de procariontes aislados de ambientes marinos disponibles en la base de datos IMG.....	18
3.1.1	Patrones de distribución de la capacidad de síntesis de vitamina B ₁₂ en los genomas de procariontes aislados de ambientes marinos.....	18
3.1.2	Patrones de distribución de la capacidad de síntesis y dependencia de vitamina B ₁₂ en los genomas bacterianos aislados de ambientes marinos pertenecientes a los phyla más representativos.....	19
3.1.2.1	Phylum Bacteroidetes	19
3.1.2.1.1	Análisis filogenético del phylum Bacteroidetes	21
3.1.2.1.2	Resumen de características de los genomas del phylum Bacteroidetes	22
3.1.2.2	Phylum Cyanobacteria	22
3.1.2.2.1	Análisis filogenético del phylum Cyanobacteria	23
3.1.2.2.2	Resumen de características de los genomas del phylum Cyanobacteria	25
3.1.2.3	Phylum Proteobacteria	26
3.1.2.3.1	Análisis filogenético del phylum Proteobacteria	26
3.1.2.3.2	Clase Alphaproteobacteria.....	28
3.1.2.3.3	Clase Gammaproteobacteria	29
3.1.2.3.4	Resumen de características de los genomas del phylum Proteobacteria	32
3.1.3	Patrones de distribución de la capacidad de síntesis y dependencia de vitamina B ₁₂ en los genomas pertenecientes al dominio Archaea aislados de ambientes marinos.....	32
3.1.3.1	Análisis filogenético del dominio Archaea	34
3.1.3.2	Resumen de características de los genomas del dominio Archaea	35
3.2	Variabilidad de la expresión de genes de síntesis y dependencia de vitamina B ₁₂ asociado a los cambios temporales y a la estructura de la comunidad microbiana	35

Capítulo 4. Discusión.....	39
4.1 Patrones de distribución de la capacidad de síntesis y dependencia de vitamina B ₁₂ en los genomas de procariotas aislados de ambientes marinos disponibles en la base de datos IMG.....	39
4.2 Patrones de expresión de genes de síntesis y dependencia de vitamina B ₁₂ asociados a los cambios temporales y a la estructura de la comunidad microbiana.....	44
Capítulo 5. Conclusiones	51
Literatura citada	52
Anexos	57

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Estructura molecular de las cobinamidas. Las cobinamidas se caracterizan por tener un anillo de corrina que presenta un ion de cobalto. El ligando alto (R) puede ser 5' deoxiadenosil, metil o ciano, los cuales le dan a las cobinamidas versatilidad en la reactividad química. El ligando bajo es diferente entre cobinamidas, puede ser dimetilbenzimidazol, una purina o un fenol (tomado y modificado de Sokolovskaya et al., 2020).....	3
Figura 2. Ruta de síntesis de adenosilcobalamina. Se conforma por los genes encargados de codificar enzimas asociadas a la síntesis del anillo de corrina (azul), ya sea por la vía aerobia o anaerobia; genes encargados de codificar enzimas asociadas a síntesis de alfa ribazol (verde); y por último, el grupo de genes asociados a la parte final de la ruta de síntesis de B ₁₂ y a la vía de salvamiento (naranja) (tomado y modificado de Rodionov et al., 2003).	5
Figura 3. Genomas de procariontes marinos con y sin capacidad de síntesis de B ₁₂ disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color azul no sintetizan B ₁₂ y rojo sí sintetizan B ₁₂	18
Figura 4. Genomas de procariontes marinos por phylum con y sin capacidad de síntesis de B ₁₂ disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color azul no sintetizan B ₁₂ y rojo sí sintetizan B ₁₂ . Los phyla mejor representados fueron Cyanobacteria y Proteobacteria.	19
Figura 5. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B ₁₂ en genomas bacterianos marinos del phylum Bacteroidetes disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes <i>cobI</i> encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes <i>cobII</i> encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes <i>cobIII</i> finaliza la síntesis de adenosilcobalamina.....	20
Figura 6. Presencia de enzimas dependientes de B ₁₂ en genomas bacterianos marinos del phylum Bacteroidetes disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDRF: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa.	20
Figura 7. Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S rRNA de genomas bacterianos marinos pertenecientes al phylum Bacteroidetes (94 secuencias) disponibles en la base de datos SILVA. El valor de Bootstrap en los nodos indica el porcentaje de identidad basado en distancias genéticas. Línea negra indica la clase Cytophagia; línea roja indica la clase Sphingobacteriia; línea verde indica la clase Bacteroidia y línea naranja indica la clase Flavobacteriia.....	21
Figura 8. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B ₁₂ en genomas bacterianos marinos del phylum Cyanobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes <i>cobI</i> encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes <i>cobII</i> encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes <i>cobIII</i> finaliza la síntesis de adenosilcobalamina.....	23

- Figura 9. Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en genomas bacterianos marinos del phylum Cyanobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDRF: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa. 23
- Figura 10. Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S rRNA de genomas bacterianos marinos pertenecientes al phylum Cyanobacteria (97 secuencias) disponibles en la base de datos SILVA. El valor de Bootstrap en los nodos indica el porcentaje de identidad basado en distancias genéticas. Círculo rojo sí sintetizan vitamina B₁₂. Línea café indica el orden Chroococcales; línea negra indica el orden Oscillatoriales; línea azul indica el orden Pseudanabaenales; línea verde indica el orden Nostocales y línea amarilla indica el orden Synechococcales..... 24
- Figura 11. Tamaño de genoma (pb) con y sin capacidad de síntesis de los genomas bacterianos marinos del phylum Cyanobacteria disponibles en la base de datos IMG. Lado izquierdo no sintetizan B₁₂ y derecho sí sintetizan B₁₂. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney) en los tamaños de genomas entre sintetizadores y no sintetizadores de B₁₂. 25
- Figura 12. Genomas bacterianos marinos con y sin capacidad de síntesis de B₁₂ por clase del phylum Proteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color azul no sintetizan B₁₂ y rojo sí sintetizan B₁₂. 26
- Figura 13. Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S rRNA de genomas bacterianos marinos pertenecientes al phylum Proteobacteria (515 secuencias) disponibles en la base de datos SILVA. El valor de Bootstrap en los nodos indica el porcentaje de identidad basado en distancias genéticas. Círculo rojo sí sintetizan vitamina B₁₂. Línea café indica la clase Alphaproteobacteria; línea gris indica la clase Epsilonproteobacteria; línea negra indica la clase Zetaproteobacteria; línea verde indica la clase Deltaproteobacteria; línea morada indica la clase Betaproteobacteria y línea azul indica la clase Gammaproteobacteria. 27
- Figura 14. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B₁₂ en genomas bacterianos marinos de la clase Alphaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes *cobI* encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes *cobII* encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes *cobIII* finaliza la síntesis de adenosilcobalamina. 28
- Figura 15. Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en genomas bacterianos marinos de la clase Alphaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDRF: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa..... 29
- Figura 16. Tamaño de genoma (pb) con y sin capacidad de síntesis de los genomas bacterianos marinos de la clase Alphaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Lado izquierdo no sintetizan B₁₂ y derecho sí sintetizan B₁₂. Las diferencias observadas fueron significativas ($P < 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney) en los tamaños de genomas entre sintetizadores y no sintetizadores de B₁₂. 29

- Figura 17. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B₁₂ en genomas bacterianos marinos de la clase Gammaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes *cobI* encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes *cobII* encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes *cobIII* finaliza la síntesis de adenosilcobalamina. 30
- Figura 18. Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en genomas bacterianos marinos de la clase Gammaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDRF: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa..... 31
- Figura 19. Tamaño de genoma (pb) con y sin capacidad de síntesis de los genomas bacterianos marinos de la clase Gammaproteobacteria, disponibles en la base de datos IMG. Lado izquierdo no sintetizan B₁₂ y derecho sí sintetizan B₁₂. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney) en los tamaños de genomas entre sintetizadores y no sintetizadores de B₁₂. 31
- Figura 20. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B₁₂ en genomas marinos del dominio Archaea disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes *cobI* encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes *cobII* encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes *cobIII* finaliza la síntesis de adenosilcobalamina..... 33
- Figura 21. Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en genomas marinos del dominio Archaea disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDRF: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa. 33
- Figura 22. Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S rRNA de genomas marinos pertenecientes al dominio Archaea (12 secuencias) disponibles en la base de datos SILVA. El valor de Bootstrap en los nodos indica el porcentaje de identidad basado en distancias genéticas. Línea roja indica el phylum Euryarchaeota; línea verde indica el phylum Thaumarchaeota y línea azul indica el phylum Crenarchaeota..... 34
- Figura 23. Expresión relativa de genes de B₁₂ (%) y concentraciones de clorofila *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$) por muestreo. Las barras de color rojo representan los transcritos asociados a síntesis de B₁₂ y las barras de color verde representan los transcritos asociados a dependencia de B₁₂; la línea amarilla indica las concentraciones de clorofila *a*. Si se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de genes entre los muestreos ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis) realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA. 36
- Figura 24. Expresión relativa de genes de síntesis de B₁₂ (%) por orden y muestreo. Las barras de colores indican los principales órdenes que forman parte del bacterioplancton en el océano y que fueron representativos en todos los muestreos. Los Rhodobacterales son los que presentan un mayor porcentaje de transcritos de síntesis de B₁₂ en la mayoría de los muestreos realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA..... 38

- Figura 25. Expresión relativa de genes de dependencia de B₁₂ (%) por orden y muestreo. Las barras de colores indican los principales órdenes que forman parte del bacterioplancton en el océano y que fueron representativos en todos los muestreos. Los Rhodobacterales son los que presentan un mayor porcentaje de transcritos de dependencia de B₁₂ en la mayoría de los muestreos realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA. 38
- Figura 26. Expresión relativa de genes de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ (%) de los diferentes grupos taxonómicos microbianos en todos los muestreos realizados en Isla Sapelo. La línea punteada indica la recta de la regresión lineal; el color negro indica toda la comunidad microbiana; el color verde indica el orden Chroococcales; el color rojo indica orden Nitrosopumilales; el color café indica el orden Rhizobiales y el color vino indica el orden Rhodobacterales. 45
- Figura 27. Expresión relativa de genes de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ (%) de los diferentes grupos taxonómicos microbianos en todos los muestreos realizados en Isla Sapelo. Cada gráfica presenta su recta de la regresión lineal con su respectiva ecuación y valor de R². a) toda la comunidad microbiana; b) orden Chroococcales; c) orden Nitrosopumilales; d) orden Rhizobiales; e) orden Rhodobacterales..... 47
- Figura 28. Panorama general ilustrativo de los órdenes más abundantes, de acuerdo con la expresión global de genes relacionados con la síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ encontrados en los diferentes muestreos realizados en Isla Sapelo. El recuadro punteado de color morado indica al orden Flavobacteriales, el cual expresó más genes de dependencia con respecto a los de síntesis de B₁₂. 50
- Figura 29. Total de transcritos de la comunidad (%) por taxón y muestreo. Las barras de colores indican los principales órdenes que forman parte del bacterioplancton en el océano y que fueron representativos en todos los muestreos realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA. Los Rhodobacterales son los que presentan un mayor porcentaje de transcritos en la mayoría de las estaciones..... 57

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Distribución de la capacidad de síntesis de vitamina B ₁₂ en genomas de los principales grupos del bacterioplancton marino (tomado y modificado de Sañudo-Wilhelmy et al., 2014). Los números entre paréntesis indican la cantidad de genomas estudiados.	2
Tabla 2. Genes involucrados en la ruta de síntesis de vitamina B ₁₂ con su respectivo número de clasificación enzimática (EC). Grupo de genes <i>cobI</i> encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes <i>cobII</i> encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes <i>cobIII</i> finaliza la síntesis de adenosilcobalamina.....	14
Tabla 3. Enzimas dependientes de vitamina B ₁₂ con su respectivo número de clasificación enzimática (EC).	14
Tabla 4. Muestreos realizados en la Isla Sapelo, Georgia, EUA (Gifford et al., 2014; Gómez-Consarnau et al., 2018).	16
Tabla 5. Total de transcritos de la comunidad, transcritos de síntesis de B ₁₂ y transcritos de dependencia de B ₁₂ en todos los muestreos realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA (Gómez-Consarnau et al., 2018). *Promedio de dos muestreos realizados.....	57
Tabla 6. Características de genomas con y sin capacidad de síntesis de B ₁₂ del phylum Cyanobacteria. Se identificaron 116 genomas con la capacidad de síntesis en la base de datos IMG. La media del tamaño de los genomas se obtuvo con el software R studio versión 4.1.....	58
Tabla 7. Características de genomas con y sin capacidad de síntesis de B ₁₂ de la clase Alphaproteobacteria. Se identificaron 138 genomas con la capacidad de síntesis en la base de datos IMG. La media del tamaño de los genomas se obtuvo con el software R studio versión 4.1.	58
Tabla 8. Características de genomas con y sin capacidad de síntesis de B ₁₂ de la clase Gammaproteobacteria. Se identificaron 40 genomas con la capacidad de síntesis en la base de datos IMG. La media del tamaño de los genomas se obtuvo con el software R studio versión 4.1.	58
Tabla 9. Porcentaje total de transcritos de síntesis y de dependencia de B ₁₂ por grupo taxonómico, reportados en todos los muestreos realizados en la Isla Sapelo, Georgia, EUA (Gómez-Consarnau et al., 2018).	59
Tabla 10. Genomas de procariotas marinos de los taxones más representativos disponibles en la base de datos IMG. Dependen de B ₁₂ : Genomas que contienen al menos una enzima que requiere de B ₁₂ ; no dependen de B ₁₂ : Genomas que no contienen ninguna enzima que requiere de B ₁₂ ; sintetizan B ₁₂ : Genomas que contienen todos los genes para la síntesis de B ₁₂ ; no sintetizan B ₁₂ : Genomas que no tienen la ruta de síntesis de B ₁₂ completa; salvamiento de B ₁₂ : Genomas que no contienen la ruta de síntesis de B ₁₂ , pero sí presentan al menos un gen involucrado en la vía de salvamiento o remodelación de B ₁₂ ; y no salvamiento de B ₁₂ : Genomas que no contienen la ruta de síntesis de B ₁₂ y no presentan ningún gen involucrado en la vía de salvamiento o remodelación de B ₁₂	60

Capítulo 1. Introducción

Los organismos vivos requieren de múltiples cofactores orgánicos para mantener su crecimiento y desarrollo. Las vitaminas pertenecen a este grupo de moléculas y son requeridas en diversas rutas metabólicas, donde actúan como cofactores en una gran cantidad de reacciones enzimáticas (Panzeca et al., 2006). Sin embargo, no todos los microorganismos pueden sintetizar todas las vitaminas por lo que requieren de una fuente exógena para adquirirlas, a estos organismos se les denominan auxótrofos. Por otro lado, a los microorganismos que sí tienen la capacidad de sintetizar vitaminas se les conoce como organismos protótrofos (Sañudo-Wilhelmy et al., 2006, 2014).

Los microorganismos marinos son auxótrofos para al menos una vitamina, lo cual indica que existe un intercambio de vitaminas entre diferentes miembros del fitoplancton y bacterioplancton (Giovannoni, 2012; Sañudo-Wilhelmy et al., 2012). Del fitoplancton eucariota que ha sido secuenciado, se ha identificado que el 100 % puede sintetizar la vitamina B₇, el 50 % puede sintetizar la B₁, pero ninguno tiene la capacidad de sintetizar la B₁₂. En contraste, las bacterias son los microorganismos con mayor incidencia de rutas para la síntesis de vitaminas, ya que un 78 % de bacterias puede sintetizar la B₇, un 76 % la B₁ y un 37 % puede sintetizar la B₁₂ (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014).

La cobalamina o vitamina B₁₂ (B₁₂) es una molécula que contiene cobalto y es sintetizada únicamente por ciertos procariotas que incluyen a los taxones Cyanobacteria y Proteobacteria (Se han implementado diferentes técnicas que permiten comprender las interacciones y el intercambio de moléculas orgánicas entre las comunidades microbianas en el ecosistema. La metagenómica proporciona un inventario de genes de la comunidad pero no se sabe si esos genes están siendo activamente utilizados (Gifford et al., 2011; Ottesen et al., 2011). En contraste, la metatranscriptómica es una herramienta que identifica patrones en la expresión de genes en comunidades microbianas (Poretsky et al., 2009; Gómez-Consarnau et al., 2018), permitiendo conocer qué genes están siendo transcritos bajo un contexto ecológico (Gifford et al., 2011; Ottesen et al., 2011). Por otro lado, la metaproteómica se dedica al análisis de las proteínas expresadas en una comunidad microbiana (Heyer et al., 2017).

Tabla 1) (Bonnet et al., 2010; Wienhausen et al., 2022). Se requieren más de 30 genes para la síntesis completa (*de novo*) de esta vitamina, lo que representa cerca del 1 % del genoma bacteriano. Es por ello que menos de la mitad de los procariotas marinos invierten en los costos asociados con el mantenimiento

de la ruta de síntesis de esta vitamina en sus genomas (Warren et al., 2002; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Sultana et al., 2023).

Se han implementado diferentes técnicas que permiten comprender las interacciones y el intercambio de moléculas orgánicas entre las comunidades microbianas en el ecosistema. La metagenómica proporciona un inventario de genes de la comunidad pero no se sabe si esos genes están siendo activamente utilizados (Gifford et al., 2011; Ottesen et al., 2011). En contraste, la metatranscriptómica es una herramienta que identifica patrones en la expresión de genes en comunidades microbianas (Poretsky et al., 2009; Gómez-Consarnau et al., 2018), permitiendo conocer qué genes están siendo transcritos bajo un contexto ecológico (Gifford et al., 2011; Ottesen et al., 2011). Por otro lado, la metaproteómica se dedica al análisis de las proteínas expresadas en una comunidad microbiana (Heyer et al., 2017).

Tabla 1. Distribución de la capacidad de síntesis de vitamina B₁₂ en genomas de los principales grupos del bacterioplancton marino (tomado y modificado de Sañudo-Wilhelmy et al., 2014). Los números entre paréntesis indican la cantidad de genomas estudiados.

Phylum	Genomas con la ruta de vitamina B ₁₂ (%)
Cyanobacteria (44)	99
Proteobacteria (208)	34
Bacteroidetes (40)	0

A pesar de que se han realizado distintos trabajos donde se analiza la presencia de la ruta de síntesis y de enzimas dependientes de B₁₂ en distintos genomas disponibles en bases de datos en línea (Zhang et al., 2009; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Heal et al., 2017; Shelton et al., 2019), en los últimos años se han secuenciado masivamente más genomas lo cual permite el análisis actualizado en una base de datos más completa que no tenía anteriormente todos los grupos. Es por ello que, este trabajo se centra en analizar a mayor detalle los patrones de genes de síntesis y dependencia de B₁₂, así como también los genes asociados a la vía de salvamiento en los genomas de los principales grupos taxonómicos que forman parte del bacterioplancton marino a partir de una base de datos más actualizada. Por otro lado, los trabajos que se han realizado para observar cómo es la expresión de genes de la comunidad microbiana, en experimentos de mesocosmos o de muestras ambientales, han sido de gran ayuda para entender que la funcionalidad de los microorganismos a nivel de genes está asociada a la variabilidad ambiental. Sin embargo, no se ha estudiado a detalle cómo es la dinámica de la expresión de genes de síntesis y de

dependencia de B₁₂ asociado a la variabilidad temporal. Este trabajo contrasta los patrones de distribución de genes de B₁₂ en genomas microbianos marinos con la expresión de estos genes en comunidades microbianas de muestras ambientales.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Biosíntesis de B₁₂

La vitamina B₁₂ es una molécula conformada por un anillo de corrina y un ligando bajo y alto (**iError! No se encuentra el origen de la referencia.**) (Fang et al., 2017). El ligando alto puede ser un grupo adenosil, metil, hidroxilo o ciano; mientras que, el ligando bajo puede ser dimetilbenzimidazol (DMB), donde su forma activa es alfa ribazol, o adenina para la pseudocobalamina (Wienhausen et al., 2022). Sin embargo, en el océano la cobalamina se puede encontrar en dos formas biológicas principales: adenosilcobalamina y metilcobalamina (Raux et al., 2000; Warren et al., 2002).

La B₁₂ forma parte de la familia de cofactores denominados cobinamidas, donde lo único que las diferencia es el ligando bajo, ya sea un fenol, una purina o un derivado benzimidazol (Sokolovskaya et al., 2020; Wienhausen et al., 2022). La importancia de que existan diferentes cobinamidas recae en la selectividad que pueden tener los microorganismos marinos y las afectaciones que puede tener este factor en las interacciones microbianas (Sokolovskaya et al., 2020).

Los cofactores B₁₂ forman parte de la misma familia biológica donde se encuentran los derivados tetrapirroles (1 pirrol = C₄H₅N), los cuales incluyen a los grupos hemo, clorofila, coenzima F430, entre otros. El centro de estas moléculas se caracteriza por tener un ion metálico, como el magnesio en la clorofila, hierro en el grupo hemo y cobalto en la cobalamina. El ion de cobalto presente en el centro de la cobalamina está ligado a cuatro nitrógenos derivados del pirrol y por dos ligandos (Raux et al., 2000).

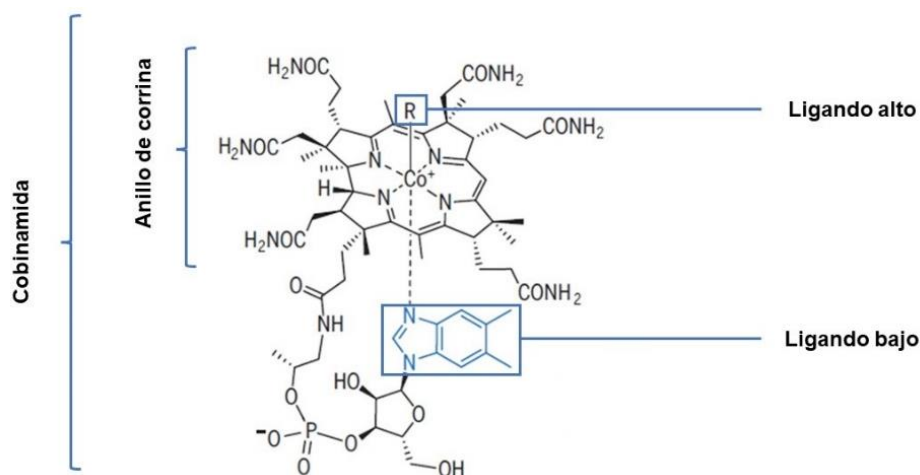


Figura 1. Estructura molecular de las cobinamidas. Las cobinamidas se caracterizan por tener un anillo de corrina que presenta un ion de cobalto. El ligando alto (R) puede ser 5'deoxiadenosil, metil o ciano, los cuales le dan a las cobinamidas versatilidad en la reactividad química. El ligando bajo es diferente entre cobinamidas, puede ser dimetilbenzimidazol, una purina o un fenol (tomado y modificado de Sokolovskaya et al., 2020).

La ruta de síntesis de adenosilcobalamina se divide en tres grupos de genes (**iError! No se encuentra el origen de la referencia.**): el grupo de genes *cobI*, los cuales se encargan de convertir la molécula de uroporfirinógeno III en una cobinamida; el grupo de genes *cobII*, son los encargados de sintetizar la molécula de DMB o el ligando bajo y por último, el grupo de genes *cobIII*, los cuales se encargan de armar toda la molécula de cobalamina (Raux et al., 2000; Rodionov et al., 2003).

La biosíntesis de adenosilcobalamina comienza con la molécula de uroporfirinógeno III, que es un tetrapirrol y el primer intermediario para la síntesis de B₁₂ (**iError! No se encuentra el origen de la referencia.**). La primera parte de la ruta comienza con la síntesis del anillo de corrina y consiste de una serie de pasos que utilizan intermediarios denominados precorrinas, los cuales llevan una numeración entre 1 a 8 asociados al número de grupos metil que se van incorporando a la molécula de tetrapirrol (Raux et al., 2000). La síntesis del anillo de corrina puede realizarse por la vía aerobia o anaerobia, en donde difieren únicamente en los requerimientos de oxígeno, ya que, la primera requiere de oxígeno para promover la contracción del anillo de corrina, mientras que, la segunda no requiere de oxígeno para realizar este paso (Raux et al., 2000; Rodionov et al., 2003; Fang et al., 2017). Los genes que codifican las enzimas en la ruta de síntesis aerobia se encuentran con el prefijo *cob*, mientras que los genes de la ruta anaerobia se encuentran con el prefijo *cbi* (**iError! No se encuentra el origen de la referencia.**) (Martens et al., 2002).

En la ruta aerobia, la inserción del cobalto es llevada a cabo por los genes *cobN*, *cobS*, *cobT*, los cuales codifican a la enzima ATP-dependiente cobalto quelatasa; mientras que, en la ruta anaerobia, los genes *cbiK* y *cbiX* codifican a la enzima ATP-independiente cobalto quelatasa. Por otro lado, los genes *cobE*, *cobF*, *cobG*, *cobN*, *cobS*, *cobT* y *cobW* son genes específicos de la ruta aerobia, mientras que, los genes *cbiD*, *cbiG* y *cbiK* son específicos de la ruta anaerobia. Sin embargo, la segunda parte de la síntesis de adenosilcobalamina se comparte en ambas rutas, la cual involucra la incorporación del grupo adenosil al anillo de corrina, donde se forma un lazo entre el ligando bajo dimetilbenzimidazol y el anillo de corrina (Rodionov et al., 2003; Fang et al., 2017).

Distintos trabajos han analizado los genomas de organismos procariotas para identificar como está distribuida la capacidad de síntesis de B₁₂ en el bacterioplancton marino. Diversos autores (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014) analizaron genomas de los principales grupos taxonómicos que dominan en el océano, y determinaron que los principales grupos sintetizadores son el orden Rhodobacterales, el cual pertenece a la clase Alphaproteobacteria, algunos miembros de la clase Gammaproteobacteria y organismos del phylum Cyanobacteria. En contraste, los genomas que pertenecen al phylum Bacteroidetes no tienen la capacidad de síntesis.

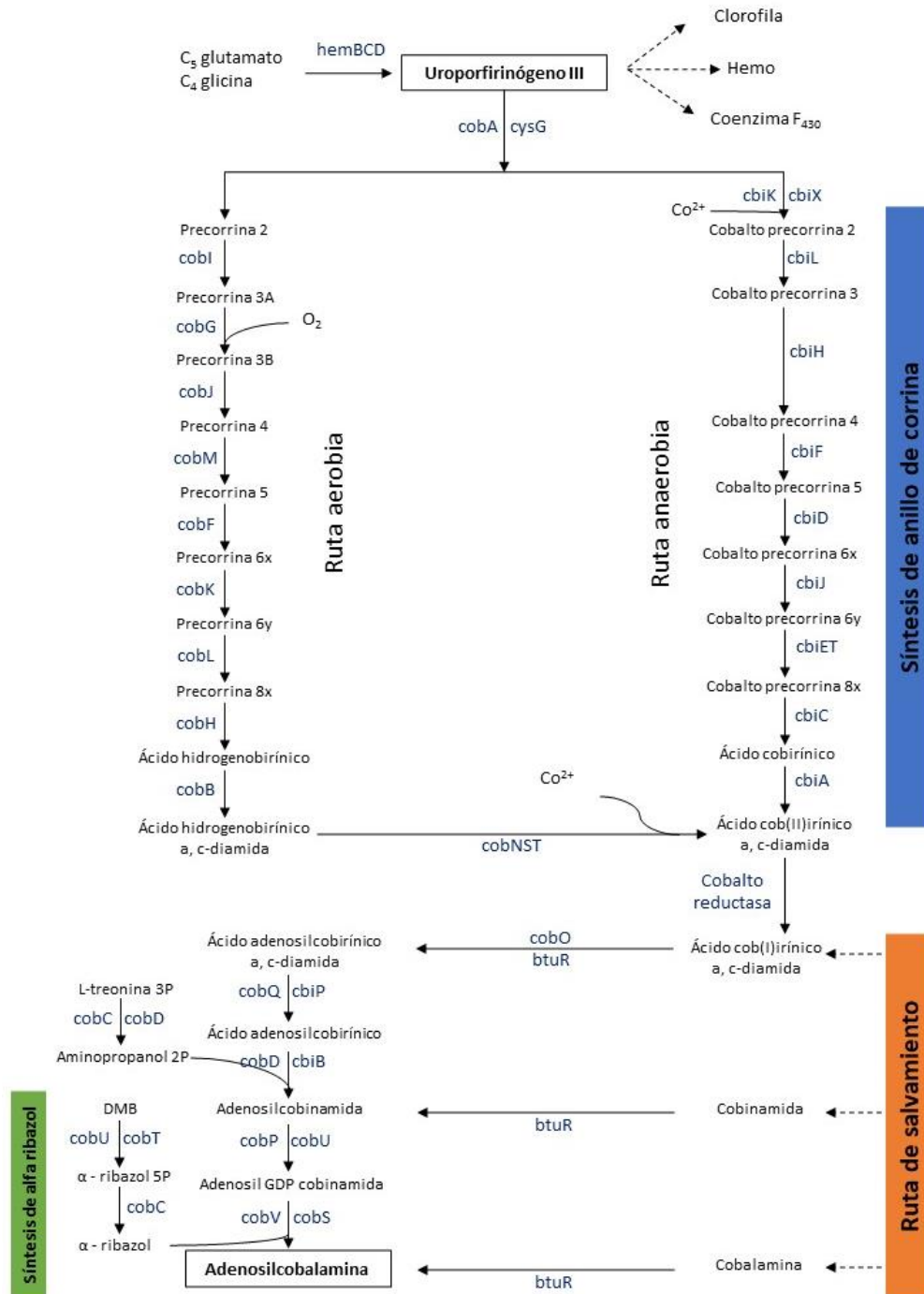


Figura 2. Ruta de síntesis de adenosilcobalamina. Se conforma por los genes encargados de codificar enzimas asociadas a la síntesis del anillo de corrina (azul), ya sea por la vía aerobia o anaerobia; genes encargados de codificar enzimas asociadas a síntesis de alfa ribazol (verde); y por último, el grupo de genes asociados a la parte final de la ruta de síntesis de B₁₂ y a la vía de salvamiento (naranja) (tomado y modificado de Rodionov et al., 2003).

El orden Rhodobacterales suele predominar durante y después de los florecimientos algales, y han sido identificados como potenciales simbiosistas con el fitoplancton proveyéndole B₁₂ a cambio de materia

orgánica (Wagner-Döbler et al., 2010). Más del 80 % de las bacterias de este grupo tiene la ruta para la síntesis de B₁₂, pero gran parte también no tiene las rutas para sintetizar B₁ y B₇. Esto sugiere que existe simbiosis con otros grupos microbianos como el fitoplancton y puede ocurrir un intercambio de vitaminas, ya que ciertos grupos del fitoplancton pueden sintetizar B₁ o B₇ (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014). Por otro lado, Bacteroidetes es un importante grupo del bacterioplancton, ya que contribuye a la degradación de materia orgánica compleja y, al igual que los Rhodobacterales, también se encuentra ampliamente asociado en la ocurrencia de florecimientos algales (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014). Dentro de Bacteroidetes se encuentra el taxón Flavobacteriaceae, muy conocido por ser auxótrofo de B₁₂ (Joglar et al., 2021). Sin embargo, el 24 % puede sintetizar la B₁ y el 56 % la B₇, lo cual sugiere que se encuentran limitados por la disponibilidad de vitaminas y requieren de una fuente exógena para adquirirlas (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014).

El phylum Cyanobacteria se caracteriza por ser el grupo de organismos fotosintéticos más abundantes en el océano y, además, son uno de los principales productores potenciales de vitamina B₁₂ (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014). Sin embargo, análisis genómicos han demostrado que este grupo de bacterias solo presenta los genes necesarios para la síntesis del anillo de corrina (*cbiA-cobB*, *cbiH-cobJ*) pero no los genes involucrados en la síntesis y activación de DMB (*bluB*, *cobT*). Esto se debe a que este phylum produce pseudocobalamina, donde el ligando bajo es adenina en lugar de DMB (Heal et al., 2017). Se ha demostrado que este tipo de cobalamina que producen las cianobacterias no es funcional para todos los organismos procariontes y eucariontes, por lo cual requieren de transformaciones bioquímicas para poder utilizarla (Helliwell et al., 2016; Helliwell, 2017). Algunas bacterias y microalgas pueden sustituir al ligando bajo de la pseudocobalamina por DMB, siempre y cuando tengan los genes para su síntesis o se encuentre disponible en el ambiente y lo incorporen por la vía de salvamiento (Smith et al., 2018; Sokolovskaya et al., 2020).

1.1.2 Vía de salvamiento o remodelación de B₁₂

Aproximadamente un tercio de los procariontes pueden producir B₁₂. Sin embargo, algunos de los organismos que la requieren y no tienen la ruta de síntesis *de novo*, pueden suplementar ese déficit de vitamina a través de la vía de salvamiento o por estrategias de remodelación reactivando análogos de cobalamina o incorporando cobinamidas (Bertrand et al., 2015; Sokolovskaya et al., 2020; Wienhausen et al., 2022). Algunas moléculas en ocasiones no pueden ser transportadas al interior de la membrana, debido al alto peso molecular, carga o polaridad (D'Souza et al., 2018). Sin embargo, la B₁₂, cobinamidas y

otros precursores pueden ser transportados activamente a través de la membrana bacteriana, por medio de transportadores de membrana externa *btuB* de tipo TonB, y transportadores ABC, conformados por una proteína periplásmica *btuF* y dos subunidades transmembrana *btuC* y *btuD*. Estos transportadores tienen la función de enlazar la B₁₂ y transportarla a través de la membrana interna hacia el interior de la célula (Rodionov et al., 2003; Fang et al., 2017; Putnam & Goodman, 2020).

Ya sea por la vía *de novo* o por la vía de salvamiento, ambas rutas de obtención de vitamina B₁₂ requieren de ATP corrina adenosiltransferasa, la cual es codificada por el gen *btuR* (Rodionov et al., 2003). En algunos casos la vía de salvamiento puede adquirir la molécula de corrina o incluso la bacteria puede añadir el ligando alto (Smith et al., 2018). Esta vía puede ser más eficaz debido al menor costo energético que se requiere para incorporar la cobalamina hacia el interior de la célula. La síntesis y transporte de B₁₂ es regulada por riboswitch cobalamina en la región 5' no traducida del ARNm (Fang et al., 2017).

Ya que no todos los microorganismos marinos tienen la capacidad de síntesis de B₁₂ *de novo*, se han analizado genomas de organismos procariotas que poseen los genes asociados a la vía de salvamiento, la cual puede ser una vía más eficiente metabólicamente para la obtención de cobalamina (Sokolovskaya et al., 2020). Sin embargo, a pesar de que se han realizado distintos trabajos donde se analiza la ruta de síntesis de vitamina B₁₂ en genomas microbianos, poco se ha reportado sobre los patrones de distribución de la vía de salvamiento (Zhang et al., 2009; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Shelton et al., 2019).

1.1.3 Requerimientos de B₁₂ en microorganismos marinos

La B₁₂ es requerida en el metabolismo central como cofactor de diferentes enzimas como la metionina sintasa, la cual está involucrada en la síntesis del aminoácido metionina donde cataliza la transferencia de un grupo metil a homocisteína; la ribonucleótido reductasa, que cataliza la conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, importante en la replicación y reparación del ADN (Banerjee y Ragsdale, 2003); y la enzima metilmalonil CoA mutasa, que interviene en el metabolismo de ácidos grasos y del carbono (Gruber et al., 2011). Por otro lado, existen más enzimas dependientes de B₁₂ que se pueden encontrar en bacterias marinas, pero en menor frecuencia, como glutamato mutasa y lisina-ornitina aminomutasas, las cuales intervienen en el metabolismo de aminoácidos; metilene-glutarato mutasa, etanolamina amonio liasa y glicerol-diol deshidratasa, involucradas en el metabolismo del carbono y nitrógeno (Martens et al., 2002; Brown, 2005; Sokolovskaya et al., 2020).

La presencia de distintas enzimas dependientes de B₁₂ que están involucradas en el metabolismo central en genomas de microorganismos marinos es relevante, ya que resalta la necesidad que tienen gran parte de las comunidades microbianas de adquirir esta vitamina, ya sean organismos capaces de sintetizarla, organismos que incorporen la cobalamina o intermediarios a través de la vía de salvamento, u organismos que sean completamente auxótrofos de B₁₂ y dependan de que esté disuelta en el ambiente o la adquieran realizando simbiosis con otros organismos protótrofos.

Los requerimientos de vitamina B₁₂ están presentes en casi todos los organismos procariotas y eucariotas, a pesar de que la producción de esta vitamina está asociada a sólo un sector del bacterioplancton. Se ha analizado la dependencia de B₁₂ en genomas que pertenecen a los tres dominios de vida (Zhang et al., 2009), donde encontraron que todos los procariotas presentan al menos una enzima dependiente de B₁₂ y sólo la mitad de las bacterias que utilizan B₁₂ tienen la capacidad de sintetizarla. La enzima metionina sintasa se ha reportado en gran parte de los genomas que pertenecen a los taxones Bacteroidetes, Cyanobacteria, Proteobacteria y Archaea (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014); mientras que, la enzima ribonucleótido reductasa se ha reportado principalmente en los genomas de los taxones Proteobacteria y Bacteroidetes (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014) y en algunos de Archaea (Zhang et al., 2009); por otro lado, la enzima metilmalonil CoA mutasa se ha reportado en los genomas de los phyla Proteobacteria y Bacteroidetes (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Shelton et al., 2019).

Las concentraciones de B₁₂ disuelta en agua de mar son bajas (de 0.1 a 40 pmol/L) en comparación a otras vitaminas B, lo cual puede ser limitante para el crecimiento de los microorganismos marinos auxótrofos (Bonnet et al., 2010; Koch et al., 2012; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014). Este cofactor orgánico es necesario para que se lleven a cabo ciertas reacciones enzimáticas y si no está disponible en el ambiente la reacción no se puede llevar a cabo, por lo que diversos procesos biológicos como la bomba biológica pueden verse comprometidos (Sañudo-Wilhelmy et al., 2012).

La disponibilidad de B₁₂ en el océano puede moldear la estructura de las comunidades microbianas y puede ser un factor determinante en la sucesión del plancton marino (Koch et al., 2012). La B₁₂ puede obtenerse a partir de interacciones con productores de B₁₂ o por el rompimiento de las células que la contienen liberándola en forma disuelta. Las interacciones entre productores y consumidores son muy importantes en el océano, ya que reflejan lo complejas que son las interdependencias asociadas a esta vitamina (Gómez-Consarnau et al., 2018).

1.1.4 Expresión de genes de B₁₂ en el ecosistema marino

El análisis genómico permite obtener información acerca de la presencia de genes relacionados con la síntesis y dependencia de la vitamina B₁₂, revelando el potencial que tienen diversos microorganismos de proveer estos compuestos orgánicos a la comunidad microbiana. Sin embargo, en el sistema natural las comunidades microbianas se caracterizan por ser muy dinámicas, altamente productivas y por cambiar rápidamente ante fluctuaciones ambientales aunque esas perturbaciones sean pequeñas, por lo cual, la expresión de genes y las funciones que realizan pueden ser afectadas en el ecosistema (Ottesen et al., 2011, 2013).

En el Océano del Sur se realizó un estudio (Bertrand et al., 2015) en el cual determinaron en muestras de agua superficial que la comunidad microbiana estuvo dominada por el microorganismo *Oceanospirillacea*, el cual contribuyó en más del 70 % de los transcritos asociados a síntesis de cobalamina durante el verano Austral. Además, los autores reportaron que este organismo expresó genes asociados a la adquisición de compuestos orgánicos, por lo cual, sugieren que puede estar asociado a una relación directa con el fitoplancton en donde se genera un intercambio de materia orgánica y de vitaminas. Esto coincide con lo reportado por otros autores (Joglar et al., 2021), quienes realizaron un experimento de mesocosmos para identificar la expresión de genes de la comunidad ante un suplemento de B₁₂ y de nutrientes. En ese trabajo observaron un incremento en la expresión de genes de síntesis de B₁₂ asociados a la adición de nutrientes inorgánicos, lo cual puede estar asociado a que existe una relación entre el fitoplancton y bacterias productoras de B₁₂.

Se han realizado estudios sobre metatranscriptómica para identificar la expresión de genes asociados a la síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ entre distintos grupos bacterianos en muestras de agua marina (Gómez-Consarnau et al., 2018). El orden Rhodobacterales es el grupo con mayor cantidad de transcritos asociados a síntesis y dependencia de B₁₂ a lo largo de un año de estudio, mientras que, en el grupo de Flavobacteria la expresión de genes de síntesis y dependencia es baja comparada con otros grupos bacterianos, por lo cual, se sugiere que los requerimientos de B₁₂ por parte de este grupo son menores.

1.2 Justificación

Gran parte del fitoplancton y algunos grupos de bacterias son auxótrofos para ciertas vitaminas (B₁, B₇, B₁₂) (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Ellis et al., 2017). Se han realizado diversos estudios sobre genomas

para identificar cómo se distribuye la capacidad de síntesis y dependencia de B₁₂ en el océano, demostrando que solo ciertos grupos taxonómicos tienen la capacidad de síntesis mientras que una gran parte de la comunidad microbiana depende de ella (Zhang et al., 2009; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Shelton et al., 2019). No obstante, poco se ha estudiado sobre la distribución de los genes asociados a la vía de salvamiento en genomas microbianos marinos, además, que en los últimos años se han secuenciado masivamente más genomas, lo cual permite el análisis actualizado en una base de datos más completa que no tenía anteriormente todos los grupos. Es por ello que, en este trabajo se analizan patrones de genes de la ruta de síntesis y de enzimas dependientes de B₁₂, así como también patrones de genes asociados a la vía de salvamiento o remodelación de B₁₂ en genomas de los principales grupos taxonómicos del bacterioplancton marino por medio de una base de datos más actualizada.

Por otro lado, se han realizado distintos trabajos de metatranscriptómica de muestras ambientales y de experimentos de mesocosmos para identificar patrones en la expresión de genes de síntesis y dependencia de B₁₂ en la comunidad microbiana. Sin embargo, no se ha estudiado la dinámica en la expresión de genes de esta vitamina con respecto a la variabilidad temporal (Bertrand et al., 2015; Gómez-Consarnau et al., 2018; Joglar et al., 2021). En este trabajo se analizaron patrones de genes de síntesis y enzimas dependientes de B₁₂ en genomas de los principales grupos del bacterioplancton marino a partir de una base de datos más actualizada y, además, determinar la expresión de estos genes por parte de la comunidad microbiana en muestras ambientales durante una serie de tiempo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar las características genómicas de los grupos de procariontes protótrofos y auxótrofos de B₁₂, y entender la dinámica en la expresión de genes de síntesis y dependencia de B₁₂ ante cambios temporales.

1.3.2 Objetivos específicos

- Comparar la distribución taxonómica y las características genómicas entre grupos de procariontes protótrofos y auxótrofos de B₁₂, utilizando bases de datos disponibles en línea.

- Determinar la variabilidad temporal de la expresión de genes de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ asociados a la comunidad microbiana, utilizando datos de metatranscriptómica obtenidos de muestras ambientales.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Búsqueda de genomas de procariotas aislados de ambientes marinos disponibles en la base de datos IMG

Se realizó una búsqueda de genomas de microorganismos marinos aislados en cultivos puros, pertenecientes a los dominios Bacteria y Archaea, disponibles en bases de datos en línea. Se utilizó la base de datos Integrada de Genomas Microbianos (IMG, por sus siglas en inglés), perteneciente al Joint Genome Institute (<https://img.jgi.doe.gov/>, revisado el 5 de noviembre de 2022), donde se seleccionaron aquellos genomas secuenciados con el estado “Finalizado” y “Borrador permanente”. Además, los genomas a analizar fueron seleccionados por ecosistema marino incluyendo distintos ambientes: llanura abisal, zona fótica, afótica, y no clasificado. No se incluyeron en los análisis los genomas aislados de muestras de sedimento. Con esta base de datos se identificaron los genomas de procariotas que codifican para la ruta de síntesis de cobalamina, así como los genes que codifican para la síntesis de enzimas que dependen de B₁₂. Además, se obtuvo información de algunas características adicionales como el tamaño de los genomas.

2.1.1 Identificación de genes involucrados en la ruta de síntesis de vitamina B₁₂ en los genomas de procariotas aislados de ambientes marinos

Se utilizó la Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas (KEGG, por sus siglas en inglés) (<https://www.genome.jp/kegg/>, revisado el 5 de noviembre de 2022) para definir los genes necesarios para la ruta de síntesis de vitamina B₁₂. Se seleccionaron aquellos genes involucrados en la ruta de síntesis completa, en donde se consideraron los genes asociados a la ruta aerobia y anaerobia (Raux et al., 2000; Rodionov et al., 2003; Fang et al., 2017). Una vez que se definieron los genes involucrados en la ruta de síntesis, por medio de su número EC se introdujeron a la base de datos IMG para asociar las funciones de síntesis de cobalamina con los genomas marinos aislados, donde se utilizó la función de búsqueda “Genomas vs. Funciones”. Los genomas considerados como sintetizadores de B₁₂ fueron aquellos que contienen los siguientes genes (Tabla 2):

- 1) Genes asociados a la síntesis del anillo de corrina, ya sea por la ruta aerobia o anaerobia (Raux et al., 2000).
- 2) Genes encargados de sintetizar alfa ribazol (Raux et al., 2000).
- 3) Genes encargados de la síntesis de la molécula de adenosilcobalamina (Raux et al., 2000).

Con los genomas pertenecientes al phylum Cyanobacteria se tomaron en cuenta únicamente los genes asociados a los grupos *cobI* y *cobIII* para ser considerados como sintetizadores de B₁₂, debido a que se supone que pueden suplir al DMB por adenina como ligando bajo (Heal et al., 2017). Por otro lado, en los genomas del dominio Archaea no se consideraron los genes *cobK-cbiJ* ya que se han reportado como genes no esenciales dentro de este dominio (Doxey et al., 2015), así como también los genes *cobU-cobT* y *cobC-phpB*, debido a que se ha determinado que este dominio obtiene el ligando bajo a través de otra vía (Heal et al., 2017).

2.1.2 Identificación de enzimas que requieren de vitamina B₁₂ como cofactor en los genomas de procariontes aislados de ambientes marinos

Siguiendo el mismo método de identificación de genes involucrados en la ruta de síntesis de cobalamina en IMG, se identificaron todos los genes que codifican para las enzimas que requieren de B₁₂ como cofactor. Cada enzima se buscó por medio de su número EC, el cual se introdujo a la base de datos IMG y se utilizó la función “Genomas vs. Funciones” para asociarlas con la base de datos con los genomas estudiados. Se buscaron un total de 11 enzimas que dependen de vitamina B₁₂ y que se encuentran comúnmente en grupos bacterianos (Tabla 3) (Brown, 2005; Croft et al., 2006; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Sokolovskaya et al., 2020).

2.1.3 Análisis filogenético de los procariontes marinos

Los árboles filogenéticos fueron construidos para observar patrones de distribución en la presencia de rutas de síntesis de cobalamina entre los genomas seleccionados en la base de datos IMG y por medio del NCBI taxon ID.

Tabla 2. Genes involucrados en la ruta de síntesis de vitamina B₁₂ con su respectivo número de clasificación enzimática (EC). Grupo de genes *cobI* encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes *cobII* encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes *cobIII* finaliza la síntesis de adenosilcobalamina.

Número EC	Gen	Grupo de genes
2.1.1.107; 1.3.1.76; 4.99.1.4	<i>cysG</i>	
2.1.1.130; 2.1.1.151	<i>cobI-cbiL</i>	
2.1.1.131; 2.1.1.272	<i>cobJ-cbiH</i>	
2.1.1.133; 2.1.1.271	<i>cobM-cbiF</i>	
1.3.1.54; 1.3.1.106	<i>cobK-cbiJ</i>	
2.1.1.132; 2.1.1.289; 2.1.1.196	<i>cobL-cbiET</i>	
5.4.99.61; 5.4.99.60	<i>cobH-cbiC</i>	
6.3.5.9; 6.3.5.11	<i>cobB-cbiA</i>	<i>cobI</i>
1.14.13.83	<i>cobG</i>	
2.1.1.152	<i>cobF</i>	
6.6.1.2	<i>cobN-cobS-cobT</i>	
4.99.1.3	<i>cbiK-cbiX</i>	
3.7.1.12	<i>cbiG</i>	
2.1.1.195	<i>cbiD</i>	
2.5.1.17	<i>cobA-btuR-cobO</i>	
6.3.5.10	<i>cobQ-cbiP</i>	
2.4.2.21	<i>cobU-cobT</i>	<i>cobII</i>
3.1.3.73	<i>cobC-phpB</i>	
6.3.1.10	<i>cobD-cbiB</i>	<i>cobIII</i>
2.7.1.156; 2.7.7.62	<i>cobP-cobU</i>	
2.7.8.26	<i>cobS-cobV</i>	

Tabla 3. Enzimas dependientes de vitamina B₁₂ con su respectivo número de clasificación enzimática (EC).

Número EC	Enzima
1.17.4.1	Ribonucleótido difosfato reductasa (RDFR)
2.1.1.13	Metionina sintasa (MS)
5.4.99.2	Metilmalonil CoA mutasa (MMCM)
4.3.1.7	Etanolamina amonio-liasa (EAL)
5.4.3.3	Beta-lisina 5,6-aminomutasa (LAM)
5.4.99.1	Metilaspártato mutasa (MM)
4.2.1.28	Propanediol deshidratasa (DD)
4.3.1.2	Metilaspártato amonio-liasa (MAL)
5.4.3.5	D-ornitina 4,5-aminomutasa (OAM)
4.2.1.30	Glicerol deshidratasa (GD)
5.4.99.4	2-metileneglutarato mutasa (MGM)

Únicamente se realizaron árboles filogenéticos de los phyla más representativos de la base de datos. Se buscaron las secuencias del gen 16S rRNA en formato FASTA en la base de datos SILVA (<https://www.arb-silva.de/>, revisado el 11 de febrero de 2023), la cual es una base de datos que permite buscar secuencias del gen ARN ribosomal 16S/18S en los tres dominios de vida, *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. De los 1626 genomas analizados en IMG, se encontraron las secuencias del gen 16S ARNr de 930 genomas representativos. Esto se debe a que se impusieron ciertas condiciones para las secuencias del árbol filogenético:

- 1) La secuencia encontrada coincide con el NCBI taxon ID y el código de cepa.
- 2) Todas las secuencias son aproximadamente del mismo tamaño (1400-1500 pb).
- 3) Las secuencias están completamente alineadas y con una calidad >90 %.

El análisis filogenético y evolución molecular fueron realizados en MEGA versión 11 (Tamura et al., 2021). La alineación se realizó por el método MUSCLE, ya que permite alinear con mayor precisión y velocidad. Posteriormente, una vez alineadas las secuencias se eliminaron los lados extremos para poder comparar secuencias de igual longitud. Por otro lado, la construcción del árbol filogenético se generó mediante el método de Neighbor-Joining debido a que permite diferenciar grandes grupos mediante distancias euclidianas. Una vez realizado el árbol filogenético se marcaron aquellas especies de bacterias que presentan la ruta de síntesis de B₁₂.

2.2 Análisis de la expresión de genes de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ en muestras ambientales

2.2.1 Reanálisis de datos metatranscriptómicos

Se utilizaron datos de metatranscriptómica y abundancia de clorofila de muestras ambientales de los estudios de Gifford et al. (2014) y Gómez-Consarnau et al. (2018) que comprendieron el análisis de muestras de agua superficial (~0.5 m) en un estuario ubicado en la Isla Sapelo, Georgia, EUA (31° 25' 4.08 N, 81° 17' 43.26 W), como parte de una serie de tiempo multianual del Observatorio Microbiano de la Isla Sapelo (SIMO, por sus siglas en inglés). En dichos estudios, las muestras de agua fueron recolectadas (5.75

L) durante condiciones de marea alta, luz (entre 11:00 y 12:00 horas) y obscuridad (entre 23:00 y 00:00 horas) en días consecutivos y en las cuatro estaciones del año (incluyendo dos veranos) (Tabla 4).

Tabla 4. Muestreos realizados en la Isla Sapelo, Georgia, EUA (Gifford et al., 2014; Gómez-Consarnau et al., 2018).

Estación	Fecha	Día/noche
Verano 2008	6-7 agosto	Día 1
		Noche 1
Otoño 2008	5-7 noviembre	Día 1
		Noche 1
		Día 2
		Día 1
Invierno 2009	15-17 febrero	Noche 1
		Día 2
		Día 1
		Día 1
Primavera 2009	13-15 mayo	Día 2
		Noche 2
		Día 1
Verano 2009	12-14 agosto	Noche 1
		Día 2
		Día 1

La metodología seguida por los autores (Gifford et al., 2014; Gómez-Consarnau et al., 2018) consistió en recolectar agua la cual fue filtrada a través de un filtro de 3 μm y después en un filtro de 0.22 μm . Este último fue guardado en nitrógeno líquido hasta su análisis de procesamiento y secuenciación. Posteriormente, el ARN fue extraído de las muestras de agua de acuerdo con lo descrito por diversos autores (Poretsky et al., 2009; Gifford et al., 2011, 2013, 2014) usando el kit RNeasy (Qiagen), se realizó el proceso de amplificación, utilizando MessageAmp II-Bacteria kit (Applied Bio-systems) y el proceso de secuenciación, con Illumina GAIIIX. Una vez obtenidas las secuencias se realizó el ensamblaje, la anotación funcional y la taxonomía, las cuales se encuentran descritas a mayor detalle en distintas publicaciones (Gifford et al., 2011, 2013, 2014; Gómez-Consarnau et al., 2018). Por otro lado, para el análisis de clorofila a se filtraron 250 ml de la muestra de agua en filtros GFF y se colocaron en tubos con 50 ml de acetona al 90 %, posteriormente, fueron guardados en congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis y medición en un fluorómetro Turner (Gómez-Consarnau et al., 2018).

En este trabajo se estudiaron los transcritos asociados a síntesis y dependencia de vitamina B_{12} . El número de transcritos de síntesis o dependencia de B_{12} fueron normalizados siguiendo la ecuación 1 (Montero-

Lorenzo, 2007), esto para obtener el porcentaje con respecto al total de transcritos obtenidos por muestra (

Tabla 5).

$$\% = \frac{\textit{Transcritos de B12}}{\textit{Total de transcritos muestra}} \times 100 \quad (1)$$

2.3 Análisis estadísticos

Se comparó el tamaño de los genomas de procariotas aislados de ambientes marinos disponibles en la base de datos IMG, mediante una prueba no paramétrica (U Mann-Whitney) para determinar si existen diferencias en el tamaño de los genomas entre los grupos que sintetizan y no sintetizan B₁₂. Por otro lado, con el fin de identificar las posibles diferencias significativas en los porcentajes de expresión de genes entre los diferentes muestreos ambientales se realizó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, ya que no se cumplieron los supuestos de normalidad ni de homogeneidad de varianzas. Además, para observar si existe tendencia en cuanto a la expresión de genes de síntesis y dependencia de B₁₂ se realizaron regresiones lineales de los grupos más representativos. Únicamente no se comprobó la normalidad en los datos de los grupos Chroococcales y Nitrosopumilales. Los análisis fueron realizados con los softwares STATISTICA versión 10 y R Studio versión 4.1 Las gráficas fueron realizadas con el software R Studio.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Genomas de procariotas aislados de ambientes marinos disponibles en la base de datos IMG

3.1.1 Patrones de distribución de la capacidad de síntesis de vitamina B₁₂ en los genomas de procariotas aislados de ambientes marinos

A través de la base de datos IMG se identificaron 1626 genomas de procariotas aislados de ambientes marinos (Figura 3). De estos genomas se determinó que sólo 296 tienen la ruta completa de síntesis de cobalamina, lo cual abarca cerca del 18 % de los genomas. Estos genomas se pudieron clasificar en 20 taxones (Figura 4), el phylum Bacteroidetes no presentó ningún genoma con la capacidad de síntesis de B₁₂, mientras que los taxones sintetizadores fueron Cyanobacteria (116), Proteobacteria (179) y Archaea (1).

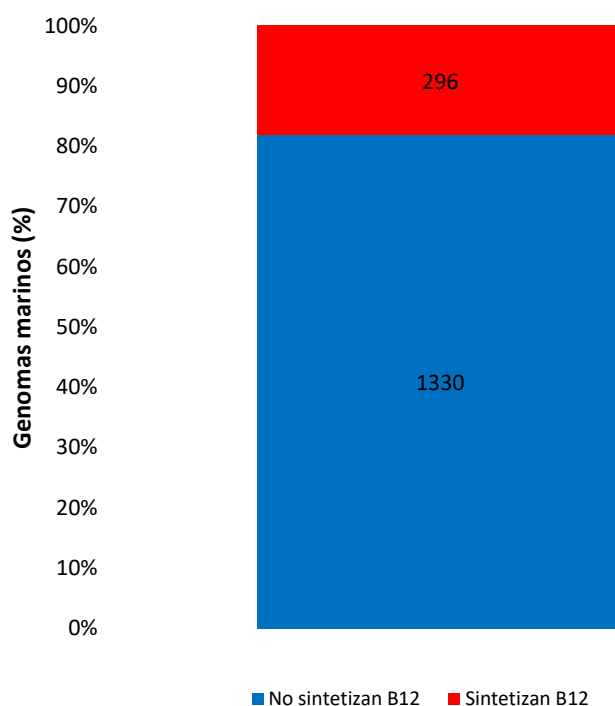


Figura 3. Genomas de procariotas marinos con y sin capacidad de síntesis de B₁₂ disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color azul no sintetizan B₁₂ y rojo sí sintetizan B₁₂.

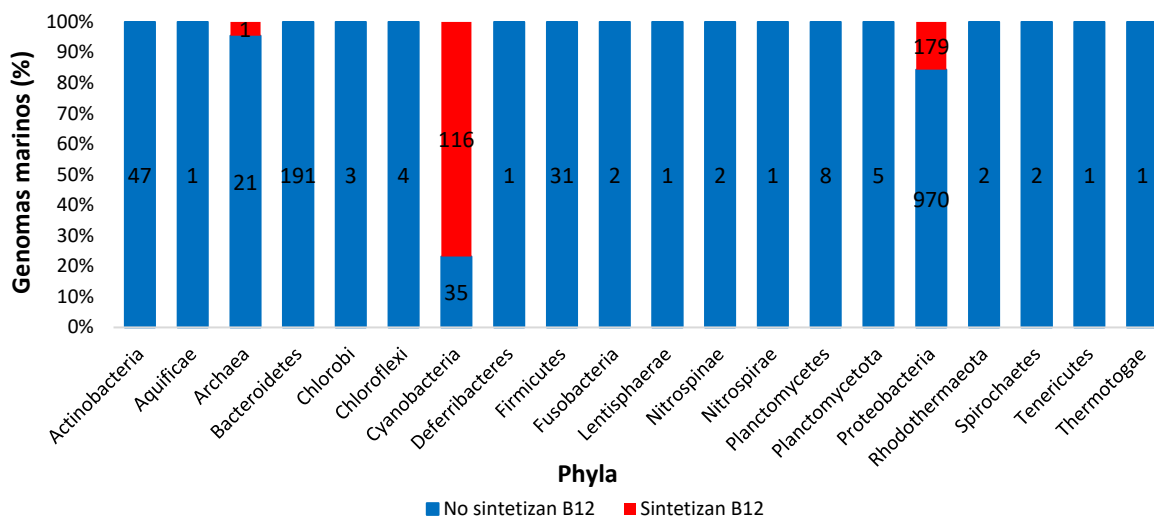


Figura 4. Genomas de procariotas marinos por phylum con y sin capacidad de síntesis de B₁₂ disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color azul no sintetizan B₁₂ y rojo sí sintetizan B₁₂. Los phyla mejor representados fueron Cyanobacteria y Proteobacteria.

3.1.2 Patrones de distribución de la capacidad de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ en los genomas bacterianos aislados de ambientes marinos pertenecientes a los phyla más representativos

3.1.2.1 Phylum Bacteroidetes

Dentro del phylum Bacteroidetes se encontraron 191 genomas de los cuales ninguno tiene la ruta completa para sintetizar adenosilcobalamina. Cerca del 70 % de los genomas presenta el gen *cysG*, sin embargo, la ausencia de genes se hace notable a partir del inicio de la ruta aerobia y anaerobia (*cobI-cbiL*), dentro del grupo de genes *cobI* (Figura 5). Los genes *cobG* y *cobF* no se presentaron en ninguno de los genomas. Menos del 10 % de los genomas pertenecientes a este phylum tiene algunos de los genes asociados a la síntesis del anillo de corrina (de *cobI-cbiL* a *cobQ-cbiP*). Por otro lado, menos del 20 % de los genomas presentan genes asociados a la síntesis de alfa ribazol (*cobU-cobT*, *cobC-phpB*) y genes que finalizan la síntesis de adenosilcobalamina (*cobP-cobU*, *cobS-cobV*), los cuales también forman parte de la vía de salvamiento.

Se determinó que todos los genomas pertenecientes al phylum Bacteroidetes requieren de al menos una enzima que depende de cobalamina (Figura 6). La enzima ribonucleótido difosfato reductasa se encuentra

en todos los genomas de este phylum (191); mientras que 176 genomas requieren de metionina sintasa y 183 genomas presentan la enzima metilmalonil CoA mutasa. Por otro lado, las enzimas EAL y LAM se presentaron en solo 12 y 4 genomas, respectivamente.

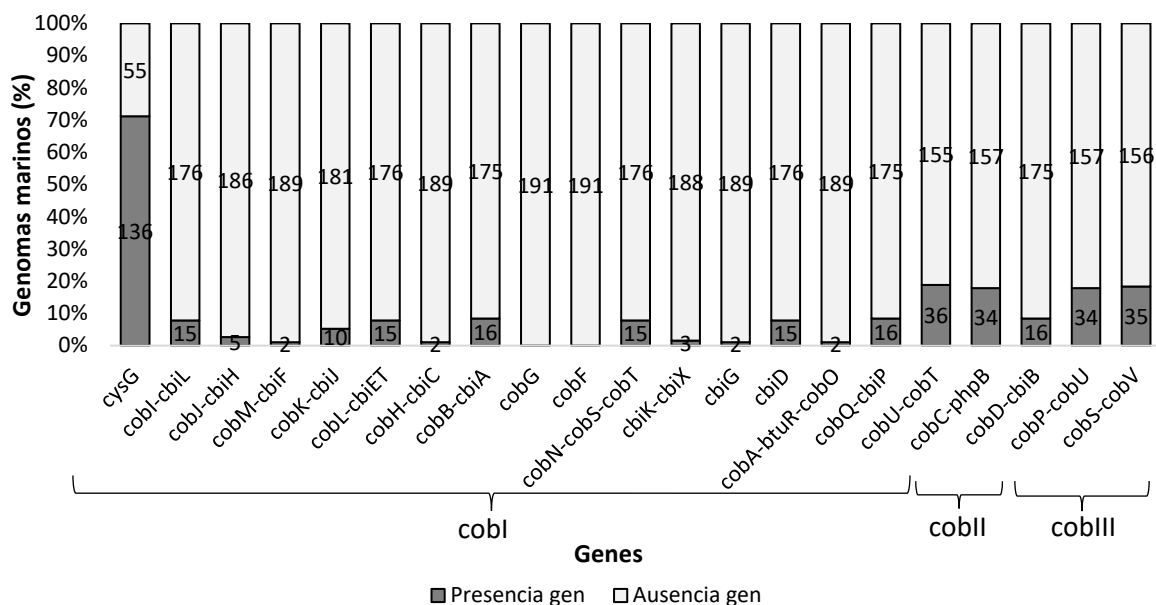


Figura 5. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B₁₂ en genomas bacterianos marinos del phylum Bacteroidetes disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes *cobI* encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes *cobII* encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes *cobIII* finaliza la síntesis de adenosilcobalamina.

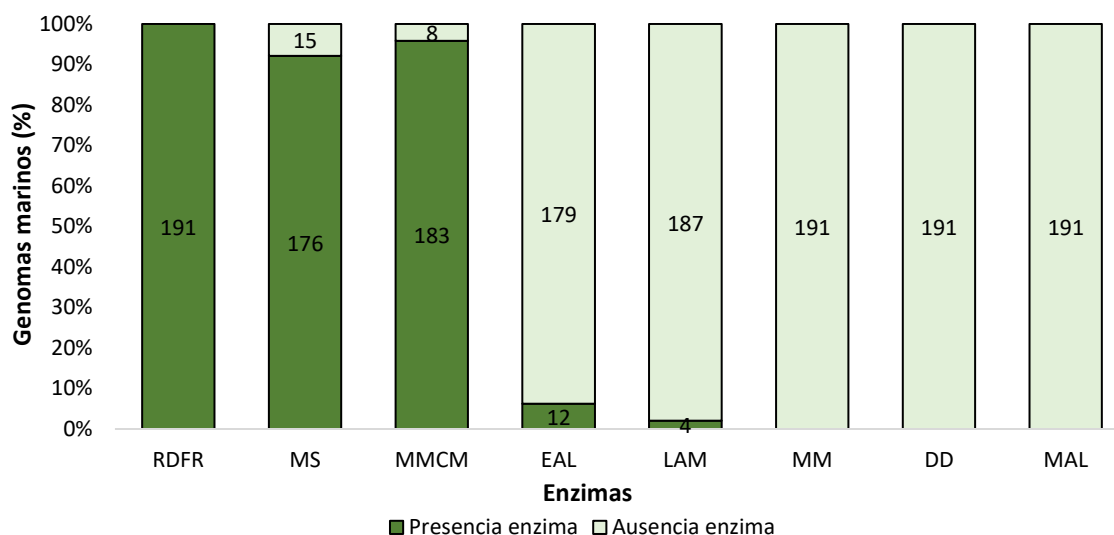


Figura 6. Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en genomas bacterianos marinos del phylum Bacteroidetes disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDRF: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa.

3.1.2.1.1 Análisis filogenético del phylum Bacteroidetes

El árbol filogenético se realizó con base en las secuencias del gen 16S obtenidas en la base de datos SILVA, en donde se buscaron cada uno de los genomas encontrados en la base de datos IMG (Figura 7). Se seleccionaron aquellas secuencias que tienen un tamaño aproximado de 1400 pares de bases y se descartaron todas aquellas que tenían un tamaño menor. Se obtuvieron un total de 94 secuencias dentro de este phylum las cuales fueron alineadas y cortadas en el software MEGA 11. Uno de los grupos que destaca en el árbol filogenético es la clase Cytophagia (línea negra), en este clado se encuentran los géneros *Fabibacter* y *Rosevirga*. Por otro lado, gran parte del árbol filogenético está representado por la clase Flavobacteriia (línea naranja) y dentro de este grupo destacan los géneros *Polaribacter*, *Flavobacteria*, *Dokdonia*, *Maribacter*, *Gramella*, entre otros.

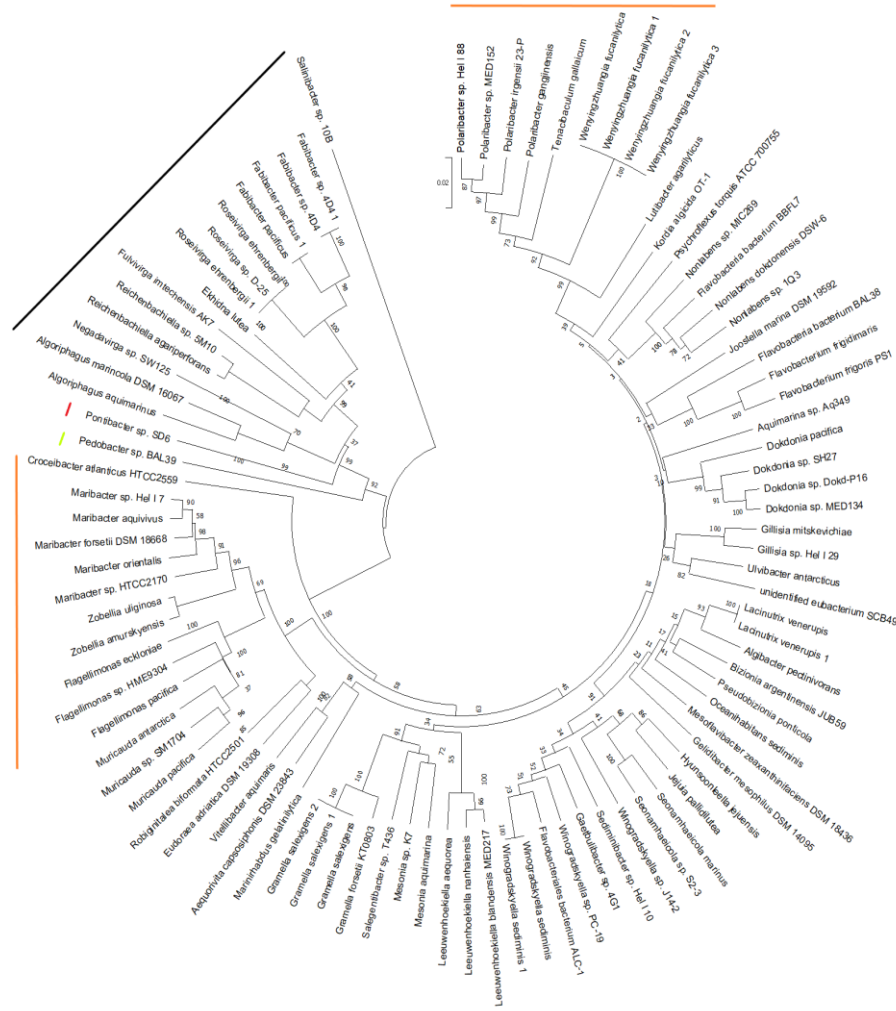


Figura 7. Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S rRNA de genomas bacterianos marinos pertenecientes al phylum Bacteroidetes (94 secuencias) disponibles en la base de datos SILVA. El valor de Bootstrap en los nodos indica el porcentaje de identidad basado en distancias genéticas. Línea negra indica la clase Cytophagia; línea roja indica la clase Sphingobacteriia; línea verde indica la clase Bacteroidia y línea naranja indica la clase Flavobacteriia.

3.1.2.1.2 Resumen de características de los genomas del phylum Bacteroidetes

- Dentro de este phylum no se presentaron genomas con la capacidad de síntesis de B₁₂.
- Ningún genoma presentó la ruta completa para sintetizar cobalamina, sin embargo, alrededor de 34 genomas presentaron los genes asociados a la síntesis de alfa ribazol (*cobU-cobT*, *cobC-phpB*) y a la parte final de la ruta de adenosilcobalamina (*cobP-cobU*, *cobS-cobV*), los cuales forman parte de la vía de salvamento.
- Más del 90 % de los genomas dentro de este phylum presentaron al menos tres enzimas que requieren de B₁₂, las enzimas RDFR, MS y MMCM.
- El árbol filogenético se conformó por dos grandes agrupaciones, la clase Cytophagia y la clase Flavobacteriia. Mientras que, se presentaron únicamente dos genomas pertenecientes a las clases Sphingobacteriia y Bacteroidia, respectivamente.

3.1.2.2 Phylum Cyanobacteria

De los genomas bacterianos marinos pertenecientes al phylum Cyanobacteria 116 genomas tienen la ruta completa para la biosíntesis de B₁₂, mientras que sólo 35 genomas no tienen este potencial genético. Gran porcentaje de los genomas bacterianos dentro de este phylum (~90 %) tienen la mayoría de los genes asociados a la síntesis del anillo de corrina (de *cobI-cbiL* a *cobQ-cbiP*) (Figura 8). Sin embargo, ningún genoma presenta los genes *cobG* y *cobF*, los cuales corresponden a los genes específicos de la ruta aerobia. Por otro lado, los genes específicos de la ruta anaerobia *cbiK-cbiX* no se presentan en ninguno de los genomas. En cuanto a la presencia de genes que forman parte del grupo *cobII* sólo un genoma presenta los genes *cobU-cobT* y 10 genomas presentan los genes *cobC-phpB*. En la parte final de la ruta de síntesis de adenosilcobalamina se encuentran los genes *cobD-cbiB*, *cobP-cobU* y *cobS-cobV*, los cuales se presentan en cerca del 90 % de los genomas. En cuanto a la dependencia de B₁₂, se encontró que más del 90 % de los genomas bacterianos pertenecientes a este phylum tienen las enzimas RDFR y MS (Figura 9), mientras que, únicamente se reportó un genoma con la enzima MMCM.

3.1.2.2.1 Análisis filogenético del phylum Cyanobacteria

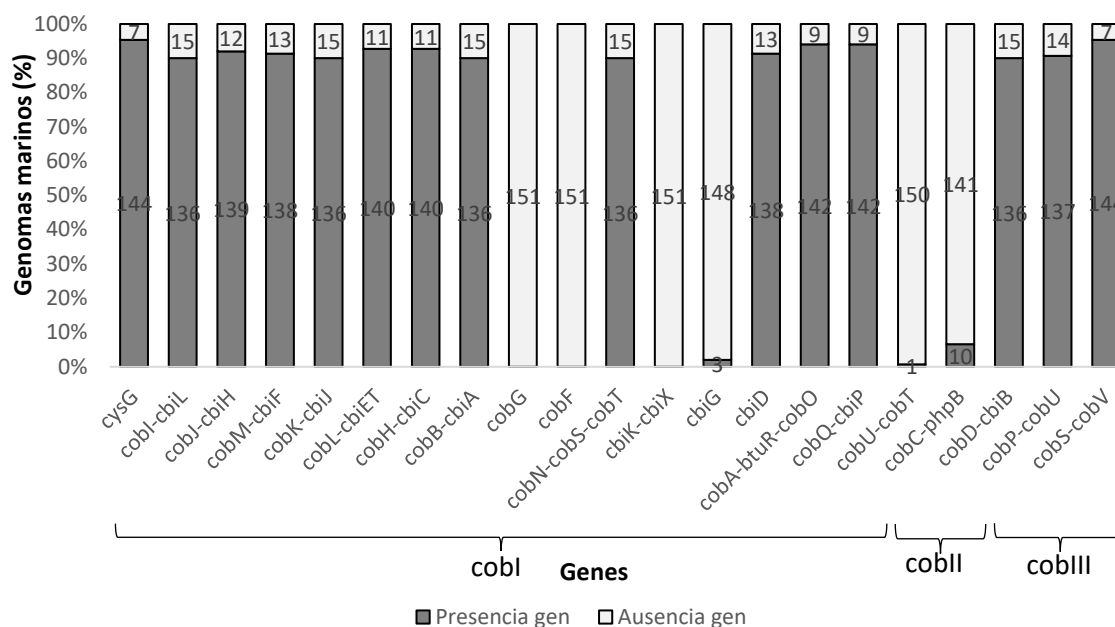


Figura 8. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B₁₂ en genomas bacterianos marinos del phylum Cyanobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes *cobI* encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes *cobII* encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes *cobIII* finaliza la síntesis de adenosilcobalamina.

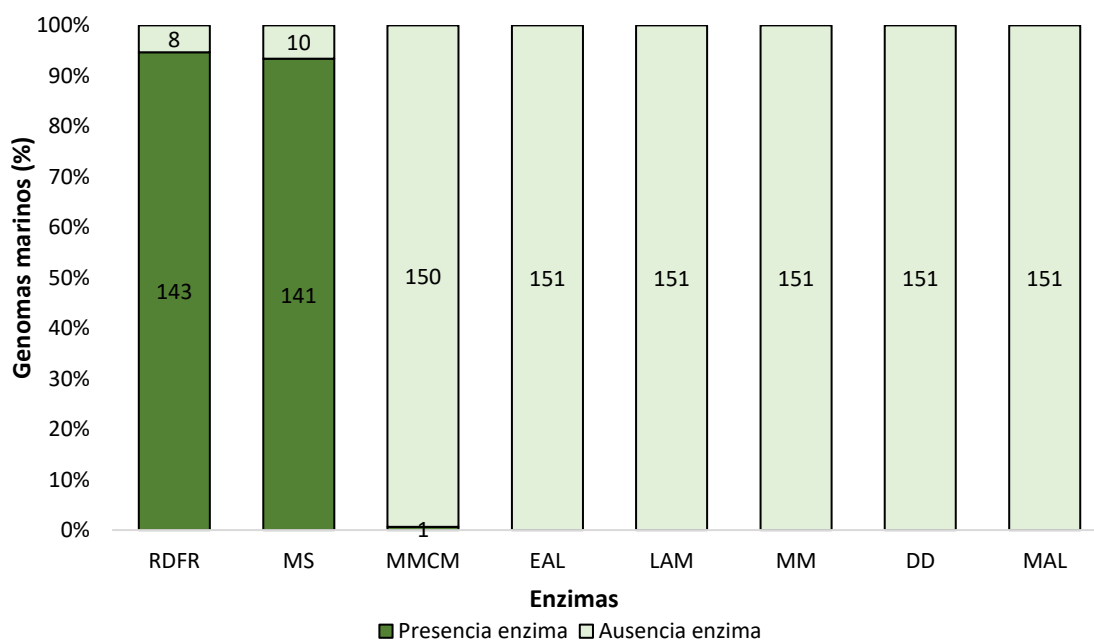


Figura 9. Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en genomas bacterianos marinos del phylum Cyanobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDFR: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa.

Se obtuvieron un total de 97 secuencias dentro del phylum Cyanobacteria, las cuales fueron alineadas y cortadas en el software MEGA 11 (Figura 10). En este árbol se observan diferentes agrupaciones. Por un lado, se encuentra el orden Chroococcales (línea café) que sí presenta ciertos genomas con la capacidad de síntesis de B_{12} (círculo rojo), entre ellos se encuentran *Crocospaera watsonii* y *Moorea producens*. Por otro lado, se encuentran otros tres órdenes agrupados, pero menos representados como los Oscillatoriales (línea negra) y Nostocales (línea verde) que sí presentan especies con capacidad de síntesis. Finalmente, el orden Pseudanabaenales (línea azul) que no presenta ningún genoma sintetizador. La línea naranja indica los genomas que pertenecen al orden Synechococcales, donde gran parte de los genomas pertenecen a los géneros *Synechococcus* y *Prochlorococcus*, y que presentan genomas con la capacidad de síntesis de cobalamina. Sin embargo, se observan dos subclados de estos mismos géneros que no tienen la ruta completa de síntesis.

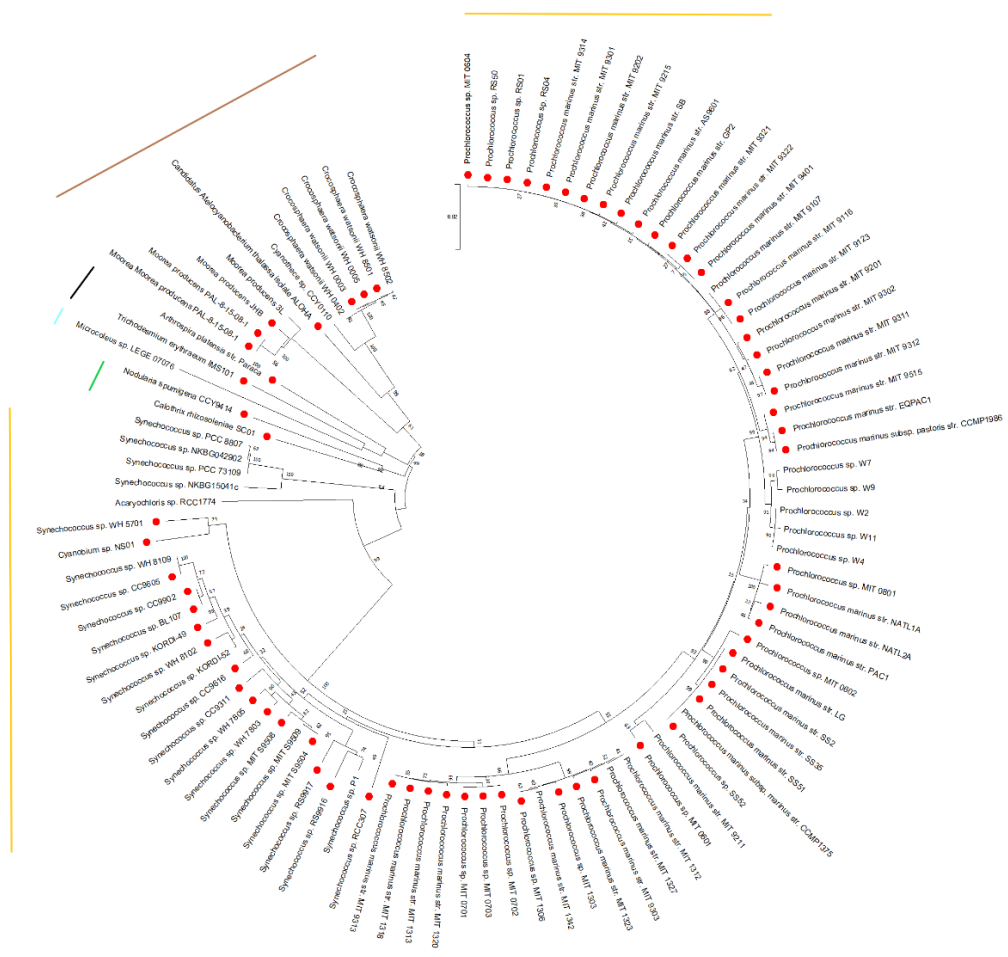


Figura 10. Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S rRNA de genomas bacterianos marinos pertenecientes al phylum Cyanobacteria (97 secuencias) disponibles en la base de datos SILVA. El valor de Bootstrap en los nodos indica el porcentaje de identidad basado en distancias genéticas. Círculo rojo sí sintetizan vitamina B_{12} . Línea café indica el orden Chroococcales; línea negra indica el orden Oscillatoriales; línea azul indica el orden Pseudanabaenales; línea verde indica el orden Nostocales y línea amarilla indica el orden Synechococcales.

La comparación del tamaño de los genomas bacterianos pertenecientes al phylum Cyanobacteria que sintetizan y no sintetizan B₁₂ (Figura 11 y Tabla 6), mostró que el tamaño promedio de los genomas que no sintetizan B₁₂ es mayor (2 948 179 pb) que los que sí tienen esta capacidad (2 717 350 pb). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($P > 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney).

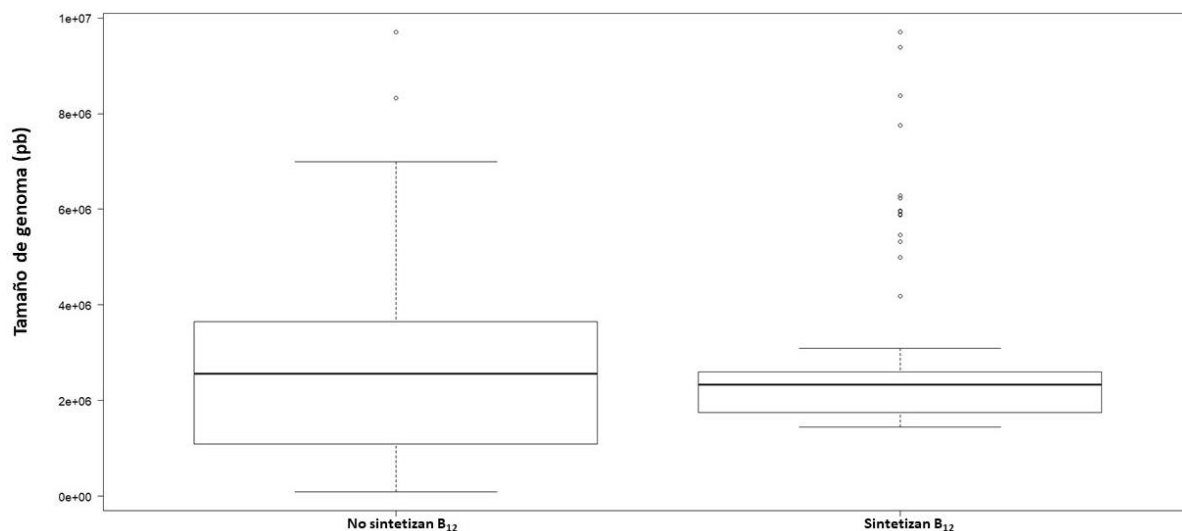


Figura 11. Tamaño de genoma (pb) con y sin capacidad de síntesis de los genomas bacterianos marinos del phylum Cyanobacteria disponibles en la base de datos IMG. Lado izquierdo no sintetizan B₁₂ y derecho sí sintetizan B₁₂. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney) en los tamaños de genomas entre sintetizadores y no sintetizadores de B₁₂.

3.1.2.2.2 Resumen de características de los genomas del phylum Cyanobacteria

- Aproximadamente el 78 % de los genomas que pertenecen a este phylum presentaron la ruta completa para la síntesis de B₁₂.
- Los microorganismos que tienen la capacidad de síntesis presentaron los genes asociados a la síntesis del anillo de corrina (de *cobI-cbiL* a *cobB-cbiA*) y los genes que finalizan la molécula de adenosilcobalamina (*cobP-cobU*, *cobS-cobV*), sin embargo, no presentaron los asociados a la síntesis de alfa ribazol (*cobU-cobT*, *cobC-phpB*).
- Más del 90 % de los genomas presentaron las enzimas RDRF y MS, las cuales requieren de B₁₂.
- En el árbol filogenético se observan las agrupaciones de dos grandes grupos, Synechococcales y Chroococcales, los cuales presentan microorganismos sintetizadores de B₁₂.
- Se determinó que el tamaño promedio de los genomas que no sintetizan B₁₂ es mayor que los que sí sintetizan, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney).

3.1.2.3 Phylum Proteobacteria

Dentro de este phylum se encuentra el mayor número de genomas que tienen los genes necesarios para la síntesis de B₁₂. Se encontró que 179 genomas tienen la ruta completa para la síntesis de cobalamina, lo cual constituye un 16 % del total de los genomas dentro de este phylum (1149), mientras que, el resto de los genomas (84 %) no tienen esa capacidad de síntesis. Se determinaron ocho clases en la base de datos, entre las cuales Alphaproteobacteria (138) y Gammaproteobacteria (40) destacan por ser las más representativas y contar con microorganismos sintetizadores (Figura 12).

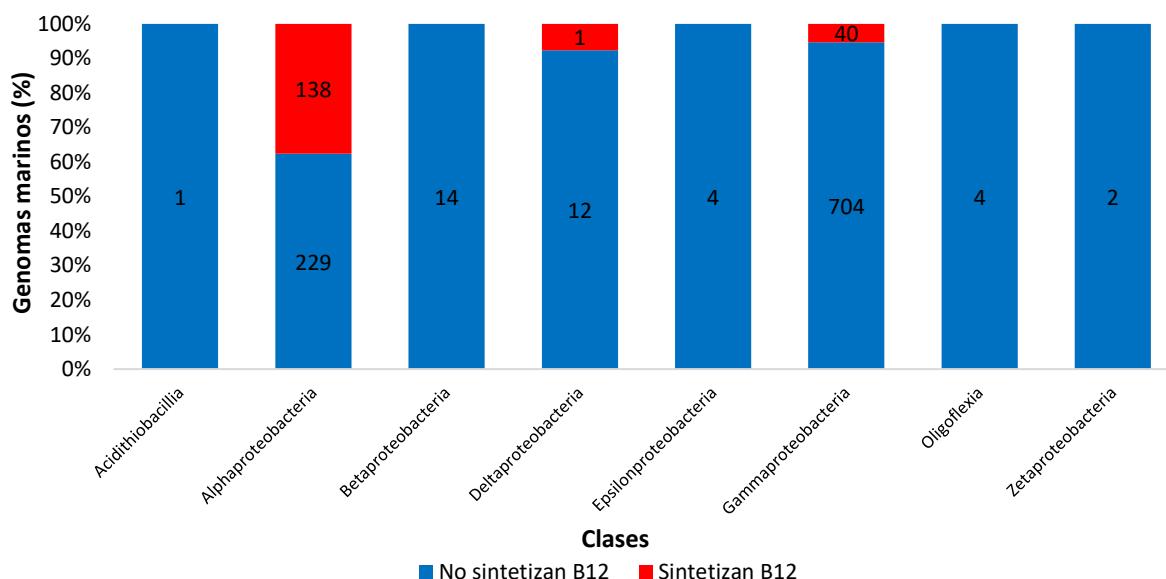


Figura 12. Genomas bacterianos marinos con y sin capacidad de síntesis de B₁₂ por clase del phylum Proteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color azul no sintetizan B₁₂ y rojo sí sintetizan B₁₂.

3.1.2.3.1 Análisis filogenético del phylum Proteobacteria

Se obtuvieron un total de 515 secuencias dentro del phylum Proteobacteria, las cuales fueron alineadas y cortadas en el software MEGA 11 (Figura 13). El árbol filogenético está conformado básicamente por dos grandes grupos, la clase Alphaproteobacteria (línea café) y la clase Gammaproteobacteria (línea azul). De igual manera, se presentan algunos genomas que pertenecen a otros phyla menos representativos en la base de datos como Epsilonproteobacteria (línea gris), Zetaproteobacteria (línea negra), Deltaproteobacteria (línea verde) y Betaproteobacteria (línea morada). En el clado de Alphaproteobacteria se agrupan gran parte de los genomas que presentan la capacidad de sintetizar vitamina B₁₂ (círculo rojo), algunos de ellos son *Epibacterium mobile*, *Roseobacter* sp., *Phaeobacter gallaeciensis*, entre otros.

Mientras que, dentro de esta misma clase se agrupa *Candidatus Pelagibacter* sp., los cuales no presentan la capacidad de sintetizar B₁₂. Por otro lado, en el clado de Gammaproteobacteria se presentan sólo ciertos microorganismos que sintetizan B₁₂, entre ellos se encuentran *Oleiphilus* sp. y *Pseudomonas* sp., mientras que gran parte de los genomas que se encuentran agrupados dentro de esta clase no presentan la capacidad de síntesis como los géneros *Vibrio*, *Alteromonas*, y *Pseudoalteromonas*.

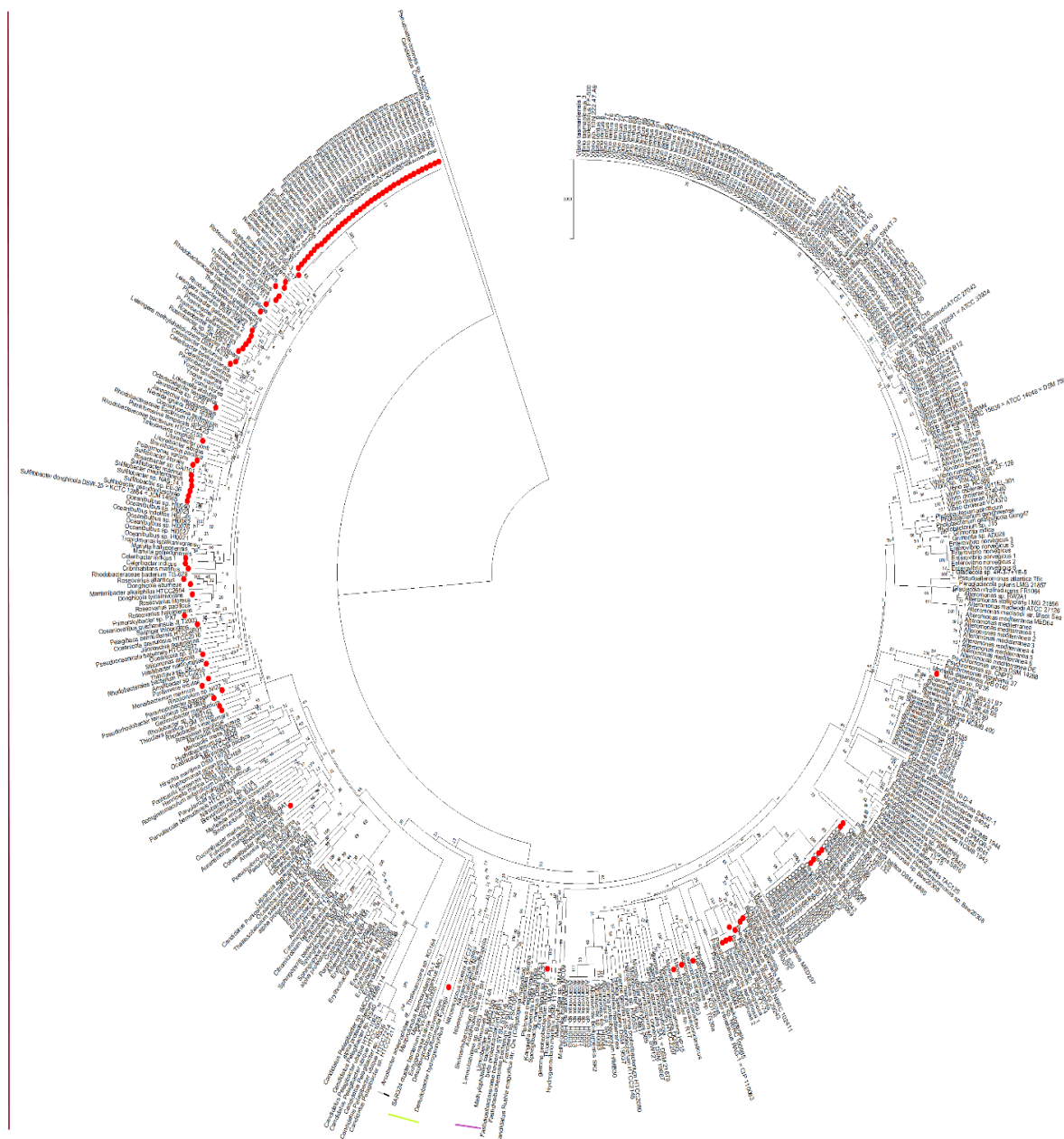


Figura 13. Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S rRNA de genomas bacterianos marinos pertenecientes al phylum Proteobacteria (515 secuencias) disponibles en la base de datos SILVA. El valor de Bootstrap en los nodos indica el porcentaje de identidad basado en distancias genéticas. Círculo rojo sí sintetizan vitamina B₁₂. Línea café indica la clase Alphaproteobacteria; línea gris indica la clase Epsilonproteobacteria; línea negra indica la clase Zetaproteobacteria; línea verde indica la clase Deltaproteobacteria; línea morada indica la clase Betaproteobacteria y línea azul indica la clase Gammaproteobacteria.

3.1.2.3.2 Clase Alphaproteobacteria

Se determinó que por arriba del 40 % de los genomas bacterianos marinos pertenecientes a esta clase presentan los genes asociados a la síntesis del anillo de corrina (de *cobI-cbiL* a *cobQ-cbiP*), a excepción del gen *cbiD*, que solo se presentó en ciertos genomas (~27 %) y los genes *cbiK-cbiX*, los cuales no se encontraron en ninguno de los genomas (Figura 14). Por otro lado, más del 70 % de los genomas presentaron los genes asociados a la síntesis de alfa ribazol (*cobU-cobT*, *cobC-phiB*) y a la parte final de la ruta de síntesis de adenosilcobalamina (*cobP-cobU*, *cobS-cobV*), los cuales forman parte de la vía de salvamiento.

Las principales enzimas dependientes de B₁₂ encontradas en los genomas de la clase Alphaproteobacteria fueron ribonucleótido difosfato reductasa (100 %), metionina sintasa (~95 %) y metilmalonil CoA mutasa (~93 %) (Figura 15). Por otro lado, las enzimas etanolamina amonio liasa, propanediol deshidratasa, metilaspártato mutasa y metilaspártato amonio-liasa se presentaron en menos del 10 % de los genomas.

Se comparó el tamaño de los genomas bacterianos pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria que sintetizan y no sintetizan B₁₂ (Figura 16 y Tabla 7). Se obtuvo que el tamaño promedio de los genomas que sintetizan B₁₂ es mayor (4 416 016 pb) que los que no tienen esta capacidad (3 804 557 pb). Esta diferencia fue significativa ($P < 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney).

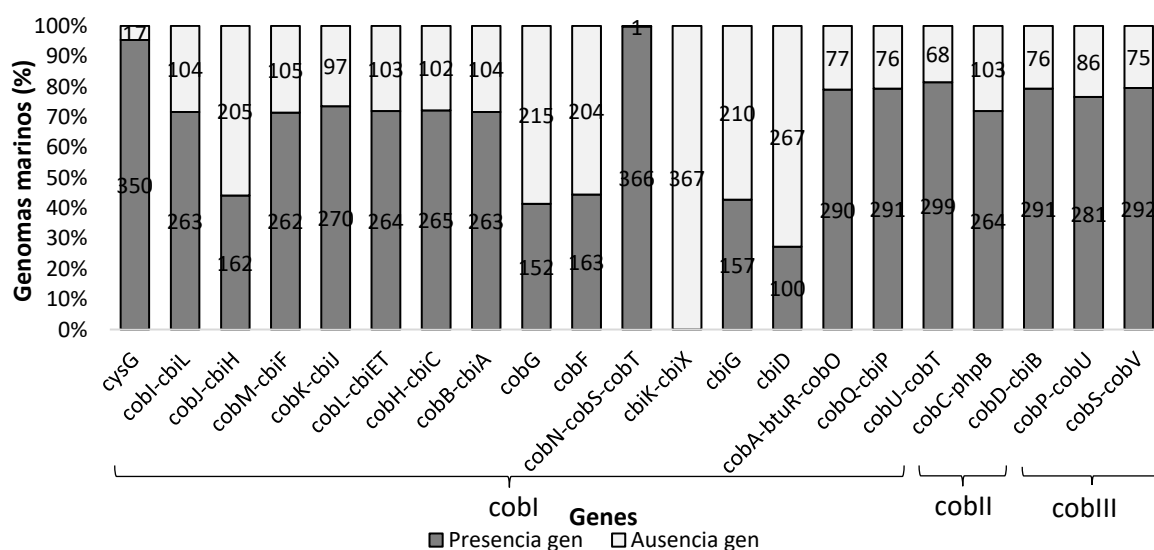


Figura 14. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B₁₂ en genomas bacterianos marinos de la clase Alphaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes *cobI* encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes *cobII* encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes *cobIII* finaliza la síntesis de adenosilcobalamina.

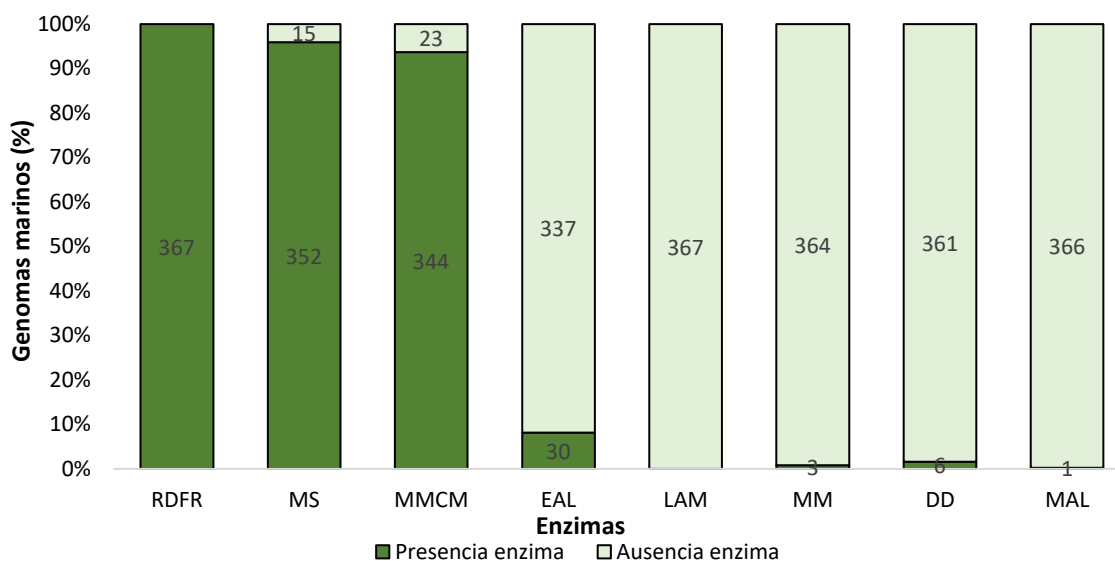


Figura 15. Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en genomas bacterianos marinos de la clase Alphaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDFR: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa.

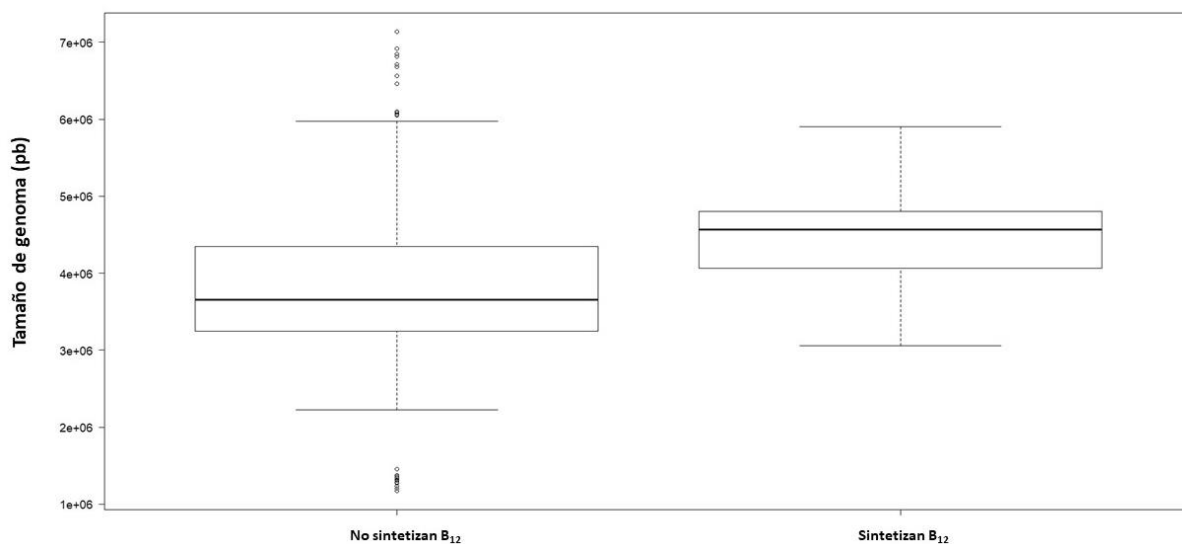


Figura 16. Tamaño de genoma (pb) con y sin capacidad de síntesis de los genomas bacterianos marinos de la clase Alphaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Lado izquierdo no sintetizan B₁₂ y derecho sí sintetizan B₁₂. Las diferencias observadas fueron significativas ($P < 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney) en los tamaños de genomas entre sintetizadores y no sintetizadores de B₁₂.

3.1.2.3.3 Clase Gammaproteobacteria

Menos del 15 % de los genomas dentro de esta clase presentaron los genes necesarios para la síntesis del anillo de corrina (de *cobI-cbiL* a *cobQ-cbiP*) aunque el 38 % de los genomas presentaron los genes *cobN-*

cobS-cobT y más del 70 % presentaron los genes en donde comienza la vía de salvamiento (*cobA-btuR-cobO* y *cobQ-cbiP*) (Figura 17). Por otro lado, aproximadamente el 48 % de los genomas presentaron los genes asociados a la síntesis de alfa ribazol (*cobU-cobT*, *cobC-phpB*), y más del 50 % de los genomas los genes asociados a la parte final de la síntesis de adenosilcobalamina (*cobP-cobU*, *cobS-cobV*).

Se determinó que más del 90 % de los genomas pertenecientes a esta clase presentan las enzimas RDRF y MS (Figura 18). Mientras que, cerca del 22 % de los genomas presentan la enzima EAL y menos del 10% las enzimas MMCM, MM, DD y MAL.

Se comparó el tamaño de los genomas bacterianos pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria que sintetizan y no sintetizan B₁₂ (Figura 19 y

Tabla 8). Se observó que el tamaño promedio de los genomas que sintetizan B₁₂ es mayor (4 863 424 pb) que los que no tienen esta capacidad (4 560 693 pb). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P > 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney).

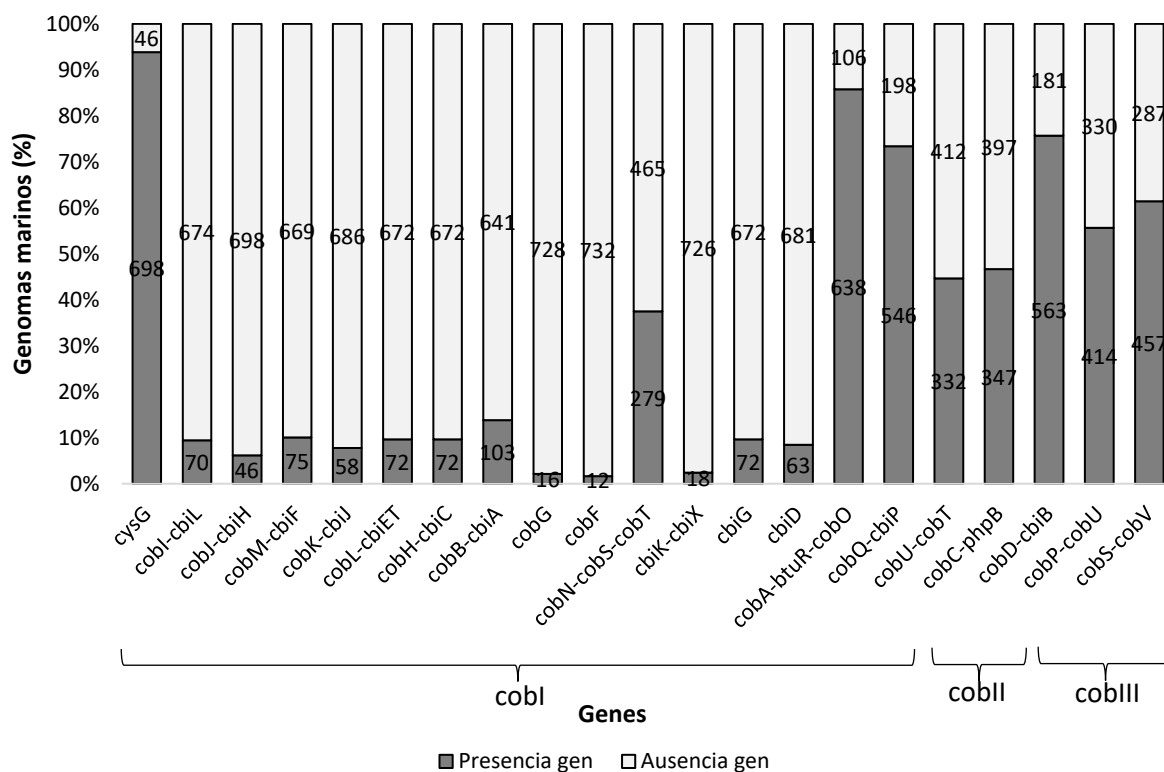


Figura 17. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B₁₂ en genomas bacterianos marinos de la clase Gammaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes *cobI* encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes *cobII* encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes *cobIII* finaliza la síntesis de adenosilcobalamina.

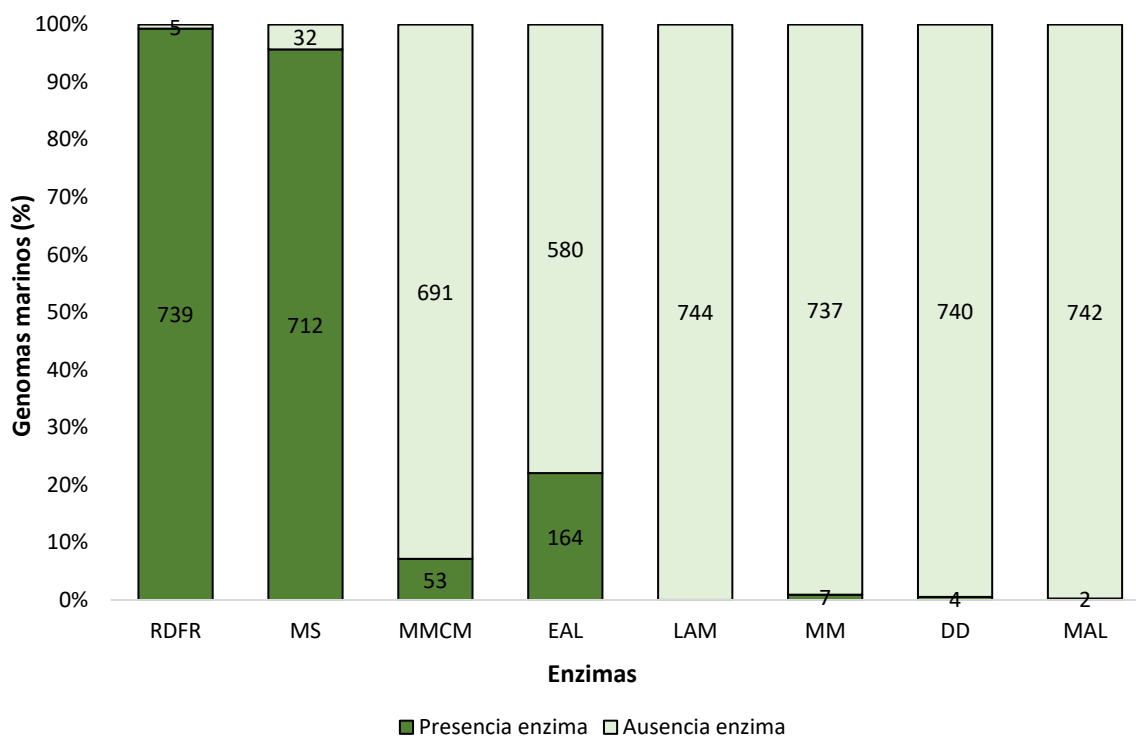


Figura 18. Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en genomas bacterianos marinos de la clase Gammaproteobacteria disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDFR: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa.

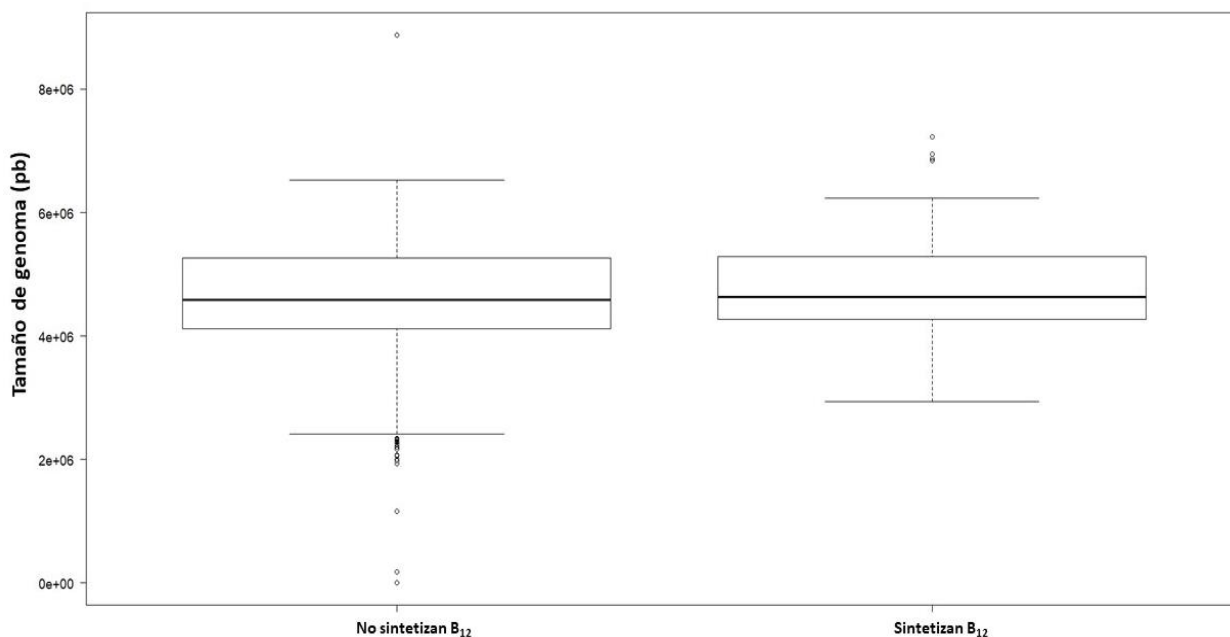


Figura 19. Tamaño de genoma (pb) con y sin capacidad de síntesis de los genomas bacterianos marinos de la clase Gammaproteobacteria, disponibles en la base de datos IMG. Lado izquierdo no sintetizan B₁₂ y derecho sí sintetizan B₁₂. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney) en los tamaños de genomas entre sintetizadores y no sintetizadores de B₁₂.

3.1.2.3.4 Resumen de características de los genomas del phylum Proteobacteria

- En este phylum se presentó la mayor cantidad de genomas de toda la base de datos (1149).
- Se encontraron ocho clases, de las cuales las más representativas en la base de datos fueron Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria. La primera, es la clase con el mayor número de genomas sintetizadores de B₁₂ (138, ~36 %).
- El árbol filogenético estuvo conformado principalmente por dos grandes agrupaciones, las clases Alpha- y Gammaproteobacteria.
- En los genomas que pertenecen a la clase Alphaproteobacteria se determinó que más del 40 % presentaron algunos de los genes asociados a la síntesis del anillo de corrina (de *cobI-cbiL* a *cobQ-cbiP*), mientras que, más del 70 % presentaron los genes asociados a la síntesis de alfa ribazol (*cobU-cobT* y *cobC-phpB*) y los asociados a la parte final de la síntesis de adenosilcobalamina (*cobD-cbiB*, *cobP-cobU* y *cobS-cobV*). Por otro lado, en estos genomas las principales enzimas dependientes de B₁₂ reportadas fueron RDFR, MS y MMCM.
- En los genomas pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria se determinó que menos del 15 % tienen algunos de los genes asociados a la síntesis del anillo de corrina (*cobI-cbiL* a *cobQ-cbiP*), sin embargo, más del 40 % presentan alguno de los genes que finalizan la síntesis del anillo de corrina que pertenecen a la vía de salvamiento (*cobA-btuR-cobO* y *cobQ-cbiP*), los genes asociados a la síntesis de alfa ribazol (*cobU-cobT* y *cobC-phpB*) y los asociados a la parte final de la síntesis de adenosilcobalamina (*cobD-cbiB*, *cobP-cobU* y *cobS-cobV*). Por otro lado, dentro de esta clase se presentaron principalmente las enzimas RDFR y MS.
- Dentro de la clase Alphaproteobacteria se determinó que el tamaño promedio de los genomas que sintetizan B₁₂ es mayor que los que no sintetizan, además, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney).
- Dentro de la clase Gammaproteobacteria se determinó que el tamaño promedio de los genomas que sintetizan B₁₂ es mayor que los que no sintetizan, sin embargo, esa diferencia no fue significativa ($P > 0.05$; prueba no paramétrica U Mann-Whitney).

3.1.3 Patrones de distribución de la capacidad de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ en los genomas pertenecientes al dominio Archaea aislados de ambientes marinos

En algunos de los genomas marinos que pertenecen al dominio Archaea (~40 %) se identificaron gran parte de los genes para la síntesis *de novo* de adenosilcobalamina (Figura 20). Sin embargo, sólo un genoma

presentó todos los genes necesarios. Los genes que se ausentan en todos los genomas son *cobK-cbiJ*, *cobG*, *cobF* y también los genes *cobU-cobT* y *cobC-phiB*, los cuales se encargan de la síntesis del ligando bajo. Por otro lado, en estos genomas se presentaron enzimas que requieren de cobalamina (Figura 21). La enzima RDR se encuentra en más del 90 % de los genomas; mientras que, la enzima MMCM en un 78 % de los genomas. Las enzimas MS, MM y MAL se presentaron en menos del 25 % de los genomas pertenecientes a este dominio.

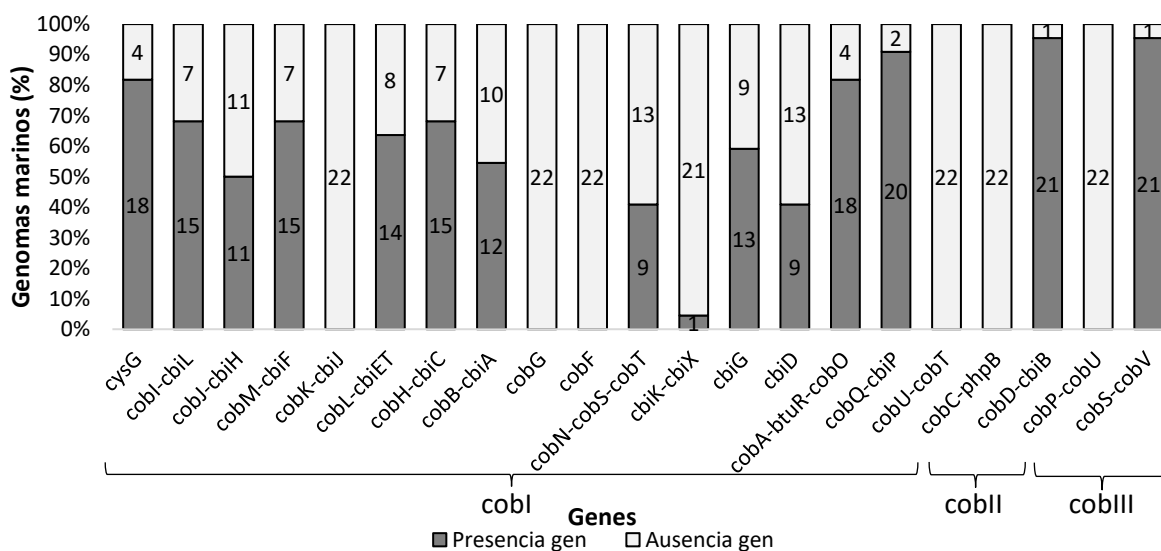


Figura 20. Presencia de genes involucrados en la ruta de síntesis de B₁₂ en genomas marinos del dominio Archaea disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color gris presenta el gen y blanco no presenta el gen. Grupo de genes *cobI* encargados de la síntesis del anillo de corrina; grupo de genes *cobII* encargados de la síntesis de alfa ribazol y grupo de genes *cobIII* finaliza la síntesis de adenosilcobalamina.

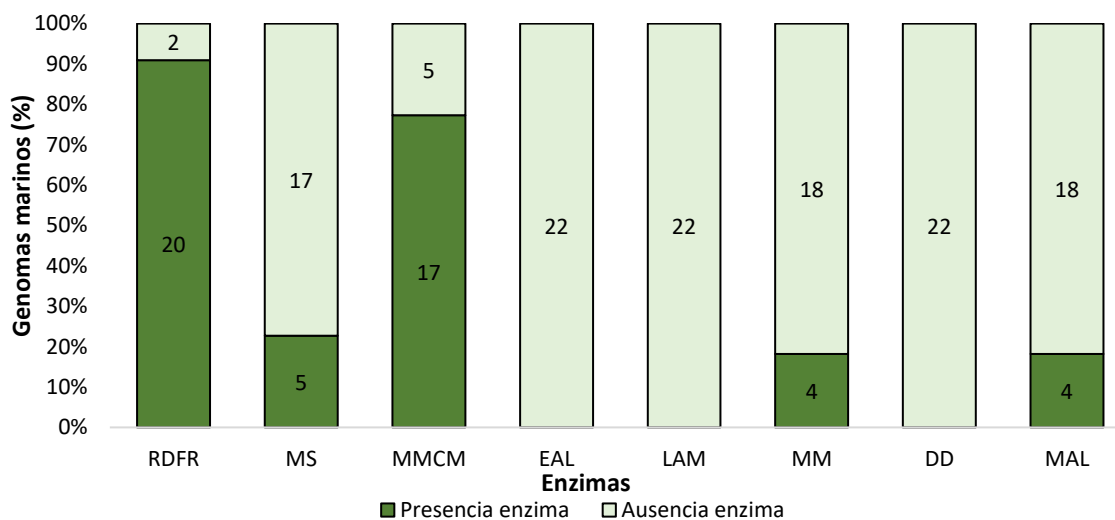


Figura 21. Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en genomas marinos del dominio Archaea disponibles en la base de datos IMG. Los números en las barras indican el número de genomas. Color verde oscuro presenta la enzima y verde claro no presenta la enzima. RDRF: Ribonucleótido difosfato reductasa; MS: Metionina sintasa; MMCM: Metilmalonil CoA mutasa; EAL: Etanolamina amonio-liasa; LAM: Beta-lisina 5,6-aminomutasa; MM: Metilaspártato mutasa; DD: Propanediol deshidratasa; MAL: Metilaspártato amonio-liasa.

3.1.3.1 Análisis filogenético del dominio Archaea

Se obtuvieron un total de 12 secuencias dentro del dominio Archaea, las cuales fueron alineadas y cortadas en el software MEGA 11 (Figura 22). El árbol filogenético está conformado por el phylum Euryarchaeota (línea roja) donde se encuentran los géneros *Thermococcus*, *Halobaculum*, *Haloferax*, *Halococcus* y *Haloarcula*; el phylum Thaumarchaeota (línea verde), que presenta algunos microorganismos como *Candidatus Nitrosopelagicus brevis*, *Candidatus Nitrosopumilus sp.*, y *Candidatus Nitrosomarinus catalina*. Por último, se encontró un representante del phylum Crenarchaeota (línea azul), la especie *Hyperthermus butylicus*.

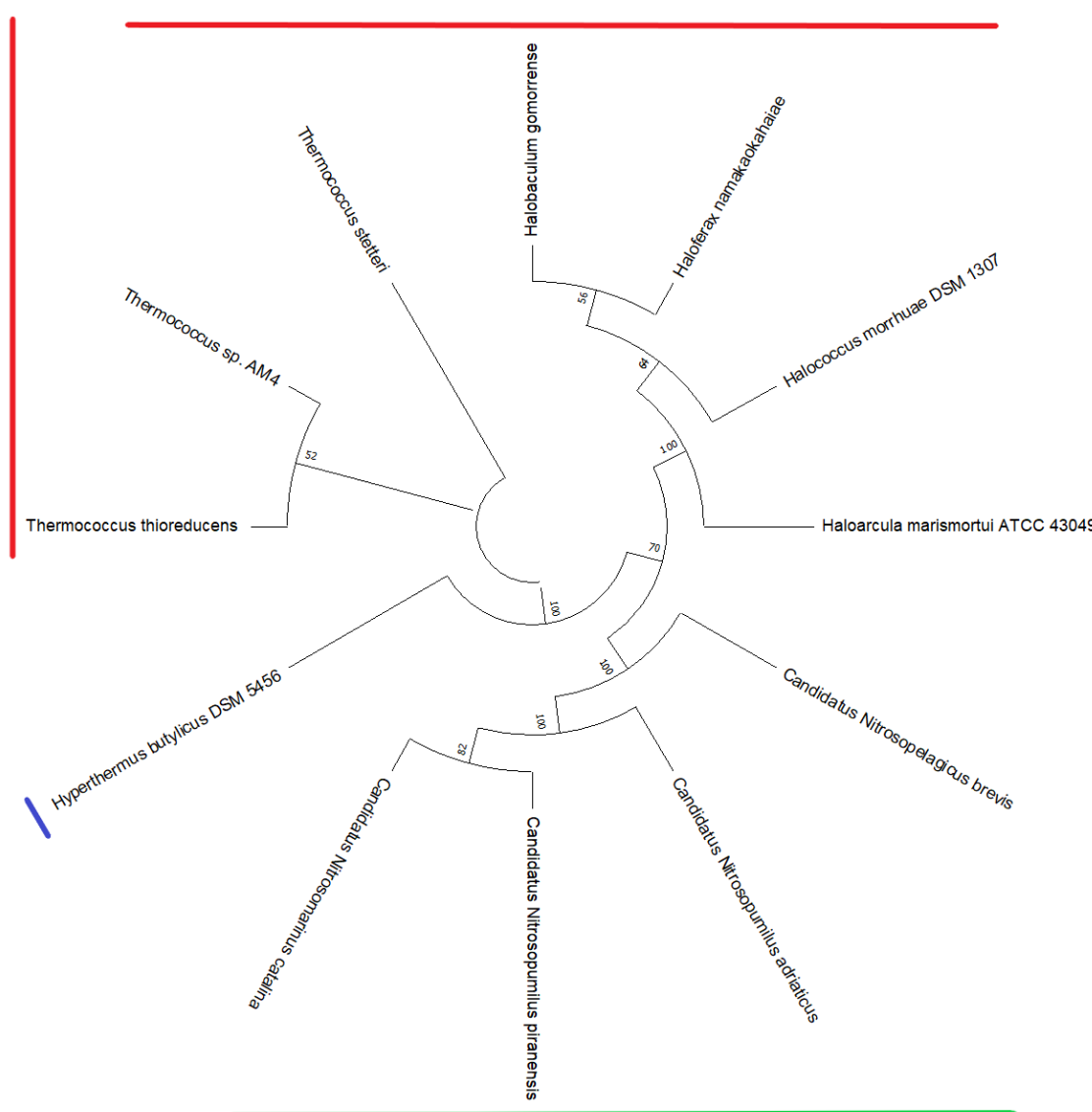


Figura 22. Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S rRNA de genomas marinos pertenecientes al dominio Archaea (12 secuencias) disponibles en la base de datos SILVA. El valor de Bootstrap en los nodos indica el porcentaje de identidad basado en distancias genéticas. Línea roja indica el phylum Euryarchaeota; línea verde indica el phylum Thaumarchaeota y línea azul indica el phylum Crenarchaeota.

3.1.3.2 Resumen de características de los genomas del dominio Archaea

- Alrededor del 40 % de los genomas de este dominio presentaron gran parte de la ruta de síntesis de B₁₂. Sin embargo, sólo un genoma presentó todos los genes.
- Ningún genoma presentó los genes *cobK-cbiJ* y los asociados a la síntesis de alfa ribazol (*cobU-cobT* y *cobC-phpB*).
- Más del 90 % de los genomas presenta la enzima RDRF.
- El árbol filogenético está conformado principalmente por el phylum Euryarchaeota.

3.2 Variabilidad de la expresión de genes de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ asociado a los cambios temporales y a la estructura de la comunidad microbiana

Partiendo de los datos reportados por Gifford et al. (2014) y Gómez-Consarnau et al. (2018) en la Isla de Sapelo, EUA, se analizaron los transcritos asociados a síntesis (Sin-B₁₂) y dependencia (Dep-B₁₂) de B₁₂. A su vez, estos fueron normalizados con respecto al total de transcritos de cada una de las muestras, con la finalidad de presentar la expresión relativa de estos genes. Se relacionó la expresión relativa de genes de B₁₂ con las concentraciones de clorofila de cada uno de los muestreos (Figura 23). En verano 2008 la expresión relativa de genes relacionados con la vitamina B₁₂ fue menor en el día 1 (Sin-B₁₂: 0.027 %; Dep-B₁₂: 0.096 %) que en la noche 1 (Sin-B₁₂: 0.041 %; Dep-B₁₂: 0.098 %), mientras que la concentración de clorofila en agua de mar fue mayor para el día 1 (14.52 µg L⁻¹) que para la noche 1 (10.71 µg L⁻¹). Por otro lado, en otoño 2008 se observó menor expresión relativa de genes en el día 1 (Sin-B₁₂: 0.024 %; Dep-B₁₂: 0.074 %) que en la noche 1 (Sin-B₁₂: 0.041 %; Dep-B₁₂: 0.118 %), mientras que la concentración de clorofila fue mayor en el día 1 (11.07 µg L⁻¹) que en la noche 1 (8.55 µg L⁻¹). Sin embargo, para el día 2 la expresión relativa de genes de síntesis aumentó (0.045 %), mientras que la de dependencia disminuyó (0.108 %) y la concentración de clorofila aumentó (10.53 µg L⁻¹). Por otra parte, para el día 1 de invierno 2009 se observó la mayor expresión relativa de genes de esta estación (Sin-B₁₂: 0.044 %; Dep-B₁₂: 0.164 %), las cuales coinciden con la mayor concentración de clorofila de todos los muestreos (23.63 µg L⁻¹), sin embargo, la expresión relativa de genes disminuyó en la noche 1 (Sin-B₁₂: 0.025 %; Dep-B₁₂: 0.078 %) al igual que la clorofila (6.13 µg L⁻¹). Por otro lado, para el día 2 la expresión relativa de genes de vitamina B₁₂ aumentó (Sin-B₁₂: 0.041 %; Dep-B₁₂: 0.124 %) al igual que la clorofila (12.53 µg L⁻¹). Para el día 1 de primavera 2009 la expresión relativa de genes de síntesis fue de 0.054 %, la expresión relativa de genes de dependencia

fue de 0.176 % y la concentración de clorofila fue de $15.71 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que, para el día 2 la clorofila aumentó ($21.01 \mu\text{g L}^{-1}$) pero la expresión relativa de genes disminuyó (Sin-B₁₂: 0.039 %; Dep-B₁₂: 0.089 %). Por último, en el verano 2009 la expresión relativa de genes se mantuvo constante en los tres diferentes muestreos (Sin-B₁₂: rango de 0.048 a 0.054 %; Dep-B₁₂: rango de 0.164 a 0.183 %), sin embargo, las concentraciones de clorofila sí cambiaron entre el día 1 ($19.28 \mu\text{g L}^{-1}$), la noche 1 ($10.8 \mu\text{g L}^{-1}$) y el día 2 ($16.32 \mu\text{g L}^{-1}$). Estas diferencias en la expresión relativa de genes entre muestreos fueron significativas ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis).

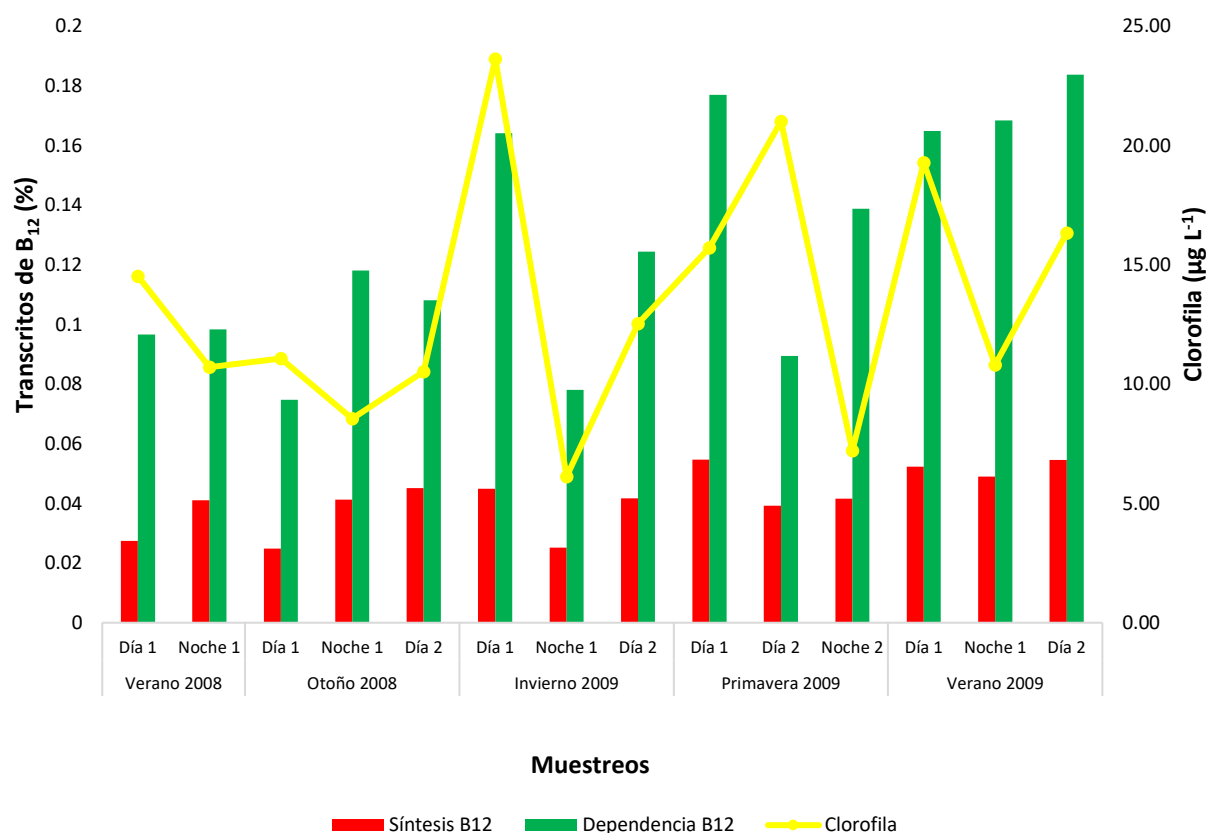


Figura 23. Expresión relativa de genes de B₁₂ (%) y concentraciones de clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$) por muestreo. Las barras de color rojo representan los transcritos asociados a síntesis de B₁₂ y las barras de color verde representan los transcritos asociados a dependencia de B₁₂; la línea amarilla indica las concentraciones de clorofila a . Si se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de genes entre los muestreos ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis) realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA.

Se observaron diferentes grupos taxonómicos con expresión relativa de genes de síntesis y de dependencia de B₁₂ en todos los muestreos (Tabla 9). Sin embargo, aquí se presentan únicamente los órdenes que comúnmente forman parte del bacterioplancton y que, además, contribuyeron en mayor porcentaje a esa

expresión de genes en estos muestreos. En cuanto a la expresión relativa de genes de síntesis (Figura 24), se determinó que en el verano 2008 durante el día 1 y la noche 1, el orden Rhodobacterales es el que presentó mayor porcentaje de transcritos (0.0065 y 0.0098 %, respectivamente), seguido de Chroococcales (0.0026 y 0.0068 %, respectivamente); por otro lado, la expresión relativa de genes por parte de Nitrosopumilales fue de aproximadamente 0.0014 %. Para otoño 2008 disminuyeron los transcritos de Chroococcales (<0.0013 %) y Nitrosopumilales (<0.00014 %) en los diferentes muestreos, mientras que el orden Rhodobacterales se mantuvo como el taxón con más transcritos de la estación (0.009-0.018 %). En el invierno 2009 durante el día 1 y el día 2 el orden Rhodobacterales presentó transcritos de 0.019 y 0.016 %, respectivamente, mientras que para la noche 1 los transcritos disminuyeron (0.01 %). Por otra parte, en la primavera 2009 volvió a ser relevante la expresión relativa de genes por parte de Chroococcales en el día 1 (0.002 %) y en el día 2 (0.007 %), además, Rhodobacterales presentó mayor expresión relativa de genes en el día 1 (0.02 %). Por último, para el verano 2009 el orden Chroococcales generó mayor expresión relativa de genes (0.015 %) que los Rhodobacterales (0.011 %) para el día 1, mientras que los transcritos por parte de Nitrosopumilales volvieron a ser relevantes en la noche 1 de este verano (0.0034 %).

El orden Rhodobacterales dominó gran parte de los transcritos asociados a dependencia de B₁₂ (Figura 25), a excepción del día 1 del verano 2008 en donde Nitrosopumilales generó mayor expresión relativa de genes (0.016 %) que los Rhodobacterales (0.015 %). Para el otoño 2008 el orden Rhodobacterales presentó más transcritos durante el día 2 (0.036 %), mientras que Chroococcales presentó menos de 0.00026 %. El orden Flavobacteriales presentó mayor expresión relativa de genes de dependencia (>0.0013 %) comparado con la expresión relativa de genes de síntesis (<0.0003 %). Para el invierno 2009 el orden Rhodobacterales se mantuvo con la mayor expresión relativa de genes (>0.025 %) en los días y noches muestreadas. Flavobacteriales presentó su mayor expresión relativa de genes de dependencia de todo el año en el día 1 de esta estación (0.01 %). Para primavera 2009 el orden Rhodobacterales generó su mayor expresión relativa de genes de la estación durante el día 1 (0.052 %), mientras que, Flavobacteriales presentó su máximo en la noche 2 (0.006 %) y Chroococcales en el día 2 (0.004 %). En el verano 2009 el orden Nitrosopumilales siguió el mismo patrón que con los transcritos de síntesis, durante esta estación volvió a contribuir en la expresión relativa de genes en la noche 1 (0.022 %), mientras que, para el día 1 y el día 2 se mantuvo (0.007 %). Por otro lado, el orden Chroococcales presentó mayor expresión relativa de genes durante el día 1 (0.014 %) seguido del día 2 (0.007 %), mientras que, Rhodobacterales se mantuvo entre 0.023 a 0.024 % durante el día 1 y noche 1, aunque aumentó para el día 2 (0.03 %).

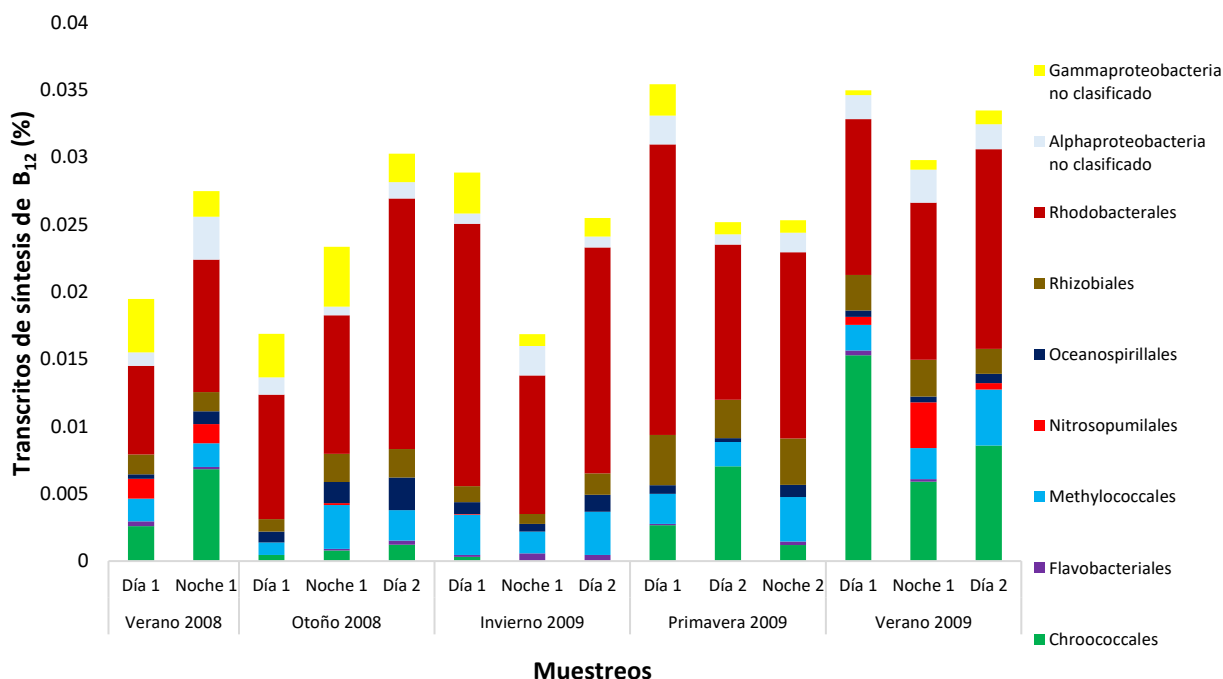


Figura 24. Expresión relativa de genes de síntesis de B₁₂ (%) por orden y muestreo. Las barras de colores indican los principales órdenes que forman parte del bacterioplancton en el océano y que fueron representativos en todos los muestreos. Los Rhodobacterales son los que presentan un mayor porcentaje de transcritos de síntesis de B₁₂ en la mayoría de los muestreos realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA.

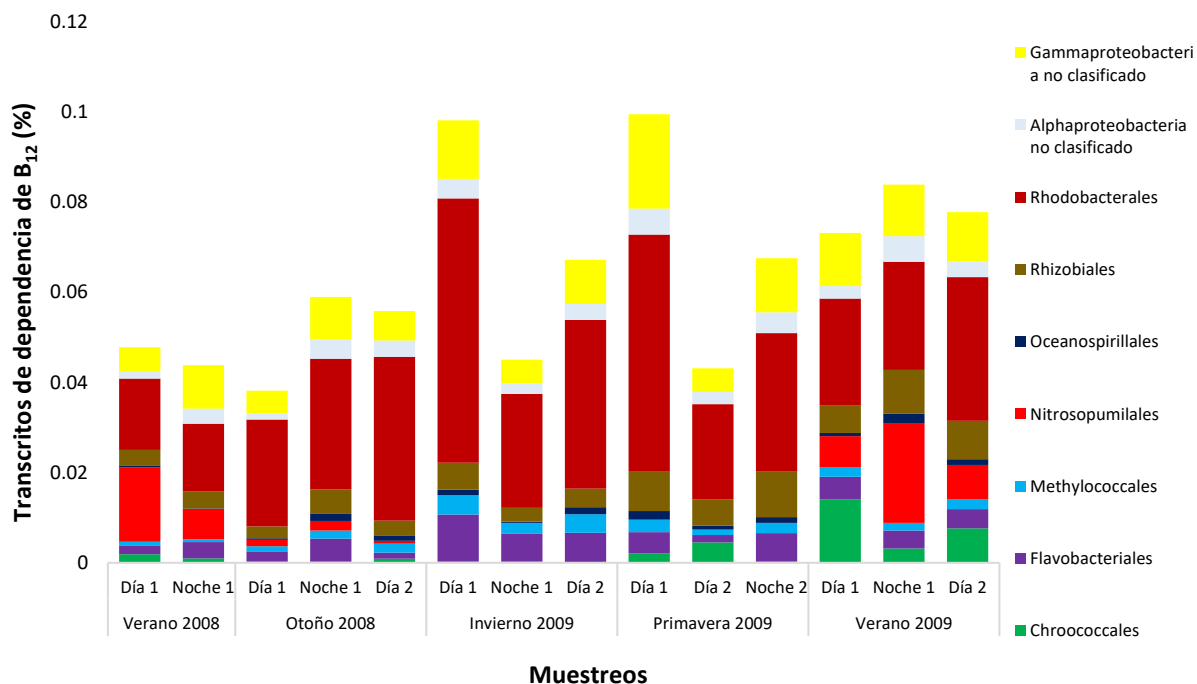


Figura 25. Expresión relativa de genes de dependencia de B₁₂ (%) por orden y muestreo. Las barras de colores indican los principales órdenes que forman parte del bacterioplancton en el océano y que fueron representativos en todos los muestreos. Los Rhodobacterales son los que presentan un mayor porcentaje de transcritos de dependencia de B₁₂ en la mayoría de los muestreos realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Patrones de distribución de la capacidad de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ en los genomas de procariontes aislados de ambientes marinos disponibles en la base de datos IMG.

En este trabajo se analizaron 1626 genomas de procariontes marinos disponibles en bases de datos en línea, en donde se obtuvo que únicamente el 18 % tienen la ruta de síntesis de vitamina B₁₂ completa. Sin embargo, aunque se reportaron genomas que no tienen la capacidad de síntesis de B₁₂, se observó que la mayoría de ellos (1615) sí presentan enzimas que requieren de esta vitamina.

Particularidades en la presencia de genes involucrados en la síntesis y salvamiento de vitamina B₁₂ en los diferentes phyla. Se analizó la ruta de síntesis de los grupos taxonómicos más representativos en el ecosistema marino y que abarcaron gran parte de la base de datos genómica. Estos genomas pertenecen a los phyla Bacteroidetes, Cyanobacteria, Proteobacteria (órdenes Alpha- y Gammaproteobacteria) y al dominio Archaea. Se determinó que los phyla Proteobacteria y Cyanobacteria presentan genomas con mayor capacidad de síntesis de B₁₂, mientras que sólo un genoma perteneciente al dominio Archaea presentó todos los genes necesarios según si se aplica el mismo criterio. Sin embargo, algunos genomas de este dominio presentaron parte de la ruta y es que a pesar de no presentar los genes *cobG*, *cobF*, *cobNST* y *cobP-cobU*, según la literatura podrían ser capaces de sintetizar vitamina B₁₂ (Doxey et al., 2015). De igual manera, los genes *cobK-cbiI*, esenciales para la síntesis del anillo de corrina en bacterias, no son necesarios para la síntesis de B₁₂ dentro de Archaea (Doxey et al., 2015). Si los genomas presentan los genes *cbiA-cobB*, *cbiC-cobH* o *cobT*, es posible que tengan la capacidad de producir cobalamina (Doxey et al., 2015), ya que algunos genomas que pertenecen a este dominio se han reportado con esa capacidad en otros trabajos (Doxey et al., 2015; Heal et al., 2017). Por otro lado, el phylum Bacteroidetes no presentó la capacidad de síntesis, lo cual es característico de este grupo bacteriano (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014).

Se observó que al menos el 70 % de los genomas pertenecientes a cada uno de estos taxones presenta el gen *cysG*, el cual codifica para una enzima encargada de convertir uroporfirinógeno III a precorrina 2. Sin embargo, esta enzima se presentó en genomas que no tienen la síntesis *de novo*. Esto sugiere que al ser una enzima multifuncional no necesariamente la utilizan para la síntesis de B₁₂, y en su lugar puede ser utilizada para la síntesis de sirohemo, el cual es un precursor para la síntesis de hemo (Warren et al., 2002).

Se determinó que los genes *cobG* y *cobF*, los cuales son específicos de la vía aerobia, no están presentes en ninguno de los genomas pertenecientes a los phyla Bacteroidetes, Cyanobacteria y al dominio Archaea. Esto puede estar asociado a que aquellos organismos que sintetizan B₁₂ dentro de estos grupos la realizan por la vía anaerobia, incluso en presencia de oxígeno. Organismos como *Rhodobacter capsulatus* pueden crecer ya sea por la vía aerobia o anaerobia, aunque no tengan el gen *cobG* pero sí los genes *cobN* y *cobF* (Raux et al., 2000). Por otro lado, el complejo de genes *cobNST* se presentó en al menos un genoma de los grupos más representativos, lo cual sugiere que la mayoría de los organismos estudiados realizan la inserción de cobalto por la vía aerobia.

Los genomas del phylum Cyanobacteria presentaron genes pertenecientes a la vía anaerobia para la síntesis de B₁₂. Se hipotetiza que estos microorganismos realizan la síntesis de cobalamina por esta vía desde antes de que existiera la fotosíntesis oxigénica y la siguen manteniendo en la actualidad (Heal et al., 2017).

Se observó que los genes asociados a la parte de la ruta donde comienza la vía de salvamiento (*cobA-btuR-cobO* y *cobQ-cbiP*) están presentes en todos los phyla por arriba del 70 % de los genomas de cada grupo, a excepción del phylum Bacteroidetes, para el que se reportaron menos del 10 % de los genomas con estos genes. Presentar estos genes puede ser una ventaja para aquellos organismos incapaces de sintetizar cobalamina *de novo*, ya que los transportadores pueden incorporar moléculas de corrina o precursores siempre y cuando estén disponibles en el ambiente. Esta vía es una manera más efectiva para obtener cobalamina en cuanto a costo energético (Bertrand et al., 2015).

La síntesis del ligando bajo, en este caso de DMB, es una de las últimas reacciones en la síntesis de adenosilcobalamina, la cual es catalizada por los genes *cobU* o *cobT* y *cobC* o *phpB* y también las bacterias pueden obtenerla a través de la vía de salvamiento o remodelación (Raux et al., 2000; Fang et al., 2017). Estos genes se presentaron en genomas del phylum Bacteroidetes y de las clases Alpha- y Gammaproteobacteria, lo cual es relevante ya que fueron de los genes más reportados dentro de estos taxones. Aquellos genomas que no pueden producir B₁₂ pero sí presentan la capacidad de síntesis del ligando bajo, podrían armar la molécula de cobalamina al incorporar el anillo de corrina o compuestos degradados de cobalamina por la vía de salvamiento (Bertrand et al., 2015; Heal et al., 2017; Sokolovskaya et al., 2020). Por otro lado, los genomas del dominio Archaea no presentaron estos genes, lo cual coincide con lo reportado en otro estudio (Heal et al., 2017), quienes mencionan que este grupo posiblemente adquiere el ligando bajo por medio de otra vía.

En el phylum Cyanobacteria sólo un genoma presentó los genes *cobU-cobT* y otros 10 genomas los genes *cobC-phpB*. Este phylum no presenta los genes para la síntesis de alfa ribazol debido a que utilizan adenina como ligando bajo. A esa variación de la molécula de cobalamina producida por estos organismos se le denomina pseudocobalamina (Heal et al., 2017). Se ha determinado que algunas células fitoplanctónicas como *C. reinhardtii* y *P. lutheri* pueden remodelar la pseudocobalamina incorporando DMB exógeno (Helliwell et al., 2016). Sin embargo, el phylum Cyanobacteria es independiente y tiene una ventaja competitiva ya que solo produce y consume pseudocobalamina, por lo que no depende de otros organismos sintetizadores (Heal et al., 2017).

Las bacterias heterótrofas son potencialmente la fuente más importante de B₁₂ en el medio marino, incluso superando a las cianobacterias (Heal et al., 2017). Sin embargo, aquellas bacterias que no tienen la capacidad de síntesis *de novo* pero sí los genes asociados a la síntesis de alfa ribazol pueden obtener cobinamidas exógenas, eliminar el ligando bajo y reemplazarlo con otro que contenga una base más apropiada (Smith et al., 2018). Incluso se han detectado ligandos bajos como DMB y alfa ribazol en distintos ambientes, por lo cual, se sugiere que también pueden ser adquiridos por la vía de salvamiento en aquellos microorganismos que no tienen los genes para la síntesis del ligando bajo (Sokolovskaya et al., 2020). Sin embargo, la disponibilidad de cobinamidas exógenas depende de los distintos nichos ecológicos, demandas enzimáticas e interacciones entre otros organismos dependientes de cobalamina (Heal et al., 2017; Sokolovskaya et al., 2020; Wienhausen et al., 2022).

El último paso para la síntesis de adenosilcobalamina y que también forma parte de la ruta de salvamiento es catalizado por los genes *cobP-cobU* y *cobS-cobV*, los cuales son los encargados de activar y finalizar la síntesis de esta molécula (Warren et al., 2002). Estos genes se encontraron en gran parte de los genomas de los principales taxones analizados, incluso en aquellos que no tienen la capacidad de síntesis completa, lo cual puede estar asociado a que tengan la capacidad de activar y finalizar la molécula por la vía de salvamiento o remodelación.

En resumen, el análisis genómico y filogenético realizado en este trabajo sugiere que los principales grupos sintetizadores de B₁₂ en el medio marino son el phylum Cyanobacteria, principalmente los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus*, la mayoría de los miembros de las clases Alpha- y Gammaproteobacteria, y el dominio Archaea. Por otro lado, los procariotas que se caracterizan por no tener la capacidad de síntesis de B₁₂ pertenecen a Bacteroidetes, algunos miembros de la clase Gammaproteobacteria (96 % de los genomas analizados) como *Vibrio* sp. y de la clase Alphaproteobacteria (62 % de los genomas analizados), como el clado SAR11 (Wienhausen et al., 2022). El clado SAR11 es

caracterizado por ser de los más abundantes en el océano (Giovannoni et al., 2005), aunque se ha demostrado que no tienen la capacidad de síntesis ni la dependencia de B₁₂. Sin embargo, requieren para su crecimiento compuestos con sulfuro, los cuales pueden obtener a través de la metionina, y este a su vez, puede ser suplementado por bacterias y eucariotas (Wienhausen et al., 2022). Se sugiere que el aporte exógeno de esta molécula, la cual es utilizada en el metabolismo central, pudo generar la pérdida de los genes de B₁₂ en SAR11 (Jin et al., 2022).

Se hipotetiza que la disponibilidad de B₁₂ en el ambiente, asociado al costo metabólico que involucra su síntesis, han dirigido a una pérdida de la ruta de B₁₂. Se sugiere que los genomas que tienen la capacidad de síntesis y los que poseen la vía de salvamiento están en proceso de la pérdida de la ruta completa (Shelton et al., 2019; Jin et al., 2022).

En todos los grupos taxonómicos analizados se observó la presencia de genes asociados a la vía de salvamiento o remodelación. Esto es relevante para el ecosistema marino, porque, aunque sólo exista una pequeña parte de la comunidad microbiana que sintetiza esta vitamina, hay una gran parte de ella que no la produce, pero tiene los genes asociados a esta vía alterna. Con esto se puede sugerir que en el océano existen i) organismos sintetizadores que además pueden tomar esta vitamina del medio para abaratar costos energéticos de síntesis, ii) organismos que dependen de que haya compuestos degradados de cobalamina para incorporarlos por la vía de salvamiento y iii) organismos que requieren completamente de una fuente exógena de B₁₂. Sin embargo, poco se conoce sobre el funcionamiento de la vía de salvamiento o remodelación y las moléculas intermediarias o precursoras de cobalamina que se pueden incorporar a través de esta vía (Sokolovskaya et al., 2020). Futuras investigaciones tendrán que dirigirse hacia el estudio de este mecanismo y la disponibilidad de esas moléculas en el ecosistema.

Presencia de enzimas dependientes de B₁₂ en los diferentes phyla. La enzima ribonucleótido difosfato reductasa (RDFR) se presentó en más del 90 % de los genomas analizados de cada grupo. Es posible que en los genomas en que no se presentó esta enzima se adquieran ribonucleótidos reducidos disponibles en el ambiente o a través de otra vía no dependiente de B₁₂ (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014), como lo puede ser la presencia de otra clase de ribonucleótido reductasas.

La enzima metionina sintasa (MS) se presentó en más del 90 % de los genomas de cada grupo taxonómico, a excepción de los genomas que pertenecen al dominio Archaea (~22 %), lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Zhang et al., 2009). Por otro lado, el phylum Cyanobacteria presentó únicamente las enzimas ribonucleótido reductasa y metionina sintasa, lo cual puede estar asociado a que este grupo utiliza

únicamente pseudocobalamina. La metionina sintasa que utiliza Cyanobacteria posee una estructura que enlaza de preferencia a la pseudocobalamina en lugar de cobalamina (Heal et al., 2017).

La enzima metilmalonil CoA mutasa (MMCM) se presentó en los genomas del phylum Bacteroidetes (~95 %), de la clase Alphaproteobacteria (~93 %) y del dominio Archaea (76 %). Sin embargo, en la clase Gammaproteobacteria (~7 %) y el phylum Cyanobacteria (~1 %) la presencia de esta enzima fue sólo en ciertos genomas, por lo que es posible que esta enzima no sea esencial para el metabolismo en gran parte de estos dos taxones.

Existen otras enzimas que dependen de adenosilcobalamina y que son importantes en el proceso de fermentación, como diol deshidratasa, etanolamina amonio liasa, aminomutasas, entre otros, las cuales catalizan reacciones que involucran la migración de un grupo amino o hidroxilo (Banerjee & Ragsdale, 2003; Gruber et al., 2011). Sin embargo, estas enzimas se presentaron únicamente en algunos genomas de la base de datos, lo cual puede indicar que pertenecen a un nicho específico poco común en el ecosistema marino y son utilizadas como una vía alternativa en el metabolismo y en la degradación de carbono (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014).

La B₁₂ es cofactor de más de 20 enzimas en bacterias (Croft et al., 2006), mientras que, en organismos eucariotas únicamente es cofactor de las enzimas MS, MMCM y RDFR (Zhang et al., 2009; Helliwell, 2017). Sin embargo, en este trabajo se identificaron ocho enzimas dependientes de cobalamina y en casi todos los genomas estudiados se observó la presencia de al menos una de ellas. Además, se observó que gran parte de los genomas de los principales grupos taxonómicos que no tienen la capacidad de síntesis presentan al menos uno de los genes asociados a la vía de salvamiento o remodelación de B₁₂ (Tabla 10). Esto puede sugerir que, al menos en estos genomas, la mayoría de ellos requiere de una fuente exógena de vitamina y la vía de salvamiento podría ser la vía mayormente empleada para la obtención de B₁₂.

Tamaño de genomas con relación a la presencia de los genes necesarios para la síntesis de B₁₂. Los genomas que pertenecen a la clase Alphaproteobacteria y tienen la capacidad de síntesis de B₁₂ presentaron un tamaño significativamente mayor que aquellos que no tienen esa capacidad. Esto sugiere que la auxotrofia de esta vitamina, al menos en los genomas de esta clase, puede estar relacionada a genomas más pequeños. Realizar la síntesis de vitamina B₁₂ implica mayor costo metabólico que adquirirla de una fuente exógena, por lo cual, muchos microorganismos obtienen una ventaja evolutiva tomando la B₁₂ que hay disponible en el ambiente. Esto implica una pérdida de los genes para la síntesis y con ello la reducción del tamaño del genoma disminuyendo su costo en la replicación genómica y obteniendo una

ventaja selectiva, siempre y cuando haya suficiente vitamina disponible en el ambiente (Shelton et al., 2019; Sultana et al., 2023).

4.2 Patrones de expresión de genes de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ asociados a los cambios temporales y a la estructura de la comunidad microbiana

En este trabajo se utilizaron datos obtenidos de Gómez-Consarnau et al. (2018) en donde reportan información de metatranscriptómica de muestras ambientales, con la finalidad de identificar patrones en la transcripción de genes de síntesis y dependencia de las vitaminas B₁, B₆, B₇ y B₁₂ en una comunidad microbiana marina. Sin embargo, este trabajo se ha enfocado a estudiar con mayor detalle los patrones de expresión de genes de síntesis y dependencia de B₁₂ asociados a la comunidad microbiana y a los cambios estacionales y circadianos.

La expresión de genes de síntesis y dependencia de B₁₂ de toda la comunidad estuvieron relacionados, ya que en la mayoría de los casos se observó que al aumentar los transcritos de síntesis, los de dependencia de igual manera aumentaban ($r = 0.88$, $p < 0.05$, $R^2 = 0.77$). Con esto se puede determinar que existe requerimiento de B₁₂ por gran parte de la comunidad procariota (Figura 26). Por otro lado, en la Figura 27 se presentan los principales grupos taxonómicos reportados en este trabajo con su expresión relativa de genes de síntesis y dependencia de B₁₂, comparados con la comunidad total (puntos negros en las Figura 26Figura 27). Para casi todos los grupos que se reportan en la Figura 27 se presentan valores de las pendientes menores a 1 (entre 0.1 y 0.32), lo cual indica que la expresión de genes de dependencia de B₁₂ es siempre mayor a la de síntesis. Por otro lado, si comparamos las pendientes de los grupos concretos con la pendiente de la comunidad total, podemos observar que ciertos grupos muestran pendientes más altas a la media (e.g., Chroococcales, Rhizobiales y Rhodobacterales). Por ejemplo, en el orden Chroococcales (Figura 27a) se observa la mayor pendiente (1.05) en la regresión lineal, comparado con los demás grupos taxonómicos. Esto puede indicar que la expresión de genes de síntesis es mayor que la de dependencia de B₁₂ y, por ende, existe una mayor producción de esta vitamina que la que consume este grupo. Por lo cual, la B₁₂ podría quedar disponible para otros miembros de la comunidad microbiana. Sin embargo, para poder utilizar la forma química de la vitamina B₁₂ sintetizada por los Chroococcales, se requieren los genes asociados a la remodelación de pseudocobalamina para así poder utilizarla en sus respectivos metabolismos (Helliwell et al., 2016; Heal et al., 2017).

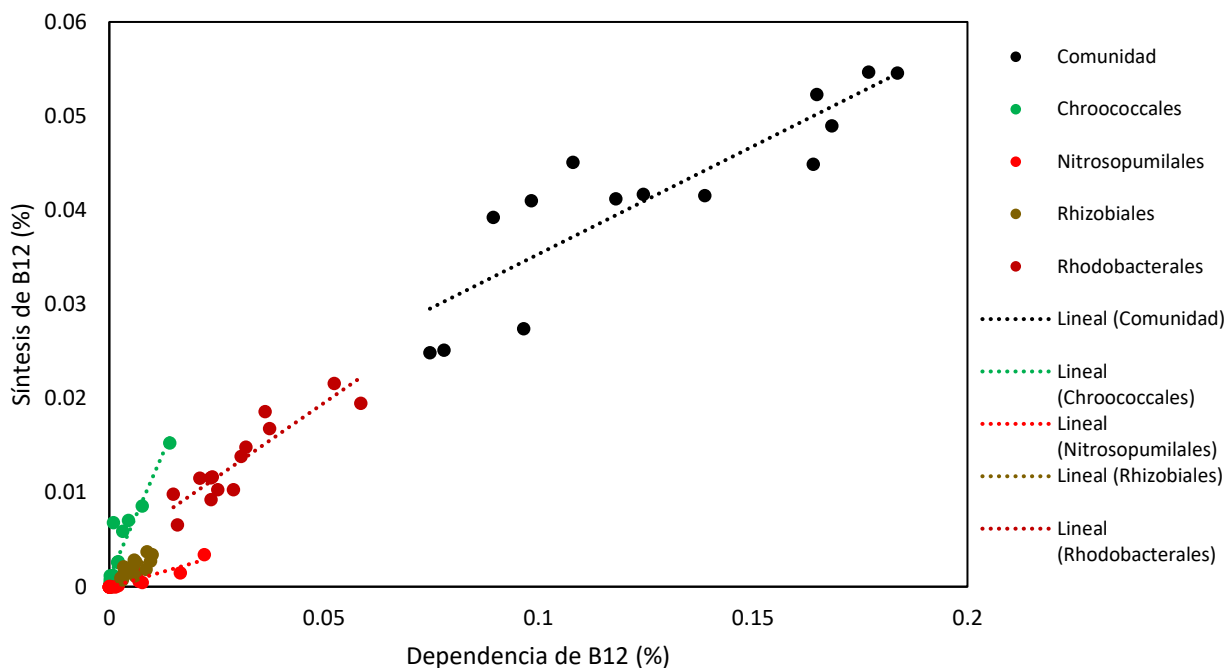


Figura 26. Expresión relativa de genes de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ (%) de los diferentes grupos taxonómicos microbianos en todos los muestreos realizados en Isla Sapelo. La línea punteada indica la recta de la regresión lineal; el color negro indica toda la comunidad microbiana; el color verde indica el orden Chroococcales; el color rojo indica orden Nitrosopumilales; el color café indica el orden Rhizobiales y el color vino indica el orden Rhodobacterales.

Organismos dominantes en la síntesis y dependencia de B₁₂ a lo largo del año. El orden Rhodobacterales dominó la expresión relativa de genes de síntesis y dependencia de B₁₂ en casi todos los muestreos. Esto es diferente a lo reportado en otro estudio (Bertrand et al., 2015) donde identificaron en el Océano del Sur (i.e., Océano Antártico) a un miembro del orden Oceanospirillales como el organismo con mayor expresión de genes de síntesis. Sin embargo, a pesar de que se han demostrado como importantes productores de cobalamina en aguas superficiales en otros trabajos (Joglar et al., 2021) en el presente trabajo el orden Oceanospirillales fue menos abundante y por tanto sintetizó menos transcritos de síntesis de B₁₂ que Rhodobacterales.

Utilizando estos mismos muestreos cerca de la isla de Sapelo, se ha reportado a *Roseobacter* como el grupo dominante (Gifford et al., 2013), el cual es un género dentro del orden Rhodobacterales. Este género suele predominar durante y después de florecimientos algales, en los cuales se han identificado distintas especies que son epibiontes del fitoplancton e intercambian diversos compuestos como B₁₂ y materia orgánica disuelta (Wagner-Döbler et al., 2010; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Cruz-López et al., 2018). Se observó que en invierno al aumentar la expresión relativa de genes de síntesis y de dependencia de B₁₂

también aumentó la clorofila. En otro estudio (Bertrand et al., 2015), se reportó al orden Oceanospirillales con expresión de genes asociados a la utilización de compuestos orgánicos junto a los de síntesis de B₁₂, por lo que es posible que haya habido una relación simbiótica entre el fitoplancton y este grupo de bacterias.

Patrones invernales. En el invierno hubo un mayor incremento de la expresión relativa de genes, lo cual puede estar asociado a que los microorganismos tienen una habilidad para utilizar sustratos refractarios o más complejos, a diferencia de aquellos compuestos lábiles disponibles cuando existe mayor producción primaria, ya que, en otros trabajos (Gifford et al., 2014) reportan una disminución en la producción primaria y disponibilidad de nutrientes en esta época del año. Los grupos bacterianos más representativos reportados en invierno fueron los Rhodobacterales y Flavobacteriales. Este último pertenece al phylum Bacteroidetes, los cuales se caracterizan por ser un grupo importante en la degradación de materia orgánica compleja y por estar ampliamente asociados a los florecimientos algales (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Schreier et al., 2023). Aunque en este trabajo la expresión relativa de genes de B₁₂ por parte de este grupo taxonómico fue menor, comparada con otros órdenes, sí se presentaron en gran parte de los muestreos de acuerdo con lo reportado en el total de transcritos de la comunidad (Figura 29).

Se observó una mayor expresión relativa de genes de dependencia que de síntesis de B₁₂ por parte de los Flavobacteriales, esto coincide con lo reportado por otro trabajo (Joglar et al., 2021), donde este orden presentó la mayor expresión de genes de dependencia de B₁₂ en sus experimentos de mesocosmos. Esto remarca la incapacidad de los Flavobacteriales para sintetizar esta vitamina y sus altos requerimientos de ella. Sin embargo, en el presente análisis se observó la máxima expresión relativa de genes de dependencia por parte de Flavobacteriales cuando sucede el florecimiento algal de invierno, lo cual puede sugerir que hay una alta demanda por esta vitamina.

Patrones primaverales. En la primavera, al aumentar la temperatura se observa la máxima producción primaria en este ecosistema. Esto ocasiona un incremento en la concentración de materia orgánica disuelta, beneficiando a los principales grupos bacterianos asociados a florecimientos algales. Además, en esta época del año hay mayor disponibilidad de nutrientes inorgánicos, mayores tasas de respiración y de abundancias bacterianas, lo cual sugiere que existe una rápida utilización de la materia y energía (Gifford et al., 2014). En esta estación se observó un patrón inverso entre la clorofila y la expresión relativa de genes en el día 2 y la noche 2, ya que durante el día la clorofila fue mayor y disminuyó para la noche, mientras que, la expresión relativa de genes fue menor en el día, pero aumentó en la noche. Esto puede estar asociado a que algunos grupos bacterianos, como los Flavobacteriales, incrementan su abundancia

cuando comienza el decaimiento del florecimiento algal, ya que aprovechan la materia orgánica disuelta que es liberada por el fitoplancton (Teeling et al., 2012; Williams et al., 2013). Por otro lado, el orden Rhodobacterales se mantuvo como el más abundante en esta estación del año y para el día 1 se observa una mayor abundancia por parte de este grupo, el cual coincide con un aumento en las concentraciones de clorofila. Asimismo, la abundancia de Chroococcales aumenta durante estos muestreos posiblemente asociado al cambio estacional en donde hay una mayor radiación solar, la cual beneficia a este grupo de microorganismos a realizar la actividad fotosintética.

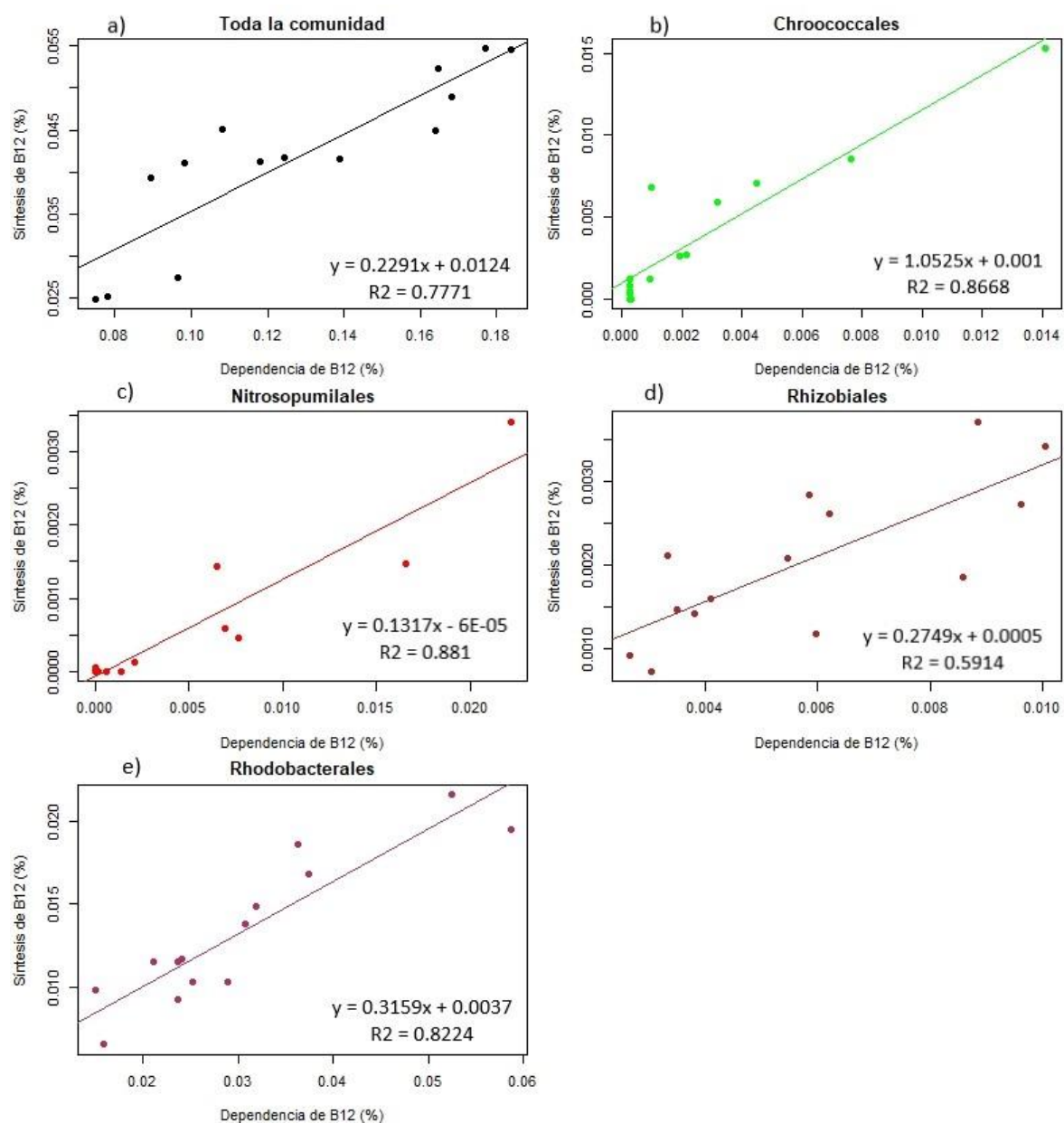


Figura 27. Expresión relativa de genes de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ (%) de los diferentes grupos taxonómicos microbianos en todos los muestreos realizados en Isla Sapelo. Cada gráfica presenta su recta de la regresión lineal con su respectiva ecuación y valor de R². a) toda la comunidad microbiana; b) orden Chroococcales; c) orden Nitrosopumilales; d) orden Rhizobiales; e) orden Rhodobacterales.

Patrones veraniegos. En el verano 2008 los microorganismos respondieron a un ambiente más productivo (mayor disponibilidad de nutrientes inorgánicos, producción primaria y bacteriana), mientras que en el verano 2009 se reportaron mayores tasas de producción bacteriana, concentraciones celulares y menos nutrientes, de acuerdo con lo reportado por otros autores en estos mismos muestreos (Gifford et al., 2014). En ambos veranos se identificó al dominio Archaea como uno de los grupos taxonómicos más representativos, sin embargo, Rhodobacterales se mantuvo como el más dominante a excepción del día 1 del 2008 y la noche 1 del 2009 en cuanto a los genes de dependencia. Esto puede deberse a que durante esta época del año se presentan eventos de resuspensión del fondo marino que pueden llevar a superficie nutrientes esenciales para que estos microorganismos crezcan (Gifford et al., 2014). Se reportó en ambos veranos la presencia de los microorganismos *Nitrosopumilus maritimus* y *Cenarchaeum symbiosum*, pertenecientes al dominio Archaea, para los cuales encontraron una gran expresión de genes relacionados a fósforo, nitrógeno, azufre y transportadores (Gifford et al., 2011). Los autores sugieren que estos microorganismos obtuvieron estos nutrientes disponibles en el ambiente y que la población estaba creciendo activamente al realizar el muestreo de verano 2008. Por otro lado, este dominio se caracteriza por presentar miembros con un papel importante en la oxidación de amonio (Hollibaugh et al., 2011). Cabe indicar que las concentraciones de este compuesto son variables en esta zona, particularmente en los veranos, lo cual puede ser característico de este ambiente costero (Gifford et al., 2013).

Se ha reportado que el dominio Archaea es importante sintetizador de cobalamina (Heal et al., 2017). Sin embargo, la expresión relativa de genes de síntesis y dependencia de B₁₂ de arqueas en estos muestreos se presentaron principalmente en los veranos, por lo que estos organismos podrían ser una fuente importante de cobalamina en esas épocas del año.

El orden Chroococcales perteneciente al phylum Cyanobacteria expresó mayormente genes de síntesis que de dependencia. La expresión relativa de genes de síntesis fue principalmente en los veranos, aunque en el 2009 fue mayor, incluso mayor que Rhodobacterales en el día 1. Se ha reportado que las cianobacterias producen grandes cantidades de vitamina B₁₂ y algunas de ellas como *Trichodesmium* y *Crocospaera* son fijadoras de nitrógeno (Bonnet et al., 2010). Además, se ha reportado que las cianobacterias prefieren como fuente de nitrógeno al amonio, la cual es la forma inorgánica del nitrógeno más reducida y disponible para su asimilación (Muro-Pastor & Florencio, 2003). En los veranos se presentan las mayores concentraciones de amonio en este sistema costero (Gifford et al., 2014), por lo cual, es posible que este grupo taxonómico se haya beneficiado de la disponibilidad de amonio y sea por ello que son más representativos en ésta época del año, al igual que Nitrosopumilales. Asimismo, el

aumento de transcritos de síntesis y dependencia de B₁₂ en los veranos por parte de este phylum puede estar asociado a un incremento de la población de cianobacterias.

Patrones diurnos. Las principales diferencias reportadas en la expresión relativa de genes fueron entre estaciones, ya que entre días y noches muestreadas no se observaron grandes cambios. Sin embargo, el orden Chroococcales presentó mayor expresión relativa de genes en la noche del verano 2008 a diferencia del día. Esto puede estar asociado a que durante el día, estos organismos expresan genes asociados a la actividad fotosintética y fijación de carbono, mientras que en la noche, la expresión de genes está relacionada al ciclo celular y replicación del ADN (Poretsky et al., 2009; Ottesen et al., 2013). Por otro lado, sólo en las noches de los veranos se observó mayor expresión relativa de genes por parte de Rhodobacterales. Gifford et al. (2014) determinaron que durante el día los genes expresados fueron los relacionados al crecimiento, reparación y generación de energía, mientras que en la noche fueron los relacionados al metabolismo central, transportadores ABC y al proceso de fotosíntesis aeróbica anoxigénica (bacterioclorofila, biosíntesis de carotenoides, proteínas, etc). La mayoría de las bacterias heterótrofas estructuran sus actividades para genes de transporte y procesos metabólicos en la noche, mientras que en el día se enfocan en crecer y conservar energía (Gifford et al., 2014).

El intercambio de compuestos entre grupos bacterianos y el fitoplancton puede que sea mayor durante el día, debido a que es cuando hay una mayor actividad por parte del fitoplancton y por ende las interacciones entre estos dos grupos de microbios marinos sea más intensa (Gifford et al., 2014). Es posible que la expresión de genes por parte de organismos que son auxótrofos de B₁₂ sigan el mismo patrón que aquellos organismos encargados de sintetizar esta vitamina (Gómez-Consarnau et al., 2018).

Organismos principales en la síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ en otros ambientes. Este trabajo explora la expresión de genes de síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ mediante el análisis metatranscriptómico de muestras ambientales recolectadas en Isla Sapelo, en el cual se demuestra que dicha expresión es llevada a cabo por diferentes miembros de la comunidad procariota marina en diferentes épocas del año (Figura 28). Esto es similar a lo reportado en un estudio realizado en el mar Mediterráneo (Beauvais et al., 2023), donde se examinó la presencia de genes de síntesis de B₁₂ pero a través de muestras de metagenómica las cuales fueron tomadas mensualmente a lo largo de seis años. Los autores reportaron dominancia de genes por parte de Archaea en los inviernos, mientras que las cianobacterias *Synechococcus* y *Prochlorococcus* dominaron la expresión de genes de síntesis de B₁₂ en primavera-verano y en otoño, respectivamente. Además, reportaron una dominancia de diversos grupos de Proteobacteria en el periodo de primavera a otoño. A pesar de las diferencias encontradas en cuanto a

los grupos taxonómicos dominantes entre ese estudio y el nuestro, dado que son dos ecosistemas diferentes, ambos coinciden en que la composición taxonómica cambia con respecto a la variabilidad temporal. Esto sugiere que la expresión de estos genes, tanto de síntesis como de dependencia de B₁₂, está activamente presente en el ecosistema, aunque los microorganismos responsables de dichos procesos puedan cambiar a lo largo del año.

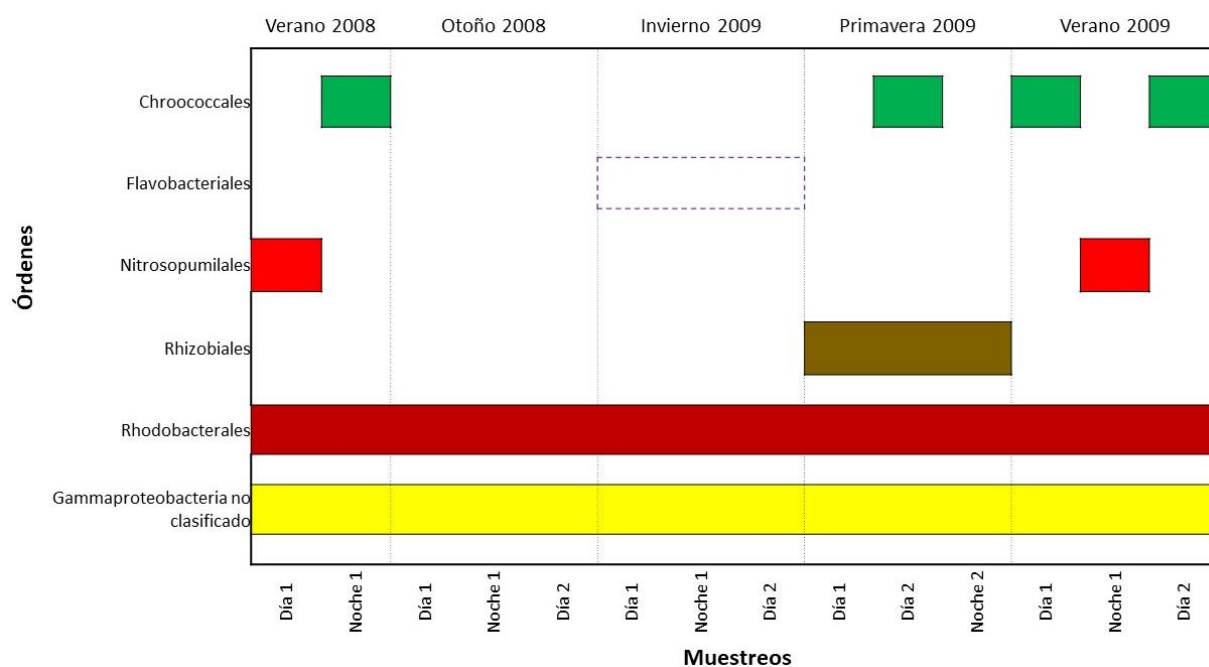


Figura 28. Panorama general ilustrativo de los órdenes más abundantes, de acuerdo con la expresión global de genes relacionados con la síntesis y dependencia de vitamina B₁₂ encontrados en los diferentes muestreos realizados en Isla Sapelo. El recuadro punteado de color morado indica al orden Flavobacteriales, el cual expresó más genes de dependencia con respecto a los de síntesis de B₁₂.

Capítulo 5. Conclusiones

El análisis genómico realizado en este trabajo determinó que sólo cierta parte de la comunidad microbiana marina tiene la capacidad de síntesis de vitamina B₁₂ y que la mayoría depende de ella. Sin embargo, aunque no todos los genomas tienen los genes necesarios para la síntesis de B₁₂, se identificaron genes asociados a la vía de salvamiento o remodelación en los genomas de los principales grupos taxonómicos del bacterioplancton. Esto sugiere que, aunque estos organismos no pueden hacer cobalamina *de novo*, supone un mayor beneficio metabólico adquirir compuestos precursores del ambiente, ya sean anillos de corrina o ligandos bajos, para sustentar sus requerimientos de B₁₂. Esto es importante en el ecosistema, la existencia de compuestos de cobalamina en proceso de degradación puede significar una fuente importante donde solo es necesario incorporar y finalizar la molécula de B₁₂.

La variabilidad estacional es un factor importante que puede determinar la sucesión de especies en el ecosistema y, por ende, generar un cambio en los patrones de expresión de genes de síntesis y dependencia de B₁₂. Esto sugiere que la dinámica en la producción y consumo de esta vitamina está activamente sucediendo a lo largo de todo el año, pero son ejecutadas por diferentes microorganismos.

En resumen, en este trabajo se contrastan dos análisis importantes para el estudio del papel que tienen las comunidades microbianas en la producción de compuestos orgánicos, la genómica y la metatranscriptómica. Se ha demostrado que existen organismos con el contenido genético para la síntesis y dependencia de B₁₂, sin embargo, la expresión de esos genes depende de diferentes factores ambientales que pueden estar afectando a que se realicen esas funciones.

Literatura citada

- Banerjee, R., & Ragsdale, S. W. (2003). The Many Faces of Vitamin B₁₂: Catalysis by Cobalamin-Dependent Enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 209-247. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161828>
- Beauvais, M., Schatt, P., Montiel, L., Logares, R., Galand, P. E., & Bouget, F. (2023). Functional redundancy of seasonal vitamin B₁₂ biosynthesis pathways in coastal marine microbial communities. *Environmental Microbiology*, 25(12), 3753-3770. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16545>
- Bertrand, E. M., McCrow, J. P., Moustafa, A., Zheng, H., McQuaid, J. B., Delmont, T. O., Post, A. F., Sipler, R. E., Spackeen, J. L., Xu, K., Bronk, D. A., Hutchins, D. A., & Allen, A. E. (2015). Phytoplankton–bacterial interactions mediate micronutrient colimitation at the coastal Antarctic Sea ice edge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(32), 9938-9943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501615112>
- Bonnet, S., Webb, E. A., Panzeca, C., Karl, D. M., Capone, D. G., & Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2010). Vitamin B₁₂ excretion by cultures of the marine cyanobacteria *Crocospaera* and *Synechococcus*. *Limnology and Oceanography*, 55(5), 1959-1964. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.5.1959>
- Brown, K. L. (2005). Chemistry and Enzymology of Vitamin B₁₂. *Chemical Reviews*, 105(6), 2075-2150. <https://doi.org/10.1021/cr030720z>
- Croft, M. T., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2006). Algae Need Their Vitamins. *Eukaryotic Cell*, 5(8), 1175-1183. <https://doi.org/10.1128/EC.00097-06>
- Cruz-López, R., Maske, H., Yarimizu, K., & Holland, N. A. (2018). The B-Vitamin Mutualism Between the Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* and the Bacterium *Dinoroseobacter shibae*. *Frontiers in Marine Science*, 5, 274. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00274>
- Doxey, A. C., Kurtz, D. A., Lynch, M. D., Sauder, L. A., & Neufeld, J. D. (2015). Aquatic metagenomes implicate Thaumarchaeota in global cobalamin production. *The ISME Journal*, 9(2), 461-471. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.142>
- D'Souza, G., Shitut, S., Preussger, D., Yousif, G., Waschina, S., & Kost, C. (2018). Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Natural Product Reports*, 35(5), 455-488. <https://doi.org/10.1039/C8NP00009C>
- Ellis, K. A., Cohen, N. R., Moreno, C., & Marchetti, A. (2017). Cobalamin-independent Methionine Synthase Distribution and Influence on Vitamin B₁₂ Growth Requirements in Marine Diatoms. *Protist*, 168(1), 32-47. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.10.007>
- Fang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B₁₂: A review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0631-y>
- Gifford, S. M., Sharma, S., Booth, M., & Moran, M. A. (2013). Expression patterns reveal niche diversification in a marine microbial assemblage. *The ISME Journal*, 7(2), 281-298. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.96>

- Gifford, S. M., Sharma, S., & Moran, M. A. (2014). Linking activity and function to ecosystem dynamics in a coastal bacterioplankton community. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00185>
- Gifford, S. M., Sharma, S., Rinta-Kanto, J. M., & Moran, M. A. (2011). Quantitative analysis of a deeply sequenced marine microbial metatranscriptome. *The ISME Journal*, 5(3), 461-472. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.141>
- Giovannoni, S. J. (2012). Vitamins in the sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), 13888-13889. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211722109>
- Giovannoni, S. J., Tripp, H. J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K. L., Baptista, D., Bibbs, L., Eads, J., Richardson, T. H., Noordewier, M., Rappé, M. S., Short, J. M., Carrington, J. C., & Mathur, E. J. (2005). Genome Streamlining in a Cosmopolitan Oceanic Bacterium. *Science*, 309(5738), 1242-1245. <https://doi.org/10.1126/science.1114057>
- Gómez-Consarnau, L., Sachdeva, R., Gifford, S. M., Cutter, L. S., Fuhrman, J. A., Sañudo-Wilhelmy, S. A., & Moran, M. A. (2018). Mosaic patterns of B-vitamin synthesis and utilization in a natural marine microbial community. *Environmental Microbiology*, 20(8), 2809-2823. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14133>
- Gruber, K., Puffer, B., & Kräutler, B. (2011). Vitamin B₁₂-derivatives—Enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. *Chemical Society Reviews*, 40(8), 4346. <https://doi.org/10.1039/c1cs15118e>
- Heal, K. R., Qin, W., Ribalet, F., Bertagnolli, A. D., Coyote-Maestas, W., Hmelo, L. R., Moffett, J. W., Devol, A. H., Armbrust, E. V., Stahl, D. A., & Ingalls, A. E. (2017). Two distinct pools of B₁₂ analogs reveal community interdependencies in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2), 364-369. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608462114>
- Helliwell, K. E. (2017). The roles of B vitamins in phytoplankton nutrition: New perspectives and prospects. *New Phytologist*, 216(1), 62-68. <https://doi.org/10.1111/nph.14669>
- Helliwell, K. E., Lawrence, A. D., Holzer, A., Kudahl, U. J., Sasso, S., Kräutler, B., Scanlan, D. J., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2016). Cyanobacteria and Eukaryotic Algae Use Different Chemical Variants of Vitamin B₁₂. *Current Biology*, 26(8), 999-1008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.041>
- Heyer, R., Schallert, K., Zoun, R., Becher, B., Saake, G., & Benndorf, D. (2017). Challenges and perspectives of metaproteomic data analysis. *Journal of Biotechnology*, 261, 24-36. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1201>
- Hollibaugh, J. T., Gifford, S., Sharma, S., Bano, N., & Moran, M. A. (2011). Metatranscriptomic analysis of ammonia-oxidizing organisms in an estuarine bacterioplankton assemblage. *The ISME Journal*, 5(5), 866-878. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.172>
- Jin, X., Yang, Y., Cao, H., Gao, B., & Zhao, Z. (2022). Eco-phylogenetic analyses reveal divergent evolution of vitamin B₁₂ metabolism in the marine bacterial family 'Psychromonadaceae'. *Environmental Microbiology Reports*, 14(1), 147-163. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13036>
- Joglar, V., Pontiller, B., Martínez-García, S., Fuentes-Lema, A., Pérez-Lorenzo, M., Lundin, D., Pinhassi, J., Fernández, E., & Teira, E. (2021). Microbial Plankton Community Structure and Function Responses

- to Vitamin B₁₂ and B₁ Amendments in an Upwelling System. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(22), e01525-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01525-21>
- Koch, F., Hattenrath-Lehmann, T. K., Goleski, J. A., Sañudo-Wilhelmy, S., Fisher, N. S., & Gobler, C. J. (2012). Vitamin B₁ and B₁₂ Uptake and Cycling by Plankton Communities in Coastal Ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00363>
- Martens, H. Barg, M. Warren, D. Jahn, J.-H. (2002). Microbial production of vitamin B₁₂. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 275-285. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0902-7>
- Montero, J. M. (2007). *Estadística descriptiva*. Alfa Centauro.
- Muro-Pastor, M. I., & Florencio, F. J. (2003). Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(6-7), 595-603. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00066-4)
- Ottesen, E. A., Marin, R., Preston, C. M., Young, C. R., Ryan, J. P., Scholin, C. A., & DeLong, E. F. (2011). Metatranscriptomic analysis of autonomously collected and preserved marine bacterioplankton. *The ISME Journal*, 5(12), 1881-1895. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.70>
- Ottesen, E. A., Young, C. R., Eppley, J. M., Ryan, J. P., Chavez, F. P., Scholin, C. A., & DeLong, E. F. (2013). Pattern and synchrony of gene expression among sympatric marine microbial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.1222099110>
- Panzeca, C., Tovar-Sanchez, A., Agustí, S., Reche, I., Duarte, C. M., Taylor, G. T., & Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2006). B vitamins as regulators of phytoplankton dynamics. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 87(52), 593. <https://doi.org/10.1029/2006EO520001>
- Poretsky, R. S., Hewson, I., Sun, S., Allen, A. E., Zehr, J. P., & Moran, M. A. (2009). Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. *Environmental Microbiology*, 11(6), 1358-1375. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01863.x>
- Putnam, E. E., & Goodman, A. L. (2020). B vitamin acquisition by gut commensal bacteria. *PLOS Pathogens*, 16(1), e1008208. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008208>
- Raux, E., Schubert, H. L., & Warren, M. J. (2000). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂): A bacterial conundrum: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(13), 1880-1893. <https://doi.org/10.1007/PL00000670>
- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2003). Comparative Genomics of the Vitamin B₁₂ Metabolism and Regulation in Prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41148-41159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305837200>
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Cutter, L. S., Durazo, R., Smail, E. A., Gómez-Consarnau, L., Webb, E. A., Prokopenko, M. G., Berelson, W. M., & Karl, D. M. (2012). Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), 14041-14045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208755109>

- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Gobler, C. J., Okbamichael, M., & Taylor, G. T. (2006). Regulation of phytoplankton dynamics by vitamin B₁₂. *Geophysical Research Letters*, 33(4), L04604. <https://doi.org/10.1029/2005GL025046>
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Gómez-Consarnau, L., Suffridge, C., & Webb, E. A. (2014). The Role of B Vitamins in Marine Biogeochemistry. *Annual Review of Marine Science*, 6(1), 339-367. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100912>
- Schreier, J. E., Smith, C. B., Ioerger, T. R., & Moran, M. A. (2023). A mutant fitness assay identifies bacterial interactions in a model ocean hot spot. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(12), e2217200120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2217200120>
- Shelton, A. N., Seth, E. C., Mok, K. C., Han, A. W., Jackson, S. N., Haft, D. R., & Taga, M. E. (2019). Uneven distribution of cobamide biosynthesis and dependence in bacteria predicted by comparative genomics. *The ISME Journal*, 13(3), 789-804. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0304-9>
- Smith, A. D., Warren, M. J., & Refsum, H. (2018). Vitamin B₁₂. En: *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 83, 215-279). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.11.005>
- Sokolovskaya, O. M., Shelton, A. N., & Taga, M. E. (2020). Sharing vitamins: Cobamides unveil microbial interactions. *Science*, 369(6499), eaba0165. <https://doi.org/10.1126/science.aba0165>
- Sultana, S., Bruns, S., Wilkes, H., Simon, M., & Wienhausen, G. (2023). Vitamin B₁₂ is not shared by all marine prototrophic bacteria with their environment. *The ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01391-3>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C. M., Kassabgy, M., Huang, S., Mann, A. J., Waldmann, J., Weber, M., Klindworth, A., Otto, A., Lange, J., Bernhardt, J., Reinsch, C., Hecker, M., Peplies, J., Bockelmann, F. D., ... Amann, R. (2012). Substrate-Controlled Succession of Marine Bacterioplankton Populations Induced by a Phytoplankton Bloom. *Science*, 336(6081), 608-611. <https://doi.org/10.1126/science.1218344>
- Wagner-Döbler, I., Ballhausen, B., Berger, M., Brinkhoff, T., Buchholz, I., Bunk, B., Cypionka, H., Daniel, R., Drepper, T., Gerdt, G., Hahnke, S., Han, C., Jahn, D., Kalhoefer, D., Kiss, H., Klenk, H.-P., Kyrpides, N., Liebl, W., Liesegang, H., ... Simon, M. (2010). The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: A hitchhiker's guide to life in the sea. *The ISME Journal*, 4(1), 61-77. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.94>
- Warren, M. J., Raux, E., Schubert, H. L., & Escalante-Semerena, J. C. (2002). The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). *Natural Product Reports*, 19(4), 390-412. <https://doi.org/10.1039/b108967f>
- Wienhausen, G., Dlugosch, L., Jarling, R., Wilkes, H., Giebel, H.-A., & Simon, M. (2022). Availability of vitamin B₁₂ and its lower ligand intermediate α -ribazole impact prokaryotic and protist communities in oceanic systems. *The ISME Journal*, 16(8), 2002-2014. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01250-7>

- Williams, T. J., Wilkins, D., Long, E., Evans, F., DeMaere, M. Z., Raftery, M. J., & Cavicchioli, R. (2013). The role of planktonic *Flavobacteria* in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1302-1317. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12017>
- Zhang, Y., Rodionov, D. A., Gelfand, M. S., & Gladyshev, V. N. (2009). Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B₁₂ utilization. *BMC Genomics*, 10(1), 78. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-78>

Anexos

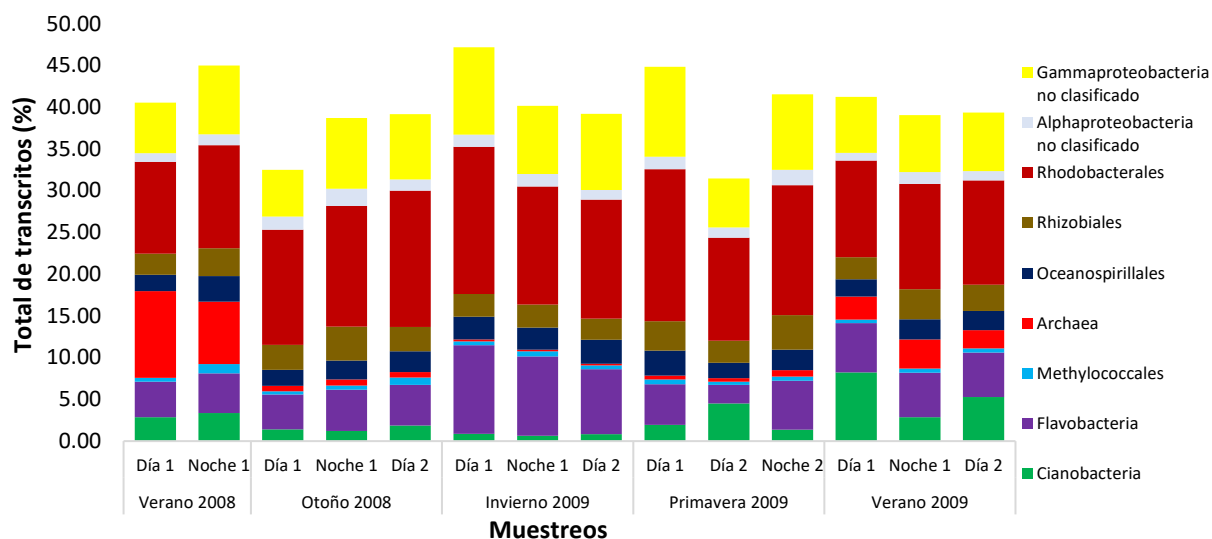


Figura 29. Total de transcritos de la comunidad (%) por taxón y muestreo. Las barras de colores indican los principales órdenes que forman parte del bacterioplancton en el océano y que fueron representativos en todos los muestreos realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA. Los Rhodobacterales son los que presentan un mayor porcentaje de transcritos en la mayoría de las estaciones.

Tabla 5. Total de transcritos de la comunidad, transcritos de síntesis de B₁₂ y transcritos de dependencia de B₁₂ en todos los muestreos realizados en Isla Sapelo, Georgia, EUA (Gómez-Consarnau et al., 2018). *Promedio de dos muestreos realizados.

Muestreos		Todos los transcritos	Transcritos de síntesis de B ₁₂	Transcritos de dependencia de B ₁₂
Verano 2008	Día 1	882878	242	853
	Noche 1	629136	258	619
Otoño 2008	Día 1	864661	215	646
	Noche 1	766610	316	905
	Día 2	660648	298	714
Invierno 2009	Día 1*	969779	435.5	1591.5
	Noche 1	688137	173	537
	Día 2	875005	365	1089
Primavera 2009	Día 1	939701	514	1663
	Día 2	667236	262	597
	Noche 2	757962	315	1052
Verano 2009	Día 1	837540	438	1381
	Noche 1*	821927	402.5	1384
	Día 2	862849	471	1585

Tabla 6. Características de genomas con y sin capacidad de síntesis de B₁₂ del phylum Cyanobacteria. Se identificaron 116 genomas con la capacidad de síntesis en la base de datos IMG. La media del tamaño de los genomas se obtuvo con el software R studio versión 4.1.

Cyanobacteria	Sintetizan B₁₂	No sintetizan B₁₂
Número de genomas	116	35
Tamaño (media)	2 717 350 pb	2 948 179 pb

Tabla 7. Características de genomas con y sin capacidad de síntesis de B₁₂ de la clase Alphaproteobacteria. Se identificaron 138 genomas con la capacidad de síntesis en la base de datos IMG. La media del tamaño de los genomas se obtuvo con el software R studio versión 4.1.

Alphaproteobacteria	Sintetizan B₁₂	No sintetizan B₁₂
Número de genomas	138	229
Tamaño (media)	4 416 016 pb	3 804 557 pb

Tabla 8. Características de genomas con y sin capacidad de síntesis de B₁₂ de la clase Gammaproteobacteria. Se identificaron 40 genomas con la capacidad de síntesis en la base de datos IMG. La media del tamaño de los genomas se obtuvo con el software R studio versión 4.1.

Gammaproteobacteria	Sintetizan B₁₂	No sintetizan B₁₂
Número de genomas	40	704
Tamaño (media)	4 863 424 pb	4 560 693 pb

Tabla 9. Porcentaje total de transcritos de síntesis y de dependencia de B₁₂ por grupo taxonómico, reportados en todos los muestreos realizados en la Isla Sapelo, Georgia, EUA (Gómez-Consarnau et al., 2018).

Grupo taxonómico	Transcritos de síntesis de B₁₂ (%)	Transcritos de dependencia de B₁₂ (%)
Actinobacteria	1.3	5.1
Alphaproteobacteria no clasificados	1.5	0.5
Alteromonadales	1.1	3.4
Aquificales	0.0	0.0
Archaea	1.9	4.4
Bacilli	0.5	0.8
Bacteroidia	0.1	0.4
Betaproteobacteria	10.4	5.5
Chromatiales	1.2	1.0
Cyanobacteria	8.8	1.9
Clostridia	0.8	1.1
Cytophagia	0.6	1.9
Deinococci	3.0	0.8
Delta-Epsilon proteobacteria	0.9	1.9
Eucariotes	0.5	2.1
Flavobacteria	1.4	0.1
Gammaproteobacteria no clasificados	4.7	7.7
Methylococcales	5.8	1.7
Oceanospirillales	1.9	0.9
Otros	2.8	9.7
Otros Alphas	3.8	0.7
Otros CFBs	0.1	5.9
Otros Gammas	1.2	2.2
Planctomycetes	1.2	1.5
Pseudomonadales	0.7	0.9
Rhizobiales	4.8	4.5
Rhodobacterales	32.5	24.3
Rhodospirillales	1.7	0.7
SAR11	0.0	0.1
SAR116	2.1	2.1
Sphingobacteria	0.2	1.1
Verrucomicrobia	1.1	5.2
Virus	1.5	0.0
TOTAL	100	100

Tabla 10. Genomas de procariotas marinos de los taxones más representativos disponibles en la base de datos IMG. Dependan de B₁₂: Genomas que contienen al menos una enzima que requiere de B₁₂; no dependen de B₁₂: Genomas que no contienen ninguna enzima que requiere de B₁₂; sintetizan B₁₂: Genomas que contienen todos los genes para la síntesis de B₁₂; no sintetizan B₁₂: Genomas que no tienen la ruta de síntesis de B₁₂ completa; salvamiento de B₁₂: Genomas que no contienen la ruta de síntesis de B₁₂, pero sí presentan al menos un gen involucrado en la vía de salvamiento o remodelación de B₁₂; y no salvamiento de B₁₂: Genomas que no contienen la ruta de síntesis de B₁₂ y no presentan ningún gen involucrado en la vía de salvamiento o remodelación de B₁₂.

Taxones	Dependen de B ₁₂	No dependen de B ₁₂	Sintetizan B ₁₂	No sintetizan B ₁₂	Salvamiento de B ₁₂	No salvamiento de B ₁₂
Bacteroidetes	191	0	0	191	37	154
Cyanobacteria	145	6	116	35	32	3
Alphaproteobacteria	367	0	138	229	168	61
Gammaproteobacteria	743	1	40	704	649	55
Archaea	20	2	0	22	21	1